



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την διεργασία
οξίνισης και συντήρησης μαρινάτου γαύρου».**

Τσιγάρας Ευάγγελος

ΒΟΛΟΣ 2012

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Ιωάννης Μποζιάρης, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **επιβλέπων,**

2) Κορμάς Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογίας υδρόβιων μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος.**

3) Αρβανιτογιάννης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τεχνολογίας Τροφίμων με έμφαση στη Μεταποίηση, την Ποιότητα και την Ασφάλεια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της τύχης των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* κατά την οξίνιση αλλά και ωρίμανση-αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου. Ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) προμηθεύτηκε από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Κατόπιν και μετά από καλό πλύσιμο, αποκεφαλίστηκε, εκσπλαχνίστηκε και αφαιρέθηκε τόσο η ουρά, όσο και το κεντρικό οστό. Ακολούθως φιλετοποιήθηκε και εν συνεχεία εκτελέστηκε ο εμβολιασμός με *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* με επίπεδο πληθυσμού 5×10^5 cfu/g. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα 5% οξικού οξέως και 2% NaCl για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της οξίνισης (μαριναρίσματος). Κατά τη διάρκεια της 8ωρης οξίνισης μετρήθηκε η επιβίωση των παραπάνω παθογόνων. Τα *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* απαριθμήθηκαν σε τρυβλία Palcam, XLD και Baird-Parker, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια του μαριναρίσματος το *Staphylococcus aureus* αποδείχθηκε το πιο οξυάντοχο, αφού ο πληθυσμός που επιβίωσε στο πέρας του μαριναρίσματος ήταν 3,6 log cfu/g. Αντιθέτως το *Listeria monocytogenes* και το *Salmonella* Enteritidis μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g μετά από 8 και 4 ώρες, αντίστοιχα.

Κατόπιν, ήδη οξυνισμένο προϊόν εμβολιάστηκε με *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* με επίπεδο πληθυσμού 5×10^5 cfu/g και αποθηκεύθηκε στους 4°C για 48 ημέρες. Απαριθμήθηκαν τα *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* σε τρυβλία Palcam, XLD και Baird-Parker, αντίστοιχα, καθώς και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS, ζύμες-μύκητες σε RBC, εντεροβακτήρια σε VRBGA και η ολική μικροβιακή χλωρίδα σε TSA. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση του pH. Κατά την αποθήκευση του γαύρου ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων, οξυγαλακτικών και εντεροβακτηρίων ήταν κάτω απ'το όριο ανίχνευσης των 100, 10 και 10 cfu/g αντίστοιχα. Ο ολικός πληθυσμός που μετρήθηκε με TSA ξεκίνησε από 2,3 log cfu/g και έφθασε έως τα 3,5 log cfu/g στο πέρας του πειράματος. Ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g ύστερα από 24 ημέρες, ενώ το *Salmonella* Enteritidis και το *Staphylococcus aureus*, χρειάστηκαν 35 και 21 ημέρες, αντίστοιχα.

Τέλος ένα τελευταίο πείραμα αφορούσε την επιβίωση προσαρμοσμένων σε συνθήκες χαμηλού pH (pH=4), κυττάρων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis

και *Staphylococcus aureus* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γάουρου. Ομοίως διενεργήθηκε η διαδικασία του μαριναρίσματος. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η προσαρμογή των κυττάρων τους σε pH=4 αλλά και pH=7 (μάρτυρας) και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν στα οξυνισμένα ψάρια σε αρχικού πληθυσμούς της τάξης των 5 log cfu/g περίπου και αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 35 ημέρες. Το *Staphylococcus aureus* ήταν το πιο οξυάντοχο, ενώ τα κύτταρα που ήταν προσαρμοσμένα σε όξινο pH (pH=4), αποδείχθηκαν πιο οξυάντοχα. Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές για τα κύτταρα των *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteritidis*.

Λέξεις κλειδιά: μαρινάρισμα, οξίνιση, γάουρος, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Μικροοργανισμοί.....	1
1.3 Μικροβιακή αλλοίωση.....	2
1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	3
1.5 Ο Γαύρος, <i>Engraulis encrasicolus</i> , Linnaeus, 1758.....	5
1.6 Συστηματική κατάταξη γαύρου (<i>Engraulis encrasicolus</i>).....	6
1.7 Συντήρηση του γαύρου.....	7
1.7.1 Συντήρηση με πάγο.....	7
1.7.2 Αλάτιση.....	8
1.7.3 Οξίνιση (Μαρινάρισμα).....	9
1.8 Σκοπός της εργασίας.....	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
2.1 Μικροβιολογικά υλικά.....	11
2.1.1 TSB (Tryptone Soy Broth).....	11
2.1.2 RBC (Rose Bengal Chloramphenicol).....	12
2.1.3 TSA (Tryptone Soy Agar).....	13
2.1.4 MRS (Mann Rogosa Sharpe agar).....	13
2.1.5 VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar).....	14
2.1.6 Palcam.....	16
2.1.7 Baird-Parker.....	17
2.1.8 XLD (Xylose Lysine Deoxycholate).....	18
2.2 Εμβολιασμός με παθογόνους.....	19
2.3 Μέθοδοι αερόβιας μέτρησης αριθμού ζωντανών κυττάρων.....	20
2.4 Μέτρηση του pH.....	21
2.5 Πειραματική διαδικασία.....	21
2.5.1 Μαρινάρισμα γαύρου.....	21
2.5.2 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια 8ωρης οξύνισης.....	22
2.5.3 Επιβίωση παθογόνων και μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου.....	22
2.5.4 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=7 και pH=4 κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου.....	23

2.6 Υπολογισμός ρυθμού θανάτωσης.....	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια 8ωρης οξίνισης.....	25
3.1.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	25
3.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.1.4 Συγκριτικά οι 3 παθογόνοι.....	27
3.1.5 Μεταβολή του pH.....	28
3.2 Επιβίωση παθογόνων και μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου.....	28
3.2.1 Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (ΟΜΧ).....	29
3.2.2 Ζύμες και μύκητες, γαλακτικά βακτήρια και Enterobacteriaceae.....	29
3.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.2.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	31
3.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.2.6 Μεταβολή του pH.....	32
3.3 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=7 και pH=4 κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου.....	33
3.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3.3.2 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	35
3.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.3.4 Μεταβολή του pH.....	36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	43
6.2 Ελληνική βιβλιογραφία.....	48
6.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία.....	48

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Οι ιχθύες 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). Τόσο τα ψάρια του αλμυρού όσο και του γλυκού νερού περιέχουν συγκριτικά υψηλά επίπεδα από πρωτεΐνες και άλλα αζωτούχα συστατικά. Η περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες είναι πολύ μικρή, ενώ η περιεκτικότητά τους σε λίπος ποικίλλει από πολύ χαμηλά σε υψηλά επίπεδα, ανάλογα με το είδος του ψαριού (Μποζιάρης 2009).

Η χημική σύσταση των ιχθυηρών, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό (75% κατά μέσο όρο) καθώς και το σχετικά υψηλό τους pH (στην πλειοψηφία τους 6,2-6,8) τα καθιστούν ένα πολύ καλό υπόστρωμα ανάπτυξης μιας ευρείας ποικιλίας μικροοργανισμών. Τα αλιεύματα ως άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αλλοιώνονται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την αλίευση τους (Gram and Huss 1996).

1.2 Μικροοργανισμοί

Ένας μικροοργανισμός ή μικρόβιο είναι ένας μικροσκοπικός οργανισμός που αποτελείται είτε από ένα μόνο κύτταρο (μονοκύτταροι), είτε από συστάδες κυττάρων (πολυκύτταροι), (Madigan and Martinko 2006).

Υπάρχουν πολλές και διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών, οι οποίες περιλαμβάνουν τα βακτήρια, τα αρχαία, τους μύκητες, τα πρώτιστα, μικροσκοπικά φυτά (όπως τα πράσινα φύκη), αλλά και το πλαγκτόν και την πλανάρια. Μερικοί μικροβιολόγοι συγκαταλέγουν και τους ιούς, αλλά οι περισσότεροι το θεωρούν λάθος διότι οι ιοί δεν έχουν τα χαρακτηριστικά ενός έμβιου όντος (Rybicki 1990).

Οι μικροοργανισμοί ζουν σ' όλα τα μέρη της βιόσφαιρας όπου υπάρχει νερό σε υγρή μορφή, όπως στο έδαφος, σε θερμές πηγές, στον πυθμένα του ωκεανού και από ψηλά στην ατμόσφαιρα έως βαθιά μέσα στους βράχους του εσωτερικού φλοιού της Γης. Είναι σημαντικοί για την ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών στα οικοσυστήματα, αφού ενεργούν ως αποικοδομητές. Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να καθορίσουν το άζωτο και είναι ζωτικής σημασίας στον κύκλο του αζώτου. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν

ότι τα αερομεταφερόμενα μικρόβια μπορούν να παίξουν ρόλο στη βροχόπτωση και στον καιρό (Christner et al. 2008).

Σ' ένα ζωντανό και υγιές ψάρι οι εσωτερικοί ιστοί του είναι μικροβιολογικά στείροι. Στο φρέσκο ψάρι οι μικροοργανισμοί ανιχνεύονται κυρίως στην επιφάνεια της επιδερμίδας του, στα βράγχια και στο πεπτικό του σύστημα. Ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων που υπάρχουν στην επιφάνεια του δέρματος των ιχθύων, κυμαίνεται από 10^2 έως 10^7 cfu/cm² (Liston 1980), ενώ στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα γύρω στα 10^3 έως 10^9 cfu/g αντιστοιχούν (Shewan 1962).

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

1.3 Μικροβιακή αλλοίωση

Ως αλλοίωση των αλιευμάτων ή και γενικά των τροφίμων χαρακτηρίζονται οι αλλαγές που καθιστούν το προϊόν ελάχιστα αποδεκτό, μη αποδεκτό ή ακόμα και μη ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση (Hayes 1985). Τα ψάρια που υποβάλλονται σε αλλοίωση έχουν μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες ενδείξεις:

- i. σχηματισμός 'γλίτσας'
- ii. αποχρωματισμός
- iii. αλλαγές στην υφή
- iv. ανεπιθύμητες οσμές και γεύση

Κάθε σύμπτωμα ή ομάδα συμπτωμάτων που πραγματοποιούν αλλαγές στην οσμή, στο άρωμα, ή γενικά στην εμφάνιση του αλιεύματος λόγω μικροβιακής δραστηριότητας ορίζεται ως μικροβιακή αλλοίωση (Gill 1986). Επειδή η αλλοίωση είναι το αποτέλεσμα της μικροβιακής ανάπτυξης και δραστηριότητας, ο μικροβιακός πληθυσμός και ο βαθμός αλλοίωσης συσχετίζονται. Οι μεταβολές στην οσμή και την γεύση των τροφίμων προέρχονται από την παραγωγή ουσιών, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των βακτηρίων. Αυτές οι ουσίες οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη και παράγονται μόνο από ένα μέρος της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας, τους επονομαζόμενους 'ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς' (EAM), (Huis in't Veld 1996, Gram and Huss 1996). Ωστόσο, η ανάπτυξη αυτών των δεικτών αλλοίωσης στα

επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα οφείλονται σ' ένα συνδυασμό από μικροβιολογικούς, χημικούς, ενζυματικούς και φυσικούς παράγοντες (Huis in't Veld 1996).

1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι μικροοργανισμοί που μολύνουν το κύτταρο-ξενιστή και έχουν επιπτώσεις στον άνθρωπο, στα ζώα ή ακόμη και στα φυτά τα οποία προσβάλλουν. Περιλαμβάνουν παθογόνα βακτήρια, μύκητες, ιούς και πρωτόζωα.

Ακολουθώς περιγράφονται τα παθογόνα βακτήρια και οι παθογόνοι μύκητες και οι επιπτώσεις που προκαλούν στον άνθρωπο.

- Παθογόνα βακτήρια

Οι τροφικές δηλητηριάσεις που προκαλούν τα παθογόνα βακτήρια διακρίνονται σε τροφολοιμώξεις και τροφοτοξινώσεις. Η τροφολοιμώξη προκαλείται από την κατάποση των κυττάρων αυτών των μικροοργανισμών μέσω των τροφίμων ή ακόμα και δια μέσου του νερού. Αντιθέτως, η τροφοτοξίνωση προκαλείται από την κατάποση των τοξινών που παράγουν τα παθογόνα βακτήρια κατά την ανάπτυξη τους στα τρόφιμα. Γεγονός είναι ότι η θερμότητα δεν βοηθά στην καταστροφή αυτών των τοξινών (Μποζιάρης 2009).

Μερικά σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια και οι ασθένειες που προκαλούν παραθέτονται παρακάτω (Πίν. 1).

Πίνακας 1: Τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια και οι ασθένειες που προκαλούν

Είδος βακτηρίου	Ασθένεια
<i>Clostridium botulinum</i>	Αλλαντίαση
<i>Escherichia coli</i>	Γαστρεντερίτιδες
<i>Listeria monocytogenes</i>	Λιστερίωση
<i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium	Σαλμονέλωση (γαστρεντερίτιδα, εντεροκολίτιδα)
<i>Salmonella typhi</i>	Τυφοειδής πυρετός
<i>Staphylococcus aureus</i>	Σταφυλοκοκκική τοξίνωση
<i>Vibrio cholerae</i>	Χολέρα και γαστρεντερίτιδες

1. *Listeria monocytogenes*

Το *Listeria monocytogenes* είναι Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 30-37 °C, ενώ γενικά αναπτύσσεται και σε συνθήκες ψυγείου άνω των 0 °C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει σε διάφορες άλλες ακραίες συνθήκες, όπως σε υψηλή αλατότητα ή χαμηλό pH. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη του στα τρόφιμα είναι 4,6-5,0. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες καθώς επίσης και υπό κενό, καθώς και σε μέγιστη συγκέντρωση NaCl περίπου 10% (Feldhusen 2000). Η ασθένεια λιστερίωση είναι απόρροια του *Listeria monocytogenes*, και είναι μια σοβαρή λοίμωξη που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που έχουν μολυνθεί με τα συγκεκριμένα βακτήρια. Η νόσος προσβάλλει κατά κύριο λόγο έγκυες γυναίκες, νεογνίδια, ενήλικες με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και ηλικιωμένους. Οι δύο κύριες κλινικές εκδηλώσεις είναι η σηψαιμία και η μηνιγγίτιδα. Το ποσοστό θνησιμότητας της λιστερίωσης είναι περίπου 20% (Low et al. 1997).

