

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αλληλεπίδραση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύων και
του παθογόνου *Yersinia enterocolitica* σε φιλέτο τσιπούρας και μοντέλο
υπόστρωμα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας**

Σάββα Αμαλία

Βόλος, 2013

**«Αλληλεπίδραση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύων και
του παθογόνου *Yersinia enterocolitica* σε φιλέτο τσιπούρας και μοντέλο υπόστρωμα
σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Μποζιάρης Ιωαννης, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,

2) Αρβανιτογιάννης Ιωάννης, Καθηγητής, Τεχνολογία Τροφίμων με έμφαση στα Υδάτινα Οικοσυστήματα, 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*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Μποζιάρη Ιωάννη 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 την Παρλαπάνη Φωτεινή για τις χρήσιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της διπλωματικής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ. Αρβανιτογιάννη Ιωάννη και κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια τους, καθώς επίσης την ιχθυοκαλλιέργεια Δίας και το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την συνεισφορά τους στην πραγματοποίηση του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της τύχης του παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* σε ανταγωνισμό με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων, σε φιλέτο τσιπούρας (*Sparus aurata*) και σε μοντέλο υπόστρωμα. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) στους 5°C. Το μοντέλο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από ζυμό τσιπούρας και άγαρ. Με την χρήση του μοντέλου υποστρώματος, ήταν δυνατό να ερευνηθούν οι πληθυσμιακές μεταβολές του *Y. enterocolitica* σε συγκαλλιέργεια με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς.

Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν ήταν ότι τα εμβολιασμένα φιλέτα με *Y. enterocolitica* παρουσίασαν γρηγορότερα τη στατική φάση στους πληθυσμούς της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με τα φιλέτα των μαρτύρων. Ο πληθυσμός των βακτηρίων που παράγουν H₂S παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα εμβολιασμένα φιλέτα σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης ο πληθυσμός στο VRBGA παρουσίασε μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των εμβολιασμένων και μη φιλέτων κάτι λογικό εφόσον και το *Y. enterocolitica* καταμετράται σε VRBGA. Στο μοντέλο υπόστρωμα το *