2. *Salmonella* spp.

Το *Salmonella* είναι ένα γένος Gram-αρνητικών, προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων, που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι παθογόνο για τον άνθρωπο βακτήριο, καθώς προκαλεί εντερικές διαταραχές, γαστρεντερίτιδα, πυρετό και βακτηριαίμια. Η τροφική δηλητηρίαση είναι η πιο συχνή κλινική εκδήλωση. Η σαλμονέλωση προκαλείται στον άνθρωπο από κατανάλωση ωμής ή μαγειρεμένης μολυσματικής τροφής ζωικής προελεύσεως (κρέας, αυγά, γάλα, αλιευτικά προϊόντα). Εισέρχονται στον οργανισμό μέσω του εντέρου και διεισδύουν στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου, στο οποίο εμφανίζεται φλεγμονή (Karst 2005). Αναπτύσσονται από τους 6 έως τους 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. Βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και μέσω των απεκκρίσεων μολύνουν το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (Μποζιάρης 2009).

3. *Staphylococcus aureus*

Το *Staphylococcus aureus* είναι Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι στους 37 °C, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί από τους 7 °C-47 °C (Vandenbosch et al. 1972). Μπορεί να προκαλέσει μαστίτιδα σε ζώα όπως οι αγελάδες. Αυτό μπορεί να προκληθεί με τη μόλυνση της θηλής από τα χέρια του

κτηνοτρόφου ή ακόμη κι από έντομα. Η μόλυνση συνήθως είναι ασυμπτωματική, προκαλεί αύξηση των σωματικών κυττάρων, ενώ δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμες αλλαγές στο μαστό ή στο γάλα. Τα βακτήρια παραμένουν στον μαστικό αδένα, τον οποίο μολύνουν και σαν αποτέλεσμα μολύνεται το παραγόμενο γάλα. Η ασθένεια είναι μεταδοτική κι αν οι μολυσμένες αγελάδες δεν θεραπευτούν με τα αντιβιοτικά, τότε θανατώνονται ή αποσπώνται από την υπόλοιπη αγέλη (Petersson-Wolfe et al. 2010). Το *Staphylococcus aureus* υπάρχει στον άνθρωπο στην επιφάνεια του δέρματος και στο εσωτερικό της μύτης. 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/gr. Αιτία είναι η παραγωγή μεγάλης ποσότητας θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης τη στιγμή αυτή, γεγονός που προκαλεί ναυτία και εμετούς. Σε άριστες συνθήκες μπορεί να σχηματιστεί τοξίνη σε 4-6 h. Η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από το *S. aureus*, η σταφυλοκοκκική τοξίνωση, χαρακτηρίζεται από μικρή περίοδο επώασης, συνήθως 2-4 h. Τα κυρίαρχα συμπτώματα είναι ναυτία, ο εμετός, οι έντονοι πόνοι στο στομάχι και η διάρροια. Η πλήρης ανάρρωση έρχεται μετά από 1-2 ημέρες (Μποζιάρης 2009).

1.5 Ο γάυρος - *Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758

Γάυρος ή γάβρος είναι η κοινή ονομασία του *Engraulis encrasicolus* που αποδόθηκε από τον Carl Linnaeus το 1758. Ανήκει στην οικογένεια Εγγραυλίδες (Engraulidae). Είναι ψάρι γνωστό από την αρχαιότητα, ενώ άλλες ονομασίες που υπάρχουν γι' αυτό είναι αντζούγια ή και χαψί (κατά την τουρκική ονομασία του) (Ανανιάδη 1961).

Το μέγιστο μήκος του είναι 20 cm, ενώ το κοινό του μήκος κυμαίνεται από 13-14,5 cm (Whitehead et al. 1988). Έχει ένα ραχιαίο πτερύγιο, ένα κοιλιακό πτερύγιο αντικρυστά του ραχιαίου καθώς επίσης ένα θωρακικό χαμηλότερα κι ένα μικρό εδρικό τριγωνικού σχήματος. Το σχήμα του είναι στενόμακρο, η κάτω γνάθος του είναι μικρότερη από την άνω και φθάνει σχεδόν κάτω από το ρουθούνι. Επίσης διαθέτει μακρύ ρύγχος, ενώ το στόμα του φθάνει μέχρι πίσω από τα μάτια και τα δόντια του είναι μικρά και μυτερά. Διαθέτει επίσης διχαλωτή ουρά. Κατά μήκος έχει μια ασημί λωρίδα που εξαφανίζεται με την ηλικία (Ανανιάδη 1961).

Κυρίως είναι είδος που ζει στα παράκτια, ενώ σε ορισμένες περιοχές μπαίνει σε λιμνοθάλασσες, εκβολές ποταμών και λιμνών, ειδικά κατά τη διάρκεια της φωτοκίας. Ζει κατά κοπάδια και το καλοκαίρι μετακινείται σε επιφανειακά ύδατα και βοριότερα, ενώ το χειμώνα επιστρέφει στο βυθό σε βάθος περίπου 100-200 m. Τρέφεται με πλαγκτονικούς

οργανισμούς. Ωοτοκεί από τον Απρίλιο έως τον Νοέμβριο με κορυφαίους μήνες ωοτοκίας του, τους καλοκαιρινούς, λόγω θερμότητας. Τα αυγά του είναι σχήματος οβάλ, επιπλέουν στα πρώτα 50 μέτρα και επωάζονται σε 24-65 ώρες. Διατίθενται στο εμπόριο νωπά, κατεψυγμένα, αποξηραμένα, καπνιστά και σε κονσέρβες (Frimodt 1995).

Παγκοσμίως, ο γάυρος ζει στον ανατολικό Ατλαντικό από το Μπέργκεν της Νορβηγίας έως την νότια Αγγλία και φθάνει μέχρι την Νότιο Αφρική (Whitehead 1990). Επίσης ζει στη Μεσόγειο, στη Μάυρη και στην Αζοφική Θάλασσα. Επιπροσθέτως υπάρχουν γάυροι αδέσποτοι και όχι σε κοπάδια στη διώρυγα και τον κόλπο του Σουέζ, ενώ καταγράφηκαν δείγματα γαύρων στην Αγία Ελένη στο νότιο Ατλαντικό, καθώς επίσης και στην Εσθονία (Frimodt 1995).



Εικόνα 1. *Engraulis encrasicolus*

Στην Ελλάδα πληθυσμοί του γαύρου απαντούν στο Β.Αιγαίο, στο Β.Ευβοϊκό, στο Σαρωνικό και στο Ιόνιο Πέλαγος. Μαζί με την σαρδέλα *Sardina pilchardus* αποτελούν τα κυρίαρχα είδη της ελληνικής αλιευτικής παραγωγής (Stergiou et al. 1997). Είναι βασικό αλιεύμα στο βόρειο Αιγαίο και αλιεύεται κυρίως από τον στόλο των γρι-γρι. Οι συλλήψεις του γαύρου εμφανίζουν ένα σαφές εποχικό πρότυπο και μια αυξητική τάση τα χρόνια μετά το 1980. Προς το τέλος της δεκαετίας του 1970 η αύξηση της τιμής του οδήγησε τον στόλο των γρι-γρι, τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε άλλες περιοχές της Μεσογείου, να στραφούν περισσότερο στην αλιεία του γαύρου παρά της σαρδέλας (Stergiou 1992, Garcia & Palomera 1996). Από το 1996 κι έπειτα παρουσιάζεται μια καθοδική τάση, τόσο στις συλλήψεις του γαύρου, όσο και στις συνολικές συλλήψεις γαύρου-σαρδέλας.

1.6 Συστηματική κατάταξη γαύρου (*engraulis encrasicolus*)

Βασίλειο: Animalia

Φύλλο: Chordata

Κλάση: Actinopterygii

Τάξη: Clupeiformes

Οικογένεια: *Engraulidae*

Γένος: *Engraulis*

Είδος: *Encrasicolus*

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

1.7 Συντήρηση του γαύρου

1.7.1 Ψύξη σε πάγο

Η ψύξη των ιχθύων με πάγο είναι η πιο απλή και η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος σήμερα. Τα κομμάτια του πάγου διαμέτρου 2-3 cm τοποθετούνται μαζί με τα ψάρια μέσα σε κιβώτια (τελάρα). Ο πάγος είναι δυνατόν να αλεστεί και να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή τεχνητού χιονιού. Τότε η αποτελεσματικότητα του είναι μεγαλύτερη, γιατί αποφεύγεται η επαφή των ιχθύων με τον αέρα, ο οποίος τα αλλοιώνει. Όταν το βάρος των ιχθύων είναι μεγαλύτερο των 3 Kg, αυτά εκσπλαχνίζονται, πλένονται με θαλασσινό νερό και τοποθετούνται στα κιβώτια, σε επάλληλα στρώματα με τέτοιο τρόπο, ώστε το κατώτερο και ανώτερο στρώμα να αποτελείται από πάγο, ενώ η κοιλία των ιχθύων στρέφεται προς τα κάτω (άμεση επαφή με τα κομμάτια πάγου). Ο πάγος που χρησιμοποιείται για την ψύξη μπορεί να είναι από πόσιμο ή θαλασσινό νερό (φυσικό ή τεχνητό). (εικόνα 2)



Εικόνα 2. Η παρουσία πάγου στους ιχθείς είναι απαραίτητη από τη στιγμή που θα αλιευθούν (Πηγή: Τρόφιμα και καταναλωτής, 2000).

Η θερμική μεταφορά αρχίζει αμέσως μετά την τοποθέτηση των ιχθύων και του πάγου στα κιβώτια. Το νερό που προέρχεται από την τήξη του πάγου απομακρύνεται από τα κενά των κιβωτίων. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες ψύχονται οι ιχθείς με την επίδραση

του πάγου είναι αρκετά πολύπλοκες. Η θερμική μεταφορά γίνεται από την επιφάνεια των ιχθύων που βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον πάγο, ή που διαβρέχεται από το νερό που προκύπτει από τη τήξη του πάγου και από εκείνο το τμήμα της επιφάνειας τους που έρχεται σε επαφή με τον αέρα. Η θερμοκρασία του αέρα στην περίπτωση αυτή είναι περίπου 0°C. Ο χρόνος ψύξης της επιφάνειας αυτής είναι μεγαλύτερος από το χρόνο ψύξης της επιφάνειας των ιχθύων που έρχεται σε άμεση επαφή με τον πάγο. (Γεωργάκης et al. 2000).

Η ποσότητα που πάγου που χρησιμοποιείται για την ψύξη των ιχθύων αποτελεί τα 50% ως 100% του βάρους τους ανάλογα με την εποχή και το χρόνο συντήρησής τους. Η βακτηριολογική κατάσταση του πάγου είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την καλή συντήρηση των ιχθύων. Ο φυσικός πάγος, συνήθως περιέχει μικροοργανισμούς, μερικές φορές σε μεγάλους αριθμούς. Ο πάγος που παρασκευάζεται σε βιομηχανικές περιοχές θεωρείται ότι έχει υψηλή μόλυνση. Είναι πιθανόν ο πάγος αυτός να περιέχει παθογόνα βακτήρια όπως *Escherichia coli* και *Salmonella* (Kreuzer 1971).

1.7.2 Αλάτιση

Η χρήση αλατιού ως μέθοδος συντήρησης των αλιευμάτων δρα στη μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w), η μείωση της οποίας παρεμποδίζει την ανάπτυξη των περισσοτέρων μικροοργανισμών. Σε $a_w < 0.92$ έχουμε αναστολή της βακτηριακής δράσης, με εξαίρεση κάποιους αλόφιλους 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 Τζούρος 2004).

- **Ξηρή αλάτιση**

Η ξηρή αλάτιση μπορεί να γίνει τόσο με λεπτό όσο και με χοντρό αλάτι. Το λεπτό έχει την δυνατότητα να προκαλεί γρήγορη αφυδάτωση των επιφανειακών στρωμάτων με τον σχηματισμό κρούστας η οποία δυσκολεύει την 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).

Οι ιχθύες τεμαχίζονται σε φιλέτα τοποθετούνται κατά στρώματα που διαχωρίζονται από στρώσεις αλατιού. Η διάρκεια της αλάτισης κυμαίνεται από λίγες ημέρες έως και λίγες εβδομάδες. Η άλμη που σχηματίζεται από τον οπό που εξέρχεται από την σάρκα των ιχθύων απομακρύνεται μέσα από οπές που υπάρχουν στον πυθμένα των δοχείων. Παραλλαγή της αποτελεί η μέθοδος κατά την οποία ο οπός που εξέρχεται κατά τη διάρκεια της αλάτισης δεν απομακρύνεται αλλά παραμένει στο δοχείο αλάτισης, με αποτέλεσμα οι ιχθύες να υποβάλλονται ταυτόχρονα σε ξηρή και υγρή αλάτιση, συνήθως για 2-3 ημέρες (Burt 1988, Horner 1992, Βαρελτζής 1999).

- **Υγρή αλάτιση**

Η συγκέντρωση του NaCl και ο χρόνος αλάτισης εξαρτώνται από το μέγεθος και τη λιποπεριεκτικότητα των ιχθύων, την παρουσία δέρματος και τον επιθυμητό βαθμό αλμυρότητας και συνεκτικότητας της σάρκας τους. Η άλμη θα πρέπει να διατηρείται καθαρή κατά τη διάρκεια της αλάτισης και να ανανεώνεται σε κάθε παρτίδα. Το αλάτι που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ξένες προσμίξεις και βακτήρια. Επίσης, αυτό δεν πρέπει να περιέχει θειϊκά άλατα ή χλωριούχο μαγνήσιο σε ποσοστό >1%. Οι ουσίες αυτές του προσδίδουν πικρή γεύση, η οποία επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Η άλμη που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι είτε σε ασθενή (NaCl <16%) ή μέση (16-20%) συγκέντρωση, είτε σε ισχυρή συγκέντρωση (NaCl >20% ή σε διάλυμα κορεσμένης άλμης). Σε ασθενή ή μέση περιεκτικότητα αλατιού οι ιχθύες παραμένουν στην άλμη για λίγα λεπτά της ώρας έως λίγες ώρες, ανάλογα με το μέγεθος και τη λιποπεριεκτικότητά τους, για να απορροφήσουν μικρή ποσότητα αλατιού που συμβάλλει κυρίως στη γεύση και στο άρωμα του τελικού προϊόντος. Αντιθέτως, σε ισχυρή περιεκτικότητα αλατιού οι ιχθύες παραμένουν στην άλμη συνήθως για 24-50 ώρες. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή καπνιστών ιχθύων με μεγάλη λιποπεριεκτικότητα που πρόκειται να συντηρηθούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (Burt 1988, Horner 1992, Βαρελτζής, 1999).

1.7.3 Οξίνιση (Μαρινάρισμα)

Η συντήρηση με οξίνιση είναι ένας τρόπος συντήρησης που βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Η οξίνιση πραγματοποιείται συνήθως με ξύδι, το οποίο περιέχει 5-6% οξικό οξύ.

Το ψάρι υπόκειται σε προετοιμασία όπως αποκεφαλισμός, εκσπλαχνισμός, αφαίρεση του κεντρικού οστού, πλύσιμο, φιλετοποίηση και κατόπιν εμβαπτίζεται στο ξύδι. Συνήθως

προηγείται ελαφριά αλάτιση. Η οξίνιση πραγματοποιείται εν ψυχρώ ή εν θερμώ. Τέλος, τα προϊόντα αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος ή σε θερμοκρασία ψύξης (Μποζιάρης 2009).

1.8 Σκοπός της εργασίας

Η χρησιμοποίηση οξικού οξεώς κατά τη διάρκεια του μαριναρίσματος δημιουργεί όξινο περιβάλλον, το οποίο αναστέλει την ανάπτυξη ή και αδρανοποιεί (θανατώνει) τους μικροοργανισμούς. Η παρούσα εργασία έχει σκοπό να μελετήσει, εν πρώτοις την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια δωρης οξίνισης. Ακολούθως διερευνά την τύχη των προαναφερθέντων μικροοργανισμών καθώς και της φυσικής μικροχλωρίδας (Ολικός μικροβιακός πληθυσμός, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτήρια, ζύμες και μύκητες) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και συντήρησης του μαριναρισμένου γαύρου. Τέλος, με τη χρήση προσαρμοσμένων σε pH=7 και pH=4 κυττάρων, από τους παθογόνους μικροοργανισμούς *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* εξετάζεται η επιβίωση και ανάπτυξη αυτών στο κατά την αποθήκευση-ωρίμανση του μαριναρισμένου γαύρου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της LAB M (Lancashire, UK) και είναι τα παρακάτω:

1. TSB (Tryptone Soy Broth)
2. RBC (Rose Bengal Chloramphenicol)
3. TSA (Tryptone Soy Agar)
4. MRS (Mann Rogosa Sharpe agar)
5. VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar)
6. Palcam Agar
7. Baird-Parker
8. XLD (Xylose Lysine Deoxycholate)

Αναλυτικά η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζεται κάτωθι:

2.1.1. TSB (Tryptone Soy Broth)

Το TSB είναι ένα υγρό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών.

Το TSB περιέχει σε 1000 ml:

- 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:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml. Έπειτα μετρήθηκαν 1000 ml απιονισμένο νερό σε ογκομετρικό σωλήνα και προστέθηκαν στη φιάλη. Ένας μαγνητικός αναδευτήρας βοήθησε στην διαλυτοποίηση των υλικών.

Το τελικό pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7.3 ± 0.2 . Ακολούθως με τη χρήση dispenser μεταγγίστηκαν 9 ml σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Τέλος τοποθετήθηκαν στην αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

2.1.2 RBC (Rose Bengal Chloramphenicol)

Το ουδέτερο pH σε συνδυασμό με την χλωραμφαινικόλη αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το RBC είναι ένα θρεπτικό υλικό το οποίο βοηθά στην ανίχνευση και απαρίθμηση των ζυμών και των μυκήτων. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 25°C για 96 h.

Το RBC περιέχει σε 1000 ml:

- Mycological peptone 5 g
- Glucose 10 g
- Potassium dihydrogen phosphate 1 g
- Magnesium sulfate 0.5 g
- Rose Bengal 0.05 g
- Chloramphenicol 0.1 g
- Agar 15.5 g

Διαδικασία παρασκευής:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε στην αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 45°C . Τέλος μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 1. Θρεπτικό υπόστρωμα RBC στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες.

2.1.3 TSA (Tryptone Soy Agar)

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση όλων σχεδόν των μικροοργανισμών (είτε αερόβιοι είναι αυτοί, είτε αναερόβιοι), που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA προσδιορίστηκε η OMX. Η επώαση πραγματοποιείται στους 25 °C για 48 h.

Το TSA περιέχει σε 1000 ml:

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

Διαδικασία παρασκευής:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε στην αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά κι ύστερα μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 2. Θρεπτικό υπόστρωμα TSA στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες.

2.1.4 MRS (Mann Rogosa Sharpe agar)

Το MRS περιέχει πολυσορβικό, οξικό νάτριο, μαγνήσιο και μαγγάνιο τα οποία είναι γνωστό ότι δρουν ως ειδικοί παράγοντες ανάπτυξης για γαλακτοβάκιλους. Η ανάπτυξη των άλλων οργανισμών καταστέλλεται από το οξικό νάτριο καθώς επίσης κι απ' το pH

που ισούται με 7. Στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS έγινε ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 30 °C για 96 h.

Το MRS περιέχει σε 1000 ml:

- Mixed peptones 10 g
- Yeast Extract 5 g
- Beef Extract 10 g
- Glucose 20 g
- Potassium phosphate 2 g
- Sodium acetate 5 g
- Magnesium sulphate 0.2 g
- Manganese sulphate 0.05 g
- Tween 80 1.08 g
- Ammonium citrate 2 g

Διαδικασία παρασκευής:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε στην αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά και κατόπιν μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 3. Θρεπτικό υπόστρωμα MRS στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες.

2.1.5 VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)

Η δράση των χολικών (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) βοηθά στην ανάπτυξη μόνο των βακτηριδίων της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ταυτόχρονη παρουσία των χολικών αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους αναστέλλουν τα gram-

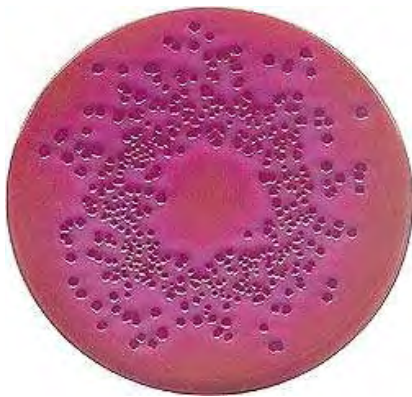
θετικά βακτήρια. Από το κόκκινο χρώμα του δείκτη pH φαίνεται η διάσπαση της γλυκόζης σε οξύ. Στο θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA έγινε ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 37 °C για 24 h.

Το VRBGA περιέχει σε 1000 ml:

- Yeast Extract 3 g
- Balanced 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:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά κι ύστερα μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 4. Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες.

2.1.6 Palcam

Το Palcam βασίζεται στη φόρμουλα που διατύπωσαν οι Van Netten et al. (1989) οι οποίοι ανέπτυξαν αυτό το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο βοηθά στην απομόνωση και την απαρίθμηση του *Listeria* spp. από δείγματα τροφίμων και άλλων περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η εκλεκτικότητα του οφείλεται στα συστατικά του: πολυμυξίνη, ακριφλαβίνη, κεφταζιμίνη και χλωριούχο λίθιο. Το χρώμα των αποικιών του *Listeria monocytogenes* είναι μαύρο όταν είναι πολλές μαζί, και σκούρο πράσινο όταν είναι διάσπαρτες. Τα τρυβλία επώασθησαν στους 37 °C για 24 - 48h.

Το Palcam περιέχει σε 1000 ml:

- Peptone 23 g
- Yeast Extract 3 g
- Starch 1 g
- Sodium chloride 5 g
- Agar 13 g
- D(-)Mannitol 10 g
- Glucose 0.5 g
- Ferric Ammonium Citrate 0.5 g
- Lithium chloride 15 g
- Esculin 1 g
- Phenol Red 0.08 g

Διαδικασία παρασκευής:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε στην αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 45 °C. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε εκλεκτικό αντιβιοτικό polymyxin B, το οποίο φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, και προστέθηκε ασηπτικά στη φιάλη με το Palcam. Τέλος, μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 5. Εκλεκτικό υπόστρωμα Palcam στο οποίο αναπτύχθηκαν αποικίες *Listeria monocytogenes*.

2.1.7 Baird-Parker

Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird-Parker χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την απαρίθμηση του *Staphylococcus aureus* στα τρόφιμα σύμφωνα με τον Baird-Parker (1962). Το χλωριούχο λίθιο και ο τελουρίτης που περιέχει το Baird-Parker αναστέλλει την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας, ενώ η γλυκίνη και το πυροσταφυλικό διεγείρουν εκλεκτικά την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 37 °C για 48 h.

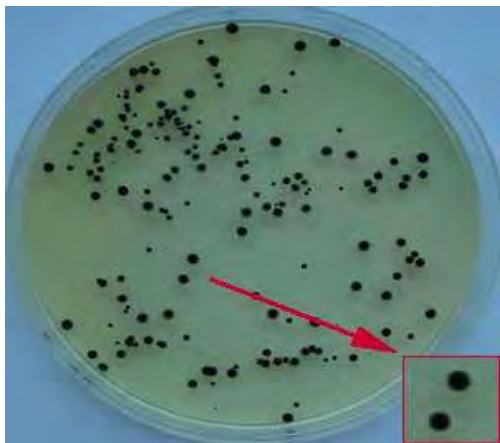
Το Baird-Parker περιέχει σε 1000 ml:

- Mixed Peptones 10 g
- Yeast Extract 5 g
- Glycine 12 g
- Beef Extract 1 g
- Sodium pyruvate 14 g
- Lithium chloride 5 g
- Agar 15 g
- Egg Yolk Tellurite Supplement 50 ml

Διαδικασία παρασκευής:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε στην αποστείρωση στους 121°C για

15 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 45 °C. Ακολούθως προστέθηκε ασηπτικά μίγμα κρόκου αυγού και τελουρίτη και τέλος μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 6. Εκλεκτικό υπόστρωμα Baird-Parker στο οποίο αναπτύχθηκαν αποικίες *Staphylococcus aureus*. Πλάσιο: Τυπικές μαύρες αποικίες του *Staphylococcus aureus*.

2.1.8 XLD (Xylose Lysine Deoxycholate)

Το XLD χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την διαφοροποίηση των εντερικών παθογόνων. Με το συγκεκριμένο επιλεκτικό υπόστρωμα προσδιορίζεται η ανίχνευση της *Salmonella* spp. Οι αποικίες του *Salmonella* spp. εμφανίζονται με κόκκινο σκούρο χρώμα, δηλαδή το χρώμα τους είναι σχεδόν ίδιο με αυτό του υποστρώματος. Πολλές φορές είναι ημιδιαφανείς με μαύρο κέντρο. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 37 °C για 24-48 h.

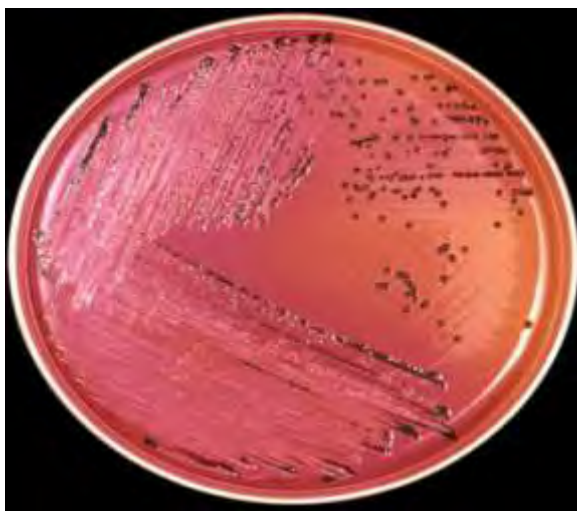
Το XLD περιέχει σε 1000 ml:

- Yeast Extract 3 g
- Sodium chloride 5 g
- Xylose 3.5 g
- Lactose 7.5 g
- Sucrose 7.5 g
- L-Lysine 5 g
- Sodium Deoxycholate 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:

Τα παραπάνω υλικά ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε μια φιάλη των 1000 ml, η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά. Τέλος, μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 7. Εκλεκτικό υπόστρωμα XLD στο οποίο αναπτύχθηκαν αποικίες *Salmonella* spp.

2.2 Εμβολιασμός με παθογόνους

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella* Enteritidis PT4 και *Staphylococcus aureus* NCBF 1499, οι οποίοι προμηθεύτηκαν από την Συλλογή Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αποθηκεύτηκαν σε TSB με 20% γλυκερόλη σε θερμοκρασία -20°C . Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ελήφθησαν με τον ειδικό εργαστηριακό κρίκο και κατόπιν εμβαιπίστηκαν σε φρέσκο TSB. Μετά από 24 ώρες στους 37°C , οι μικροοργανισμοί εξαπλώθηκαν σε τρυβλία με TSA και επωάστηκαν ξανά στους 37°C για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών λήφθηκαν καθαρές αποικίες των παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιάσουν νέο TSB

και επώαστηκαν πάλι στους 37°C για 24 ώρες, ώστε οι καθαρές και ανανεωμένες καλλιέργειες να χρησιμοποιηθούν για το πείραμα.

Οι υγρές καλλιέργειες των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* και *Staphylococcus aureus* έφθασαν σε πληθυσμό περίπου 10⁹ cfu/ml. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent - 0,85% NaCl, 0.1% peptone) και οι όγκοι (2-3 ml) των βακτηριακών εναιωρημάτων από την κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιήθηκαν να επιμολύνουν το προϊόν.

2.3 Μέθοδοι αερόβιας μέτρησης αριθμού ζωντανών κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητικές τεχνικές όπου η ανάπτυξη των μικροοργανισμών γίνεται σε τεχνητά αποστειρωμένα εργαστηριακά θρεπτικά υλικά όπου έχει προστεθεί άγαρ για να στερεοποιηθούν. Βασίζονται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα, τοποθετούνται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν πεπτόνες, διάφορα εκχυλίσματα, σάκχαρα ανόργανα συστατικά κτλ, σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Η μέθοδος όμως αυτή δεν μετρά απαραίτητα τον πραγματικό συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανά γραμμάριο δείγματος, αφού τα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται μόνα τους ή σε ζευγάρια, αλυσίδες, συμπλέγματα και ομάδες. Έτσι, οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή δεν πρέπει να αναφέρονται ως μετρήσεις ζωντανών κυττάρων, αλλά ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (Colony Forming Units, cfu).

Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών ήταν οι παρακάτω:

α) Τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique): Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής τοποθετήθηκε όγκος 1 ml από το δείγμα σε τρυβλίο και στην συνέχεια έγινε μετάγγιση θρεπτικού υλικού που περιέχει άγαρ θερμοκρασίας 45°C. Η τεχνική της ενσωμάτωσης χρησιμοποιήθηκε για τα εξής θρεπτικά υλικά:

- Mann Rogosa Sharpe agar (MRS)
- Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)

β) Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique): Με τη μέθοδο αυτή, το αποστειρωμένο, τηγμένο άγαρ απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Έπειτα από την στερεοποίηση, τα τρυβλία προεπώαζονται κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η επώαση ξηραίνει την επιφάνεια του άγαρ, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μην συνενωθούν κατά το άπλωμά τους πάνω στο άγαρ. Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής

τοποθετήθηκε όγκος 0,1 ml περίπου σε κάθε τρυβλίο. Η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης χρησιμοποιήθηκε για τα εξής θρεπτικά υλικά:

- Tryptone Soy Agar (TSA)
- Rose Bengal Chloramphenicol (RBC)
- Palcam Agar
- Baird-Parker
- Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)

2.4 Μέτρηση του pH

Για την μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο, τύπου pH 730 inoLab WTW series. Από το ομογενοποιημένο δείγμα, χρησιμοποιούταν πάντα το δείγμα της πρώτης αραιώσης. Αφού πρώτα το πεχάμετρο ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό, τοποθετούταν στο δείγμα, για την πραγματοποίηση της μέτρησης. Η διαδικασία του ξεπλύματος με απιονισμένο νερό επαναλαμβανόταν και κατόπιν της μετρήσεως, για να αποφευχθεί η μεταφορά δείγματος που θα επηρέαζε το pH του επόμενου δείγματος. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν βαθμονόμηση του πεχαμέτρου, με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH.

2.5 Πειραματική διαδικασία

Εκτελέστηκαν 3 πειράματα. Το πρώτο πείραμα αφορούσε την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια 8ωρης οξύνισης. Το δεύτερο πείραμα αφορούσε τις μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), των ζυμών/μυκήτων, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των Enterobacteriaceae, καθώς επίσης και με την τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus*) κατά την αποθήκευση και συντήρηση του μαριναρισμένου γαύρου σε διάρκεια 48 ημερών. Το τρίτο και τελευταίο πείραμα ήταν διάρκειας 35 ημερών και αφορούσε την τύχη των παραπάνω παθογόνων μικροοργανισμών, των οποίων τα κύτταρα είχαν προσαρμοστεί σε pH=7 ή pH=4, κατά την αποθήκευση και συντήρηση του μαριναρισμένου γαύρου.

2.5.1 Μαρινάρισμα γαύρου

Αγοράστηκε γαύρος (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Αφού πλύθηκε καλά, αφαιρέθηκε το κεφάλι, η ουρά και το κεντρικό οστό κι

ύστερα φιλετοποιήθηκε. Παρασκευάστηκε διάλυμα 5% (v/v) οξικού οξέως με 2 % (w/v) NaCl χρησιμοποιώντας μαγειρικό ξύδι (6% v/v οξικό) και μαγειρικό αλάτι. Έπειτα τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε σκεύη με το παραπάνω μίγμα οξίνισης.

2.5.2 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια 8ωρης οξύνισης

Πριν την τοποθέτηση των ιχθύων στο ψυγείο 3 διαφορετικά σκεύη εμβολιάστηκαν με *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* με αρχικές συγκεντρώσεις περί του 10^7 cfu/g.

Κατά τη διάρκεια των 8 ωρών του μαριναρίσματος του γαύρου λήφθηκαν μετρήσεις - εκτός από την αρχική- την 1^η, 2^η, 4^η, 6^η και 8^η ώρα που ήταν και η τελική.

Κάθε φορά τοποθετούταν δείγμα 1 g από κάθε σκεύος σε σωληνάκια που περιείχαν MRD και στη συνέχεια έμπαιναν σε Vortex. Αφού πραγματοποιούταν οι κατάλληλες αραιώσεις τοποθετούταν στα τρυβλία με Palcam, XLD και Baird-Parker, αντίστοιχα. Τα τρυβλία επωάσθησαν στους 37°C για περίπου 24-48h. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και μετρηση του pH.

Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρηθεί ο ρυθμός θανάτωσης του *Listeria monocytogenes*, του *Salmonella* Enteritidis και του *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια του μαριναρίσματος.

2.5.3 Επιβίωση παθογόνων και μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου

Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του μαριναρίσματος και πριν την τοποθέτηση των ιχθύων στο ψυγείο στους 4°C έγιναν οι εμβολιασμοί με παθογόνους μικροοργανισμούς στις 3 παρτίδες ώστε η αρχική συγκέντρωση να φθάσει περί τους 10^5 cfu/g, ενώ η τέταρτη τοποθετήθηκε στο ψυγείο χωρίς να εμβολιασθεί.

Κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθηκεύσεως του γαύρου στους 4°C λήφθηκαν μετρήσεις -εκτός από την αρχική- την 3^η, 7^η, 14^η, 17^η, 21^η, 24^η, 28^η, 31^η, 37^η και 48^η ημέρα που ήταν και η τελική, στα εξής υλικά: TSA, RBC, MRS, VRBGA, Palcam και Baird-Parker. Από το υλικό XLD οι μετρήσεις -εκτός από την αρχική- έγιναν την 5^η, 12^η, 15^η, 19^η, 22^η, 26^η, 29^η, 35^η και 46^η ημέρα που ήταν και η τελική.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση του pH.

Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρηθεί η συνολική OMX στη διάρκεια των 48 ημερών με τη βοήθεια του θρεπτικού υλικού TSA, η ανάπτυξη ζυμών/μυκήτων με τη χρήση του θρεπτικού υλικού RBC, η εμφάνιση οξυγαλακτικών βακτηρίων με τη χρήση του θρεπτικού υλικού MRS και η ανάπτυξη των Enterobacteriaceae με τη βοήθεια του θρεπτικού υλικού VRBGA. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε η αντοχή των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των, με τη χρήση των θρεπτικών υλικών Palcam, XLD και Baird-Parker αντίστοιχα.

2.5.4 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=7 και pH=4 κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου

Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του μαριναρίσματος και πριν την τοποθέτηση των ιχθύων στο ψυγείο στους 4°C, έγιναν οι εμβολιασμοί με *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus*. Η διαφορά του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ότι χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα παθογόνων μικροοργανισμών προσαρμοσμένα σε ουδέτερο pH=7 (μάρτυρας) και σε όξινο περιβάλλον με pH=4 (προσαρμοσμένα κύτταρα-adapted cells). Από τα 6 σκεύη με μαριναρισμένο γαύρο που παρασκευάστηκαν τα δύο εμβολιάστηκαν με *Listeria monocytogenes* pH=7 και pH=4 αντιστοίχως, άλλα δύο εμβολιάστηκαν με *Salmonella* Enteritidis και τέλος τα υπόλοιπα δύο με *Staphylococcus aureus*.

Πριν τον εμβολιασμό των ιχθύων με τους κατάλληλους παθογόνους μικροοργανισμούς έπρεπε να πραγματοποιηθεί η προσαρμογή των κυττάρων στο όξινο pH. Από ανανεωμένες καλλιέργειες παθογόνων, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση για περίπου 15 λεπτά στις 4000 στροφές, ώστε τα ληφθούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών. Έπειτα επανα-αιωρήθηκαν σε MRD και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα TSB χωρίς γλυκόζη ώστε να προσαρμοστούν στα pH=7 ή pH=4. Κατόπιν τοποθετήθηκαν στους 37°C για περίπου 90 λεπτά. Εν συνεχεία επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρισης για να ληφθούν τα κύτταρα. Τέλος επανα-αιωρήθηκαν σε MRD και εμβολιάστηκαν στα οξυνισμένα ψάρια, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω σε αρχικού πληθυσμούς της τάξης των 5 log cfu/g περίπου.

Κατά τη διάρκεια των 35 ημερών αποθηκεύσεως του γαύρου στους 4°C λήφθηκαν μετρήσεις -εκτός από την αρχική- την 8^η,14^η,20^η,28^η και 35^η ημέρα που ήταν και η τελική. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση του pH.

Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να παρατηρηθεί η αντοχή των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* και *Staphylococcus aureus* των οποίων τα κύτταρα έχουν προσαρμοστεί σε pH=7 και pH=4, σε οξυνισμένο περιβάλλον κατά την διάρκεια 35 ημερών αποθήκευσης των σ'αυτό.

2.6 Υπολογισμός ρυθμού θανάτωσης

Στις μετρήσεις των παθογόνων μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ο τύπος $D = -1/a$, επειδή η γραμμική συνάρτηση είναι $y = ax + \beta$. Από τον συγκεκριμένο τύπο προσδιορίζεται ο ρυθμός θανάτωσης του κάθε παθογόνου στο εκάστοτε πείραμα.

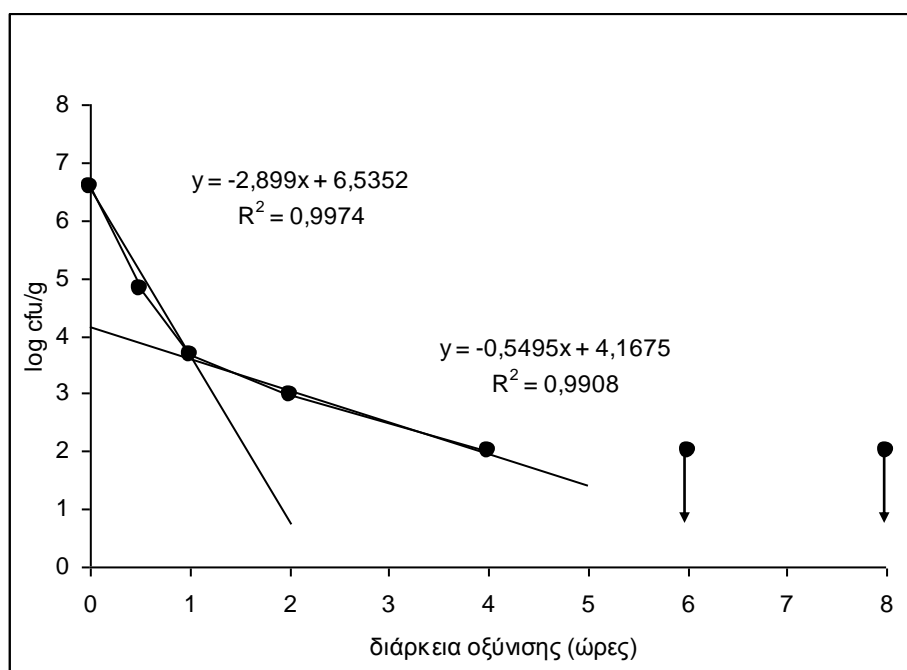
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια θωρης οξίνισης

Οι μεταβολές του πληθυσμού των παθογόνων *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* κατά την διάρκεια της θωρης οξίνισης παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1.1, 1.2 και 1.3. αντίστοιχα.

3.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Για το *Salmonella* Enteritidis παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός μειώθηκε από την αρχική συγκέντρωση των 6.5 log cfu/g, κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g εντός 6 ωρών (Διάγραμμα 1.1).



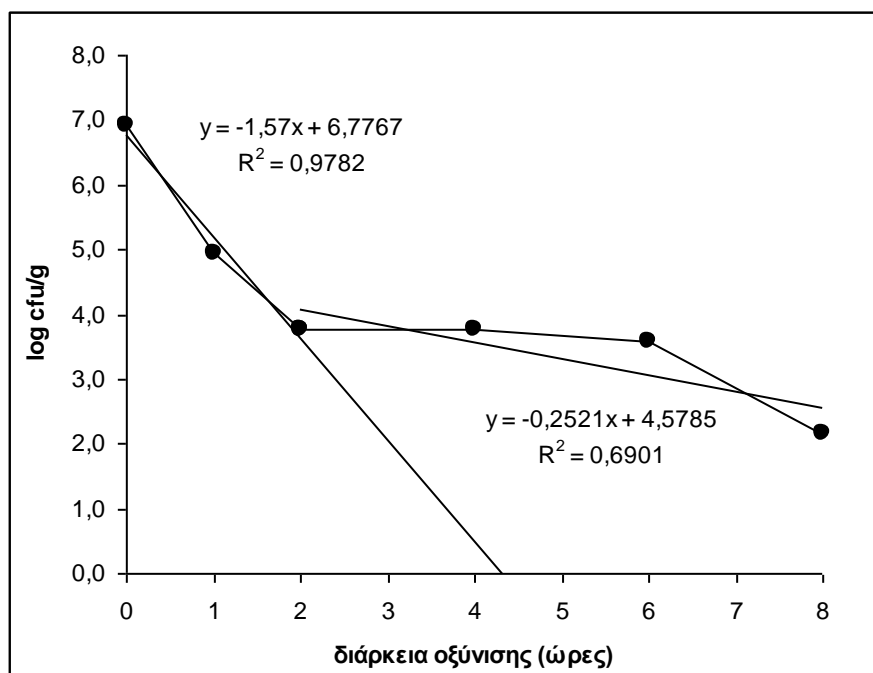
Διάγραμμα 1.1. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis κατά τη διάρκεια θωρης οξίνισης του γάουρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Βλέπουμε ότι ο πληθυσμός του *Salmonella* Enteritidis αρχικά (την 1^η ώρα) μειώθηκε απότομα (D=0,35 ώρες) από τον αρχικό πληθυσμό των 5×10^6 κάτω από 10^4 cfu/g.

Ακολούθως ο ρυθμός μείωσης ήταν μικρότερος ($D=1,82$ ώρες) και ο πληθυσμός μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης τις επόμενες 5 ώρες.

3.1.2 *Listeria monocytogenes*

Για το *Listeria monocytogenes* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού του τις δύο πρώτες ώρες περίπου στα 3,8 log cfu/g, ενώ κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g βρέθηκε μετά το πέρας του 8ώρου (Διάγραμμα 1.2).



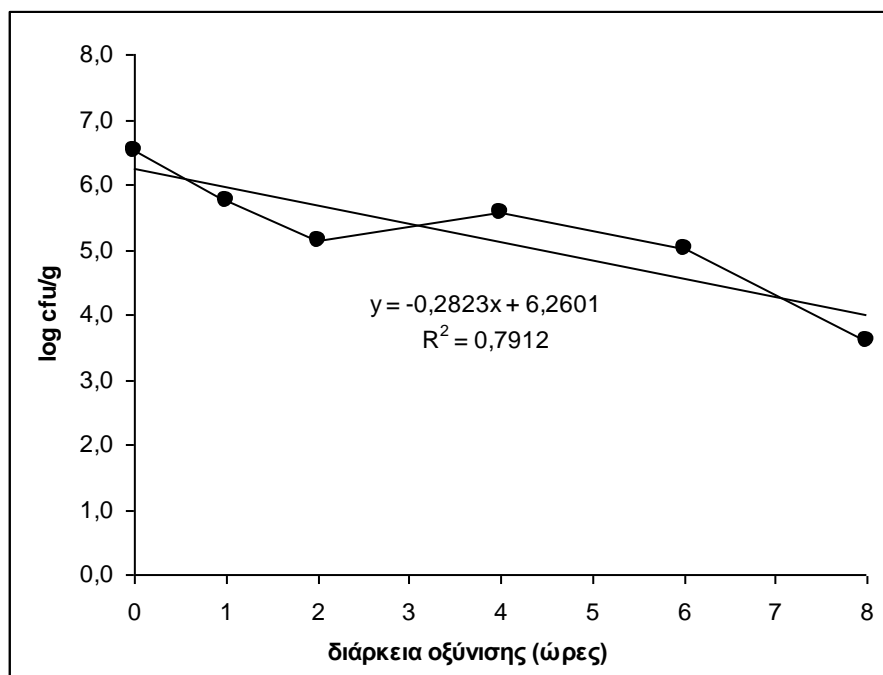
Διάγραμμα 1.2. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια 8ωρης οξίνισης του γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.

Βλέπουμε ότι ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* αρχικά μειώθηκε απότομα ($D=0,64$ ώρες) και κατόπιν ο ρυθμός μείωσης ήταν σαφώς μικρότερος ($D=3,97$ ώρες).

3.1.3 *Staphylococcus aureus*

Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *Staphylococcus aureus* έχει μια μικρή πτώση τις 2 πρώτες ώρες στα 5,1 log cfu/g, αλλά παραμένει σχεδόν σταθερός μέχρι το 6ωρο. Στο

τέλος του μαριναρίσματος (από την 6^η έως την 8^η ώρα) ο πληθυσμός ξανα-μειώνεται, και φθάνει περί τα 3,5 log cfu/g (Διάγραμμα 1.3).



Διάγραμμα 1.3. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια 8ωρης οξίνισης του γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης.

Από τον τύπο $D=-1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει μέση μείωση κατά 90% του πληθυσμού του *Staphylococcus aureus* ανά 3,5 ώρες.

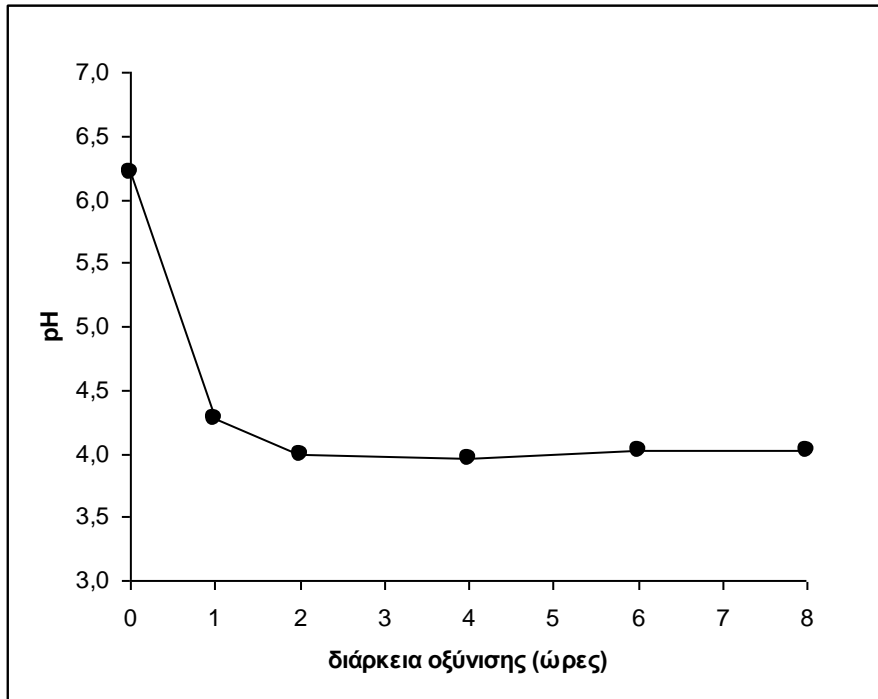
3.1.4 Συγκριτικά οι 3 παθογόνοι μικροοργανισμοί

Παρατηρήθηκε ότι τις 2 πρώτες ώρες το *Salmonella Enteritidis* έχει τον μεγαλύτερο ρυθμό θανάτωσης, όπως και ως την 4^η ώρα, ενώ *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* διατηρούνται σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Έως την 6^η ώρα ο πληθυσμός του *Salmonella Enteritidis* έχει σταθεροποιηθεί ενώ αρχίζει μεγάλη πτώση για το *Listeria monocytogenes* και κάπως μικρότερη πτώση για το *Staphylococcus aureus*. Τελικά με το πέρας του δώρου και την λήξη του πειράματος παρατηρήθηκε ότι το *Staphylococcus aureus* έμεινε με τον μεγαλύτερο πληθυσμό, ενώ *Salmonella Enteritidis* και *Listeria monocytogenes* είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Γενικά αποδείχθηκε ότι η σειρά αντοχής στην οξίνιση είναι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και τέλος *Salmonella Enteritidis*.

3.1.5 Μεταβολή του pH

Παρατηρήθηκε ότι το pH μειώνεται δραματικά την 1^η ώρα κι από εκεί και έπειτα αποκτά σταθερή τιμή κοντά στο 4 (Διάγραμμα 1.4).



Διάγραμμα 1.4. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια 8ωρης οξίνισης του γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης.

Το αρχικό pH στη σάρκα των ψαριών είναι ελαφρά όξινο (6.2). Κατά τη διάρκεια του μαριναρίσματος το pH πέφτει κι αυτό οφείλεται στο οξικό οξύ.

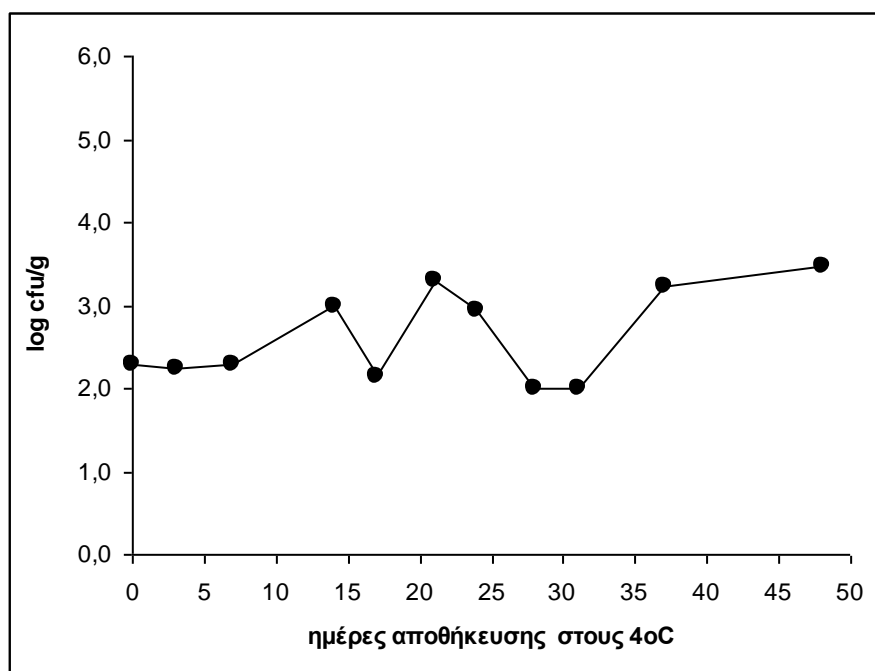
3.2 Επιβίωση παθογόνων και μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου.

Οι μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), των ζυμών και των μυκήτων, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των Enterobacteriaceae κατά τη διάρκεια της 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2.1.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται στα διαγράμματα 2.2 ,2.3 και 2.4 οι μεταβολές του πληθυσμού των παθογόνων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* και *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια της 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου.

3.2.1 Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX)

Με τη χρήση του TSA μετρήθηκε η OMX κατά τη διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε αύξηση των βακτηρίων την 14^η ημέρα που έφτασε περίπου στα 3 log cfu/g. Στα ίδια επίπεδα κυμάνθηκε και τις επόμενες μέρες εκτός κάποιων αυξομειώσεων που είχε. Την 37^η ημέρα άρχισε να σταθεροποιείται πάνω από τα 3 log cfu/g, περίπου στα 3,3 log cfu/g, ενώ την τελευταία μέρα του πειράματος πήρε την μέγιστη τιμή του, λίγο κάτω των 3,5 log cfu/g (Διάγραμμα 2.1).



Διάγραμμα 2.1. Μεταβολή της OMX κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης.

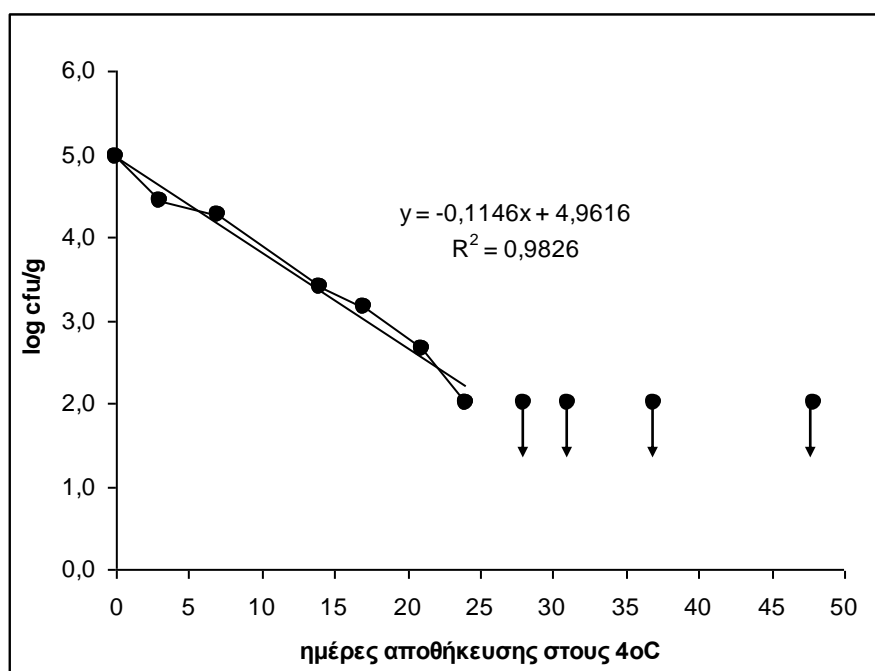
3.2.2 Ζύμες και μύκητες, γαλακτικά βακτήρια και Enterobacteriaceae

Παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και συντήρησης του μαριναρισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 4°C, δεν βρέθηκε πληθυσμός

ζυμών/μυκήτων, οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά ούτε και βακτηριδίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (τα λεγόμενα και ως εντεροβακτήρια) σε πληθυσμούς πάνω από το επίπεδο ανίχνευσης των 100, 10 και 10 cfu/g αντίστοιχα.

3.2.3 *Listeria monocytogenes*

Την 1^η εβδομάδα παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* φτάνοντας τα 4,3 log cfu/g, ενώ εν συνεχεία υπήρξε απότομη μείωση και στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας ο πληθυσμός ήταν 3,4 log cfu/g. Κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g έπεσε την 24^η ημέρα και διατηρήθηκε εκεί έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 2.2).

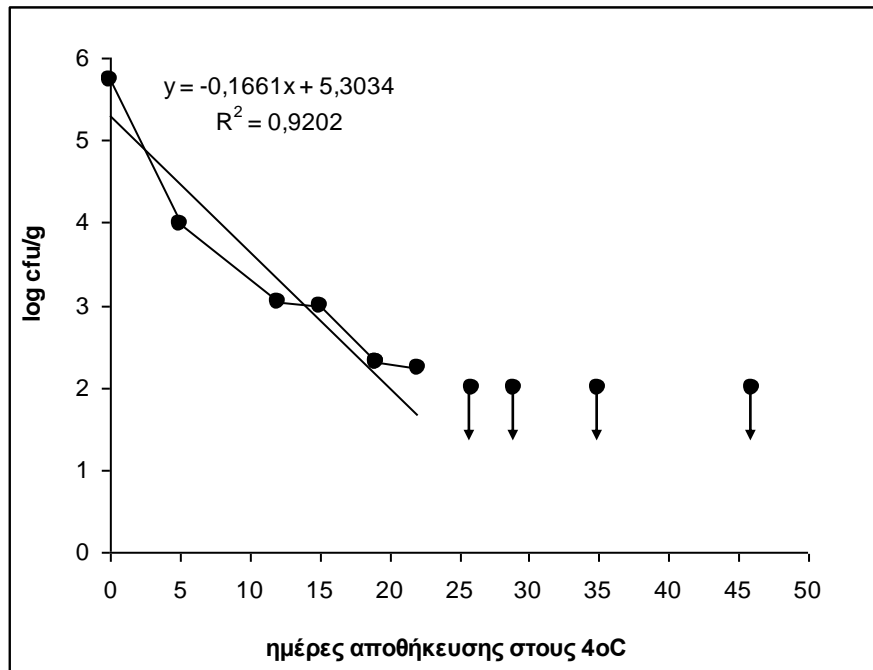


Διάγραμμα 2.2. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Από τον τύπο $D = -1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* σε 8,7 ημέρες.

3.2.4 *Salmonella* Enteritidis

Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του πληθυσμού κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθύων στους 4°C. Μεγάλες πτώσεις του πληθυσμού την 5^η, 12^η και 19^η ημέρα, ενώ κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης έπεσε την 25^η ημέρα και διατηρήθηκε εκεί έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 2.3).



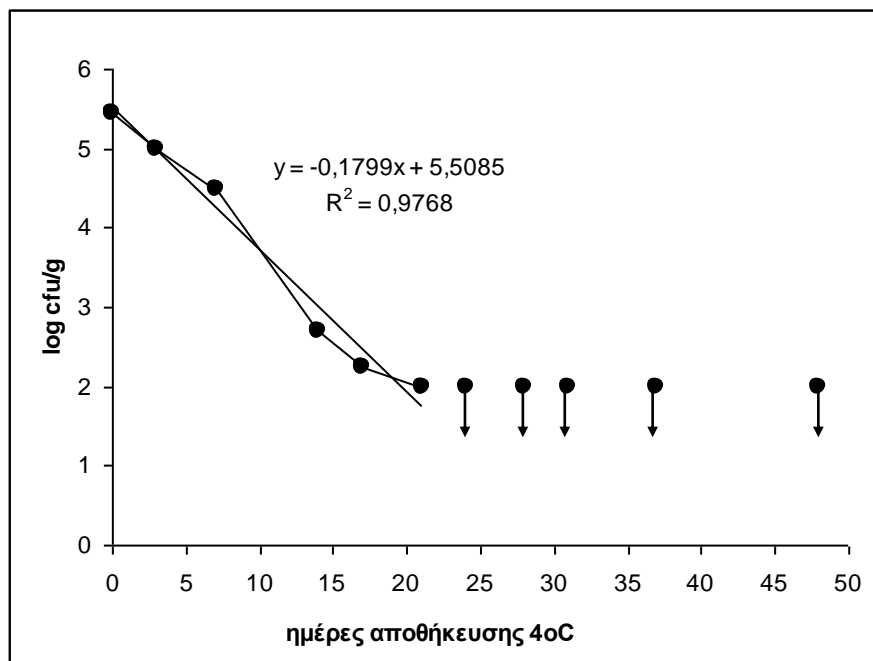
Διάγραμμα 2.3. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Από τον τύπο $D = -1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Salmonella* Enteritidis σε 6 ημέρες.

3.2.5 *Staphylococcus aureus*

Παρατηρείται σταδιακή πτώση του *Staphylococcus aureus* τις πρώτες ημέρες της αποθήκευσης και απότομη μείωση του πληθυσμού μετά το πέρας της 2^{ης} εβδομάδας (14^η ημέρα). Ο πληθυσμός μειώνεται στα 2,7 log cfu/g, ενώ κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης

των 2 log cfu/g καταγράφηκε την 21^η ημέρα και διατηρήθηκε εκεί έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 2.4).

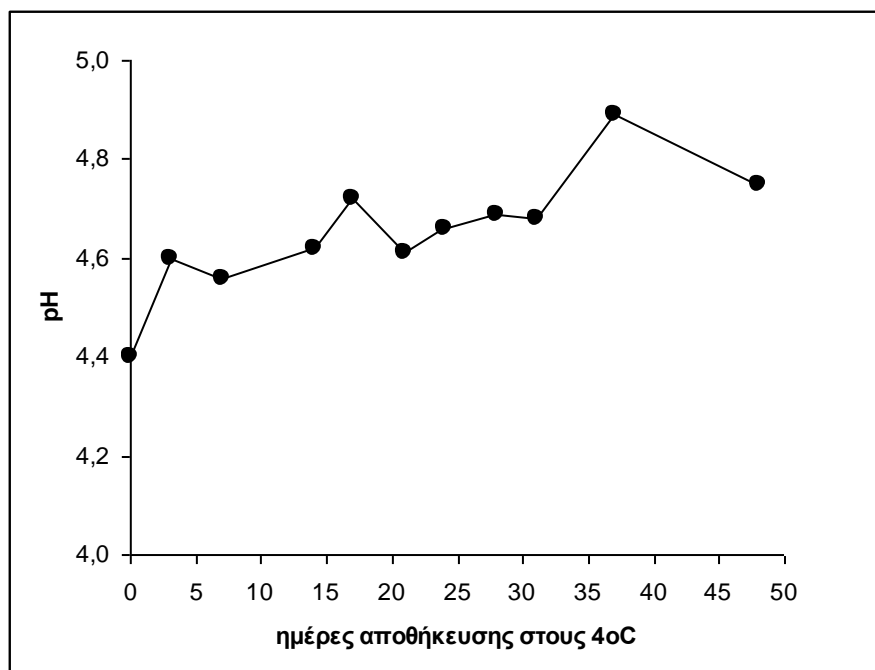


Διάγραμμα 2.4. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Από τον τύπο $D = -1/a$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Staphylococcus aureus* σε 5,6 ημέρες.

3.2.6 Μεταβολή του pH

Παρατηρήθηκε αύξηση του pH την 3^η ημέρα κι από εκεί κι έπειτα άρχισε ν'αποκτά μια σταθερότητα κοντά στο 4,6 με 4,7. Η μέγιστη τιμή του ήταν την 37^η ημέρα κοντά στο 4,9 κι ύστερα επανήλθε στα επίπεδα του 4,7 (Διάγραμμα 2.4).



Διάγραμμα 2.4. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια των 48 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης.

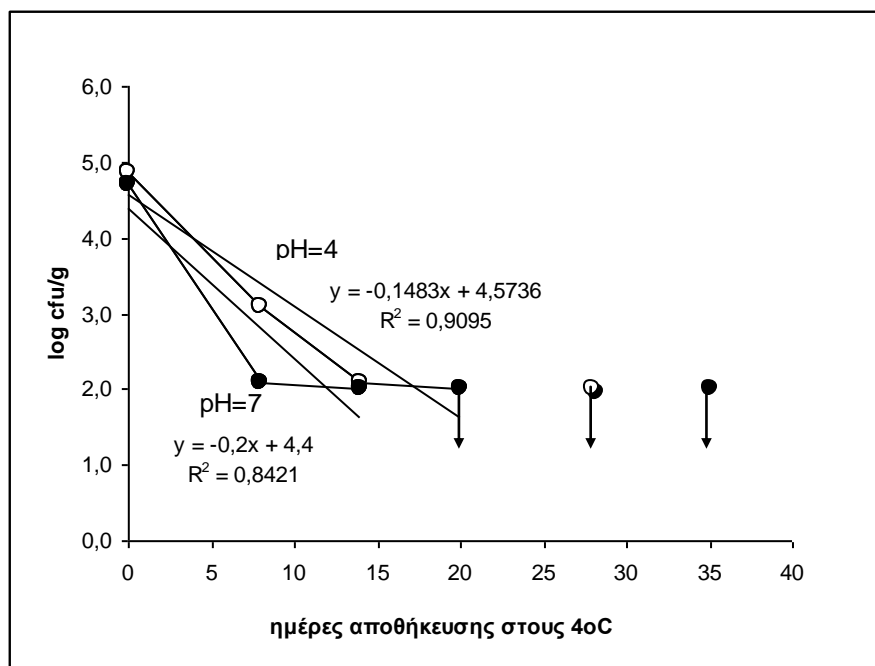
3.3 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=7 και pH=4 κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου

Οι μεταβολές του πληθυσμού των παθογόνων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus*, των οποίων τα κύτταρα προσαρμόστηκαν σε ουδέτερο pH=7 και σε όξινο pH=4 (acid adapted cells), κατά τη διάρκεια της 35 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3 αντίστοιχα.

3.3.1 *Listeria monocytogenes*

Για pH=7: Τα προσαρμοσμένα σε ουδέτερο pH κύτταρα του *Listeria monocytogenes* είναι εμφανές ότι δεν ήταν ανθεκτικά στο όξινο περιβάλλον του μαριναρισμένου γαύρου, αφού υπήρξε απότομη μείωση του πληθυσμού εντός 8 ημερών, ενώ εντός 14 ημερών ο πληθυσμός του έπεσε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Για pH=4: Παρατηρήθηκε ότι τα προσαρμοσμένα σε όξινο pH κύτταρα του *Listeria monocytogenes* ήταν ελάχιστα πιο ανθεκτικά στην επίδραση του χαμηλού pH, απ'αυτά που ήταν προσαρμοσμένα σε ουδέτερο. Ο πληθυσμός του μειώνεται αρκετά τις 2 πρώτες εβδομάδες και πέφτει κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g εντός 20 ημερών.



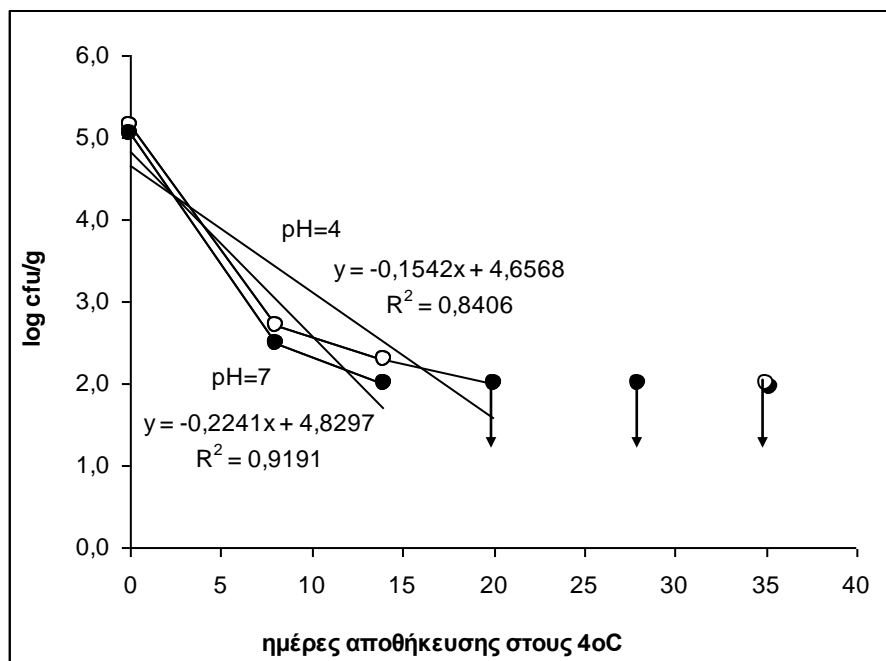
Διάγραμμα 3.1. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* προσαρμοσμένο σε pH=7 και pH=4 κατά τη διάρκεια των 35 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Από τον τύπο $D = -1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* του οποίου τα κύτταρα είναι προσαρμοσμένα σε pH=7 σε 5 ημέρες και σε 6,7 ημέρες, σε μια εβδομάδα περίπου, του *Listeria monocytogenes* με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=4.

3.3.2 *Salmonella* Enteritidis

Για pH=7: Παρατηρήθηκε απότομη μείωση του πληθυσμού του *Salmonella* Enteritidis με κύτταρα προσαρμοσμένα σε ουδέτερο pH στα 2,15 log cfu/g την 8^η ημέρα, ενώ εντός 14 ημερών ο πληθυσμός του μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Για pH=4: Απότομη μείωση του πληθυσμού καταγράφηκε και στα προσαρμοσμένα σε όξινο pH κύτταρα του *Salmonella* Enteritidis. Η πτώση του ήταν κατακόρυφη με τον πληθυσμό του να μειώνεται στα 2,4 log cfu/g την 8^η ημέρα και να πέφτει κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g εντός 14 ημερών.



Διάγραμμα 3.2. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis προσαρμοσμένο σε pH=7 και pH=4 κατά τη διάρκεια των 35 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Από τον τύπο $D=-1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Salmonella* Enteritidis του οποίου τα κύτταρα είναι προσαρμοσμένα σε pH=7 σε 4,5 ημέρες και σε 6,5 ημέρες του *Salmonella* Enteritidis με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=4.

3.3.3 *Staphylococcus aureus*

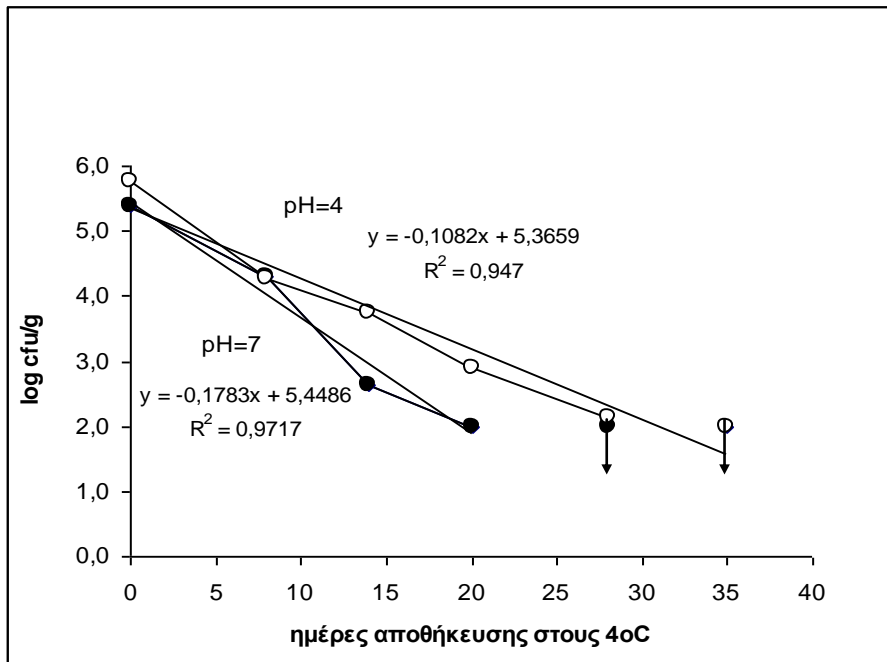
Για pH=7: Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *Staphylococcus aureus* του οποίου τα κύτταρα ήταν προσαρμοσμένα σε ουδέτερο pH, μειώθηκε σταδιακά καταγράφοντας τις τιμές των 4,3 log cfu/g την 8^η ημέρα και των 2,6 log cfu/g περίπου, με την συμπλήρωση δύο εβδομάδων. Εντός 20 ημερών ο πληθυσμός του έπεσε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

Για pH=4: Στα προσαρμοσμένα σε όξινο pH κύτταρα του *Staphylococcus aureus* παρατηρήθηκε σταδιακή θανάτωση του πληθυσμού του. Καταγράφηκαν οι τιμές των 4,3 log cfu/g την 8^η ημέρα και των 3,75 log cfu/g με την συμπλήρωση δύο εβδομάδων. Ο πληθυσμός του έπεσε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g, εντός 35 ημερών. Τα προσαρμοσμένα σε pH=4 κύτταρα του *Staphylococcus aureus* αποδείχθηκαν πιο ανθεκτικά στο όξινο περιβάλλον.

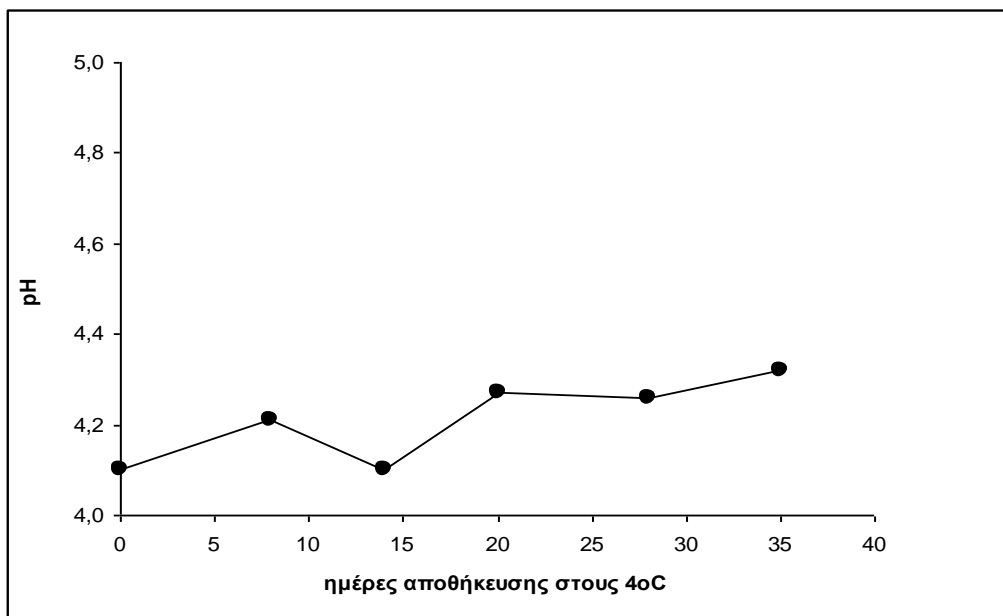
Από τον τύπο $D=-1/\alpha$ βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Staphylococcus aureus* του οποίου τα κύτταρα είναι προσαρμοσμένα σε pH=7 σε 5,6 ημέρες και σε 9,2 ημέρες του *Staphylococcus aureus* με προσαρμοσμένα κύτταρα σε pH=4.

3.3.4 Μεταβολή του pH

Μικρές αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν στο pH, το οποίο σε γενικές γραμμές κυμάνθηκε από 4,1 έως 4,3. Η ελάχιστη τιμή του ήταν στο 4,1 (στην αρχική μέτρηση και την 14^η ημέρα) ενώ η μέγιστη του τιμή καταγράφηκε στην τελευταία μέτρηση την 35^η ημέρα (4,32) (Διάγραμμα 3.4).



Διάγραμμα 3.3. Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* προσαρμοσμένο σε pH=7 και pH=4 κατά τη διάρκεια των 35 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Το βέλος (↓) υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g.



Διάγραμμα 3.4. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια των 35 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συντήρηση με οξίνιση είναι ένας τρόπος συντήρησης που βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Τα ασθενή οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους όπως το οξικό, το κιτρικό, το βενζοϊκό και το προπιονικό οξύ, περιλαμβάνονται μεταξύ των κυριότερων χημικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη συντήρηση των τροφίμων, λόγω της διαλυτότητας τους, της χαμηλής τους τοξικότητας και της γεύσης τους (Μποζιάρης 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι τα ασθενή οργανικά οξέα είναι πιο αποτελεσματικά σε όξινο, παρά σε ουδέτερο περιβάλλον, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα οξέα αυτά είναι δραστικά έναντι των μικροοργανισμών κυρίως στην αδιάστατη μορφή τους καθώς έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών και να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων (Gould 1989).

Η οξίνιση ή οξέωση πραγματοποιείται συνήθως με ξύδι, το οποίο περιέχει 5-6% οξικό οξύ (Μποζιάρης 2009). Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρειάστηκαν να αγοραστούν δύο παρτίδες ιχθύων, των οποίων η αγορά τους έγινε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Στην πρώτη παρτίδα η αρχική τιμή ολικού μικροβιακού πληθυσμού μετρήθηκε στα 4 log cfu/g, ενώ στη δεύτερη παρτίδα υπολογίστηκε στα 4,5 log cfu/g. Πιθανόν και οι δύο παρτίδες να είχαν αλιευθεί μια ή δύο ημέρες πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Ωστόσο η τοποθέτηση τους σε όξινο περιβάλλον με 5% οξικό οξύ και 2% NaCl, δημιούργησε αντίξοες συνθήκες για την επιβίωση αυτών των μικροοργανισμών.

Η αρχική τιμή του pH βρέθηκε 6,2. Στη μεταθανάτια περίοδο η αποσύνθεση των αζωτούχων ενώσεων οδηγούν σε αύξηση του pH (Shenderyuk & Bykowski, 1989). Η αύξηση του pH δείχνει την απώλεια ποιότητας. Σε παρόμοιο πείραμα από τους Gökoglu et al. (2002), μετρήθηκε σχεδόν ίσο pH με 6,3. Σε διάστημα 30 ημερών το pH μειώθηκε στο 4,65, ενώ στην ίδια έρευνα στο δείγμα με 2% οξικό οξύ μειώθηκε στο 4,5 και στο δείγμα με 4% οξικό οξύ στο 4,2. Οι Poligne και Collignan (2000) διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα του pH του γαύρου εντός άλμης με οξικό οξύ αυξήθηκαν από 3,9 σε 4,21 σε διάρκεια 20 ημερών από την αποθήκευση και έπειτα παρέμεινε σταθερό μέχρι το πέρας της αποθήκευσης. Επίσης οι Aksu et al. (1997) ανέφεραν ότι το pH σε μαριναρισμένο γαύρο με 2% και 4% οξικό οξύ, αποθηκευμένο στους 4°C, αυξήθηκε από 4,25 και 4,18

σε 4,53 και 4,31 αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι το pH ήταν μεγαλύτερο στα δείγματα με 2% οξικό οξύ (Gökoglu et al. 2002).

Η αρχική μικροβιακή χλωρίδα, όπως προαναφέρθηκε ήταν στα 4 log cfu/g στο πρώτο πείραμα. Ακολούθησε η διαδικασία του μαριναρίσματος και η μικροβιακή χλωρίδα που μετρήθηκε στο TSA μετά το πέρας του μαριναρίσματος συρρικνώθηκε στα 2,3 log cfu/g. Σημαντικός λόγος είναι το stress που δημιουργήθηκε λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού που συνάντησαν στο νέο περιβάλλον. Οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες/μύκητες και εντεροβακτήρια εβρέθησαν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σε αντίστοιχη έρευνα οι Kilinc and Cakli (2004) δημιούργησαν ένα παστεριωμένο κι ένα μη παστεριωμένο δείγμα μαριναρισμένης σαρδέλας με χυμό ντομάτας. Σε κανένα δείγμα δεν βρέθηκαν ζύμες/μύκητες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τους, ενώ στο μη παστεριωμένο δείγμα ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυξήθηκαν από 1,83 και 1,30 σε 6,36 και 5,66 log cfu/g αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αντιθέτως στο παστεριωμένο δείγμα τόσο ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός όσο και τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρέμειναν κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια δεν θανατώθηκαν πλήρως στο μαρινάρισμα και ότι στο μη παστεριωμένο δείγμα ήταν ακόμη σε θέση να συνεχίσουν τη δραστηριότητα τους, είτε με ταχύτερους είτε με αργότερους ρυθμούς, ανάλογα με την ικανότητα τους να προσαρμοστούν στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Fuselli et al. 1994).

Ο εμβολιασμός του γαύρου με *Listeria monocytogenes* πραγματοποιήθηκε στο τρίτο πείραμα σε δύο διαφορετικές καταστάσεις. Στην πρώτη τα κύτταρα του παραπάνω παθογόνου μικροοργανισμού είχαν προσαρμοστεί σε συνθήκες pH=4 και στη δεύτερη ήταν προσαρμοσμένα σε συνθήκες με pH=7. Ο αρχικός πληθυσμός που προέκυψε ήταν 4,9 log cfu/g και 4,5 log cfu/g, αντίστοιχα. Λόγω του όξινου περιβάλλοντος που είχε δημιουργηθεί, η πτώση και στις δύο περιπτώσεις ήταν απότομη και σε διάστημα 8 ημερών το *Listeria monocytogenes* με τα προσαρμοσμένα σε pH=7 κύτταρα, βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, τη στιγμή που τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε όξινο περιβάλλον ήταν στην τιμή των 2,15 log cfu/g. Τα συγκεκριμένα μετρήθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά το πέρας 2 εβδομάδων. Σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Koutsoumanis and Sofos (2003) τοποθέτησαν δείγματα από *Listeria monocytogenes* που λήφθηκαν από χοιρινό λουκάνικο και άλλα είδη κρέατος σε TSB με 6% εκχύλισμα μαγιάς και 20% γλυκερόλη, αφού πρώτα είχαν προσαρμόσει τα κύτταρα της σε pH=4, pH=4,5, pH=5, pH=5,5 και pH=6. Τα τοποθέτησαν στους 30°C για 24 ώρες. Κατόπιν αυτά τα δείγματα τα τοποθέτησαν σε 10 ml TSB χωρίς δεξτρόζη σε pH=3,5 και ο αρχικός

πληθυσμός τους ήταν περίπου 10^7 cfu/ml. Έχει αναφερθεί ότι το *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει αυξημένη αντοχή στο οξύ, μετά την προσαρμογή του σε pH=5 και pH=5,5, σε σχέση με άλλες τιμές της κλίμακας pH (Gahan et al. 1996, Lou and Yousef 1997, Phan-Thanh et al. 2000). Επίσης το *Listeria monocytogenes* δεν είναι ιδιαίτερα οξυανεκτικό και δεν μπορεί να αναπτυχθεί σ'ένα pH κάτω από 4,5 με 4,6 (McClure et al. 1989). Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη αφού η μεγαλύτερη αντοχή του σε οξύ ήταν σε pH=5,5. Στο συγκεκριμένο pH επιβίωσε περίπου το 1% του αρχικού πληθυσμού, σε pH=5 επιβίωσε το 0,5% περίπου, ενώ παράλληλα στα υπόλοιπα δείγματα τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων του *Listeria monocytogenes* ήταν ακετά κάτω της τάξεως του 0,1%. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι συνθήκες χαμηλού pH μπορεί να μην επιτρέψουν την ενεργοποίηση των φυσιολογικών μηχανισμών που προστατεύουν το παθογόνο από την ανάπτυξη θανατηφόρων όξινων συνθηκών, όπως η παραγωγή των πρωτεϊνών ASP ή αλλαγές στα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης (Foster 1991, Brown et al. 1997, Kwon and Rieke 1998, Phan-Thanh et al. 2000).

Διαδεδομένη επιμόλυνση των τροφίμων είναι και η μόλυνση από Σαλμονέλλα. Με τις κατάλληλες ενέργειες που αναφέρθηκαν παραπάνω ολοκληρώθηκε η προσαρμογή των κυττάρων του *Salmonella* Enteritidis σε συνθήκες pH=4 και pH=7. Ο αρχικός πληθυσμός τους ήταν 5,2 και 5,1 log cfu/g, αντίστοιχα. Το οξυνισμένο περιβάλλον σαφώς και δεν βοήθησε στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αλλά και σε βοήθεια με την χαμηλή θερμοκρασία των 4°C, ο πληθυσμός τους μειώθηκε το πρώτο δήμερο σε 2,4 και 2,15 log cfu/g, αντίστοιχα, ενώ η πτώση ήταν σταδιακή και στη συνέχεια, πέφτοντας κάτω από το όριο ανίχνευσης σε διάστημα 14 ημερών και στις δύο περιπτώσεις. Στην έρευνα που παρατέθηκε παραπάνω από τους Koutsoumanis and Sofos (2003), μαζί με το *Listeria monocytogenes* ερευνήθηκε και η πορεία του *Salmonella* Typhimurium με προσαρμοσμένα κύτταρα στις ίδιες τιμές pH που προαναφέρθησαν. Τα δείγματα του λήφθηκαν από βοδινό κρέας και από πληγή αλόγου. Κατόπιν διενεργήθησαν τα ίδια βήματα που πραγματοποιήθηκαν και για το *Listeria monocytogenes*. Τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν σε pH 4 έως 5, έδειξαν αυξημένη αντίσταση στο οξύ σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε pH 5,5 και 6. Οι Lee et al. (1995) είχαν αναφέρει σε παρόμοια έρευνα ότι το *Salmonella* Typhimurium παρουσιάζει μεγαλύτερη οξυαντοχή, όταν τα κύτταρα του είναι προσαρμοσμένα σε pH=4,3, επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω έρευνες. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του pH που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη οξυαντοχή τα δύο παθογόνα είναι διαφορετικές (5,5 για *L. monocytogenes*, 4,5 για *S.*

Typhimurium), όπως διαφορετικές είναι και οι περιοχές του pH (5-6 για *L. monocytogenes*, 4-5 για *S. Typhimurium*). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τις πιθανές διαφορές στα σημεία που ενεργοποιούνται οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που προστατεύουν τα παθογόνα από το οξύ (Bearson et al. 1997, Foster 1999, Merrell and Camilli 2002).

Στη διαδικασία του θωρου μαριναρίσματος η αντοχή του *Staphylococcus aureus* σε όξινο περιβάλλον αποδείχθηκε μεγαλύτερη των *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteritidis*. Ο αρχικός πληθυσμός του ήταν 6,5 log cfu/g, έναντι 6,9 και 6,6 log cfu/g, αντίστοιχα. Είχε μικρή και σταθερή πτώση ανά τον χρόνο οξύνισης, γεγονός που με το πέρασ της, ο πληθυσμός του μειώθηκε σε 3,6 log cfu/g, τη στιγμή που ο πληθυσμός των *L. monocytogenes* και *S. Enteritidis* έπεσαν στα 2,15 log cfu/g και κάτω από το όριο ανίχνευσης, αντίστοιχα. Ανάλογα με το προϊόν το *Staphylococcus aureus* μπορεί να αυξηθεί σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας νερού (a_w) της τάξεως του 0,83 με 0,84. Επιπροσθέτως, για να προκληθεί κρούσμα τροφικής δηλητηρίασης, ο πληθυσμός του πρέπει να πολλαπλασιαστεί στα 10^7 cfu/g και άνω (Tatini et al. 1973). Σε παρόμοια έρευνα οι Naidoo and Lindsay (2009), χρησιμοποίησαν για μαρινάρισμα βοδινό κρέας και το εμβολιάσαν με *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus pasteurii*. Έπειτα τοποθέτησαν τα δείγματα στους 25°C για 96 ώρες και λάμβαναν μετρήσεις ανα 12 ώρες. Η αντοχή των κυττάρων των *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus pasteurii* αποδείχθηκε μεγαλύτερη απ' αυτή του *Listeria monocytogenes*, καθώς ο πληθυσμός που επέζησε ήταν περίπου στα 3 log cfu/g, όταν ο αντίστοιχος πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οξίνιση του γάβρου (*Engraulis encrasicolus*) δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* δεν μπορούν να αναπτυχθούν και ο πληθυσμός τους μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου. Κατά την διεργασία της οξίνισης (μαρινάρισμα) οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αδρανοποιούνται ωστόσο με διαφορετικούς ρυθμούς με το *Staphylococcus aureus* να αποδεικνύεται πιο οξυάντοχο. Επιπλέον, δείχθηκε η σημασία του pH, καθώς τα προσαρμοσμένα βακτηριακά κύτταρα σε όξινο pH (pH=4) αδρανοποιήθηκαν με αργότερους ρυθμούς από τα μη-προσαρμοσμένα κύτταρα, σε καθένα από τους παραπάνω παθογόνους μικροοργανισμούς.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Aksu H., Erkan N., Çolak H., Varlık C., Gökoglu N., Uğur M.** (1997). Some changes in anchovy marinades during production in different acid-salt concentrations and determination of shelf life. *Yüzüncüyul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(1–2), p 86–90.
- **Bearson S., Bearson B., Foster J.W.** (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147:173–180.
- **Brown J.L., Ross T., McMeekin T.A., Nichols, P.D.** (1997). Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 37:163–173.
- **Burt J.R.** (1988). Dried and smoked fishery products. In J.R. Burt (Ed.), *Fish Smoking and Drying, The Effect of Smoking and Drying on the Nutritional Properties of Fish*. Elsevier Applied Science, London and New York, p. 121-159.
- **Christner B.C., Morris C.E., Foreman C.M., Cai R., Sands D.C.** (2008). "Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall". *Science* 319 (5867): 1214.
- **Curry A.S., Joyce G.G., McEwen Jr. G.N.** (1993). *CTFA Microbiology guidelines. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance. Association, Inc. Washington, D.C*
- **Davies A., Cristopher C., Jehanno D., Nychas G., Kirby R.** (2001). Incidence of foodborne pathogens on European. *Food Control* 12:67-71
- **Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM).** (2007). *The European Pharmacopoeia, Amended Chapters 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4, Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France.*
- **Domingo L. J.** (2007). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold? *Environment International*, 33:993–998.
- **Enfert C., Hube B.** (2007). *Candida: Comparative and Functional Genomics*. Caister Academic Press.
- **Feldhusen F.** (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 2000, p 1651–1660.

- **Fisher B., Harvey R.P., Champe P.C.** (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology (Lippincott's Illustrated Reviews Series)*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins., p 332–353.
- **Foster J.W.** (1991). Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology* 173:6896–6902.
- **Foster J.W.** (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology* 2, p 170–174.
- **Frimodt C.** (1995). Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. Pp 215.
- **Fuselli S. R., Casales M. R., Fritz R., Yeannes M. I.** (1994). Microbiology of the marination process used in anchovy (*Encraulis anchoita*) Production. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 27:214–218.
- **Gahan C.G.M., O'Driscoll B., Hill C.** (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3128–3132.
- **Garcia A., Palomera, I.** (1996). Anchovy early life history and its relation to its surrounding environment in the Western Mediterranean basin, *Scientia Marina* 60 (Suppl. 2):155-166
- **Gökoğlu N., Cengiz E., Yerlikaya P.** (2002). Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4°C. *Food Control*, Volume 15, 2004, p 1-4.
- **Gould G.W. ed.** (1989). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Science Publishers, UK.
- **Hayes P.R.,** (1985). *Food Microbiology and hygiene*. Elsevier, London, p 80-139.
- **Horner W.F.A.** (1992). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In G.M. Hall (Ed.), *Fish Processing Technology (1st Ed.)* Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, p 31-71
- **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 p 32-73.
- **Huis in't Veld** (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier Science B.V., 33(1996), p 1-18.

- **Japanese Pharmacopoeia.** (2007). Society of Japanese Pharmacopoeia. Amended Chapters 35.1, 35.2, 7. The Minister of Health, Labor, and Welfare.
- **Jarvis B.** (1973). Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food. *J. Appl. Bacteriol.* 36:723-727.
- **Karst M.J.** (2005). Salmonella. *The encyclopedia of toxicology*, volume 4, p 764-765.
- **Kilinc B., Cakli S.** (2004). Determination of the shelf life of sardine (*Sardina pilchardus*) marinades in tomato sauce stored at 4°C. *Food Control*, Volume 16, 2005, p 639-644.
- **Koutsoumanis K.P., Sofos J.N.** (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 38:321–326.
- **Kreuzer R.** (1971). *Fish inspection and quality Control*. London
- **Kwon Y.M., Ricke S.C.** (1998). Induction of acid resistance of *Salmonella Typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3458–3463.
- **Lee I.S., Lin J., Hall H.K., Bearson B., Foster J.W.** (1995). The stationary phase sigma factor rS (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella Typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 17:155– 167.
- **Liston J.** (1980). Microbiology in fishery science. In: *Advances in fish science and technology*. Connel, J.J. and staff of Torry Research Station. (eds.). Fishing News Books. Farnham, Surrey, England, p 138-157.
- **Lou Y., Yousef A.E.** (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1252–1255.
- **Low J.C., Donachie W.** (1997). "A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis". *The Veterinary Journal*. 153: 9–29.
- **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.
- **Machida M., Gomi K.** (2010). *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press

- **Madigan M., Martinko J.** (2006). Brock Biology of Microorganisms (13th ed.). Pearson Education. pp 1096.
- **McClure P. J., Roberts T. A. and Oguru P. O.** (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. Lett. Appl. Microbiol. 9:95–99.
- **Merrell D.S., Camilli A.** (2002). Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. Current Opinion in Microbiology 5:51–55.
- **Mossel D.A.A., Mengerink W.H.J., Scholts H.H.** (1962). Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all Enterobacteriaceae. J. Bact., 84:381.
- **Naidoo K., Lindsay D.** (2009). Survival of *Listeria monocytogenes* and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong-manufacturing processes. Food Control, Volume 21, Issue 7, July 2010, p 1042-1050.
- **Petersson-Wolfe C.S., Mullarky I.K., Jones G.M.** (2010). *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. Virginia Cooperative Extension.
- **Phan-Thanh L., Mahouin F., Alige S.** (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 55:121–126.
- **Poligne I., Collignan, A.** (2000). Quick marination of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) using acetic and gluconic acids. Quality and stability of the end product. Lebensm.-Wis. u.-Technol, 33:202–209.
- **Regenstein M.J. and Regenstein C.E.** (1991). Introduction to Fish Technology. Published by Van Nostrand Reinhold, New York.
- **Ryan K.J., Ray C.G.** (2004). *Sherrie Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill
- **Rybicki E.P.** (1990). "The classification of organisms at the edge of life, or problems with virus systematics". South African Journal Science, 86:182–6.
- **San-Blas G., Calderone R.A.** (2008). *Pathogenic Fungi: Insights in Molecular Biology*. Caister Academic Press.
- **Shenderyuk V. I., Bykowski P. J.** (1989). Salting and marinating offish. In Z. E. Sikorski (Ed.), Seafood: resources, nutritional composition and preservation. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc

- **Shewan J.M.** (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. J. Hawthorn and J. Muil Leitch (eds), Rec. Advances Food Sci. 1:167-193.
- **Stergiou K.I.** (1992). Variability of monthly catches of anchovy *Engraulis encrasicolous* in the Aegean sea, Fishery Bulletin, 90: 211-215
- **Stergiou K.I., Christou E.D., Georgopoulos D., Zenetos A., Souvermezoglou C.** (1997). The Hellenic Seas: Physics, chemistry, biology and fisheries, Oceanography and Marine Biology, 35:415-538
- **Tatini S.R., Wasela W.D., Jezeski J.J., Morris H.A.** (1973). Production of Staphylococcal enterotoxin A in blue, break, Mozerrella and Swiss cheeses. *J Dairy Science*; 56: 429-35.
- **United States Pharmacopeial Convention.** (2007). The United States pharmacopeia, 31st ed., Amended Chapters 61, 62, 111. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- **Van Netten P., Perales I., Van de Moosalijk A., Curtis G.D.W., Mossel D. A. A.** (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp.* Int. J. of Food Microbiol. 8:299-317.
- **Vandenbosch L.L, Fung D.Y.C, Widomski M.** (1972). Optimum Temperature for Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* S-6 and 137 in Liquid Medium. Applied Microbiology, Volume 25(3), March 1973, p 498-50.
- **Whitehead P.J.P.** (1990). Engraulididae. p. 228-229. In J. C. Quero, J. C. Hureau, C. Karrer, A. Post, and L. Saldanha (eds.) Checklist of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA) JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 1.
- **Whitehead P.J.P., Nelson G.J., Wongratana T.** (1988) FAO Species Catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2 - Engraulididae. FAO Fish. Synop., Rome: FAO, 125(7/2):305-579.

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- **Ανανιάδη Κ.**, (1961). Θαλασσινή Εγκυκλοπαίδεια, Τόμος Γ, Αθήνα, σελ. 436.
- **Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Τζούρος Η.Ν.**, (2004). Επιλογή, Συντήρηση και Μεταχείριση Τροφίμων. Οδηγός Καταναλωτή για Ασφαλή Μεταχείριση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη: 145:147
- **Βαρελτζής Κ.** (1999). Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλιευμάτων. Εκδόσεις ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ, Θεσσαλονίκη.
- **Βασιλειάδου Σ.** (2002). Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση της σάρκας της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.). Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- **Γεωργάκης Σ., Βαρελτζής Κ., Αμβροσιάδης Ι.**, (2000). Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης (εκτός γάλακτος και των προϊόντων του). Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία
- **Μακρογιάννης Α.**, (2011). Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την ωρίμανση-αποθήκευση αλατισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*). Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Μποζιάρης Ι.**, (2009). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Σχισμένου Ε.**, (2005). Ημερήσια παραγωγή αβγών και ενδιαίτημα φωτοκίας του γαύρου, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), στο ΒΑ Αιγαίο. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.

6.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- <http://www.chemeng.ntua.gr> (2012)
- <http://www.fishbase.org> (2012)

ABSTRACT

In the present study the fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* during acidification and ripening-storage of marinated anchovy was monitored. The anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) was purchased from the local market of Volos. Then, the anchovy was washed, gutted and de-headed. Also the central bone and the tail were removed. Subsequently filleted and then took place the vaccination with *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* with initial population level of about 5×10^5 cfu/g. Then, was added the solution of 5% acetic acid and 2% NaCl to effect the process of acidification (marination). During the 8 hour acidification was measured the survival of the pathogens above. The *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* were counted in Petri Palcam, XLD and Baird-Parker, respectively. In the course of marination *Staphylococcus aureus* has proved the most acid-fast, since the survival population at the end of marination was 3,6 log cfu/g. In contrast *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis decreased below the detection limit of 2 log cfu/g, after 8 and 4 hours, respectively.

Then, already acidified product was inoculated with *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* with initial population level of about 5×10^5 cfu/g and stored at 4°C for 48 days. Enumeration of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* in Petri Palcam, XLD and Baird-Parker, respectively, was carried out. Populations of lactic acid bacteria in MRS, yeasts-fungi in RBC, enterobacteria in VRBGA and the total population in TSA, were also monitored. Simultaneously, the measuring of pH was held. At the storing of anchovy the populations of yeasts and fungi, lactic acid and enterobacteria were below the detection limit of 100, 10 and 10 cfu/g, respectively. The total population which measured with TSA started from 2,3 log cfu/g and at the end of the experiment reached to 3,5 log cfu/g. The population of *Listeria monocytogenes* was found below the detection limit of 2 log cfu/g after 24 days, while *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* were needed 35 and 21 days, respectively.

Finally, the last one experiment concerned the survival of adapted cells of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* in low pH, during storage of marinated anchovy. Then, the adaptation of their cells at pH=4 and pH=7 (control), took place. Subsequently, were inoculated in acidified anchovy with initial

population level of about 5 log cfu/g and stored at 4°C for 35 days. *Staphylococcus aureus* was the most acid-fast, while the adapted cells in acidic pH (pH=4), proved to be more acid-fast. In contrast, no differences for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis cells, were observed.

Keywords: marination, acidification, anchovies, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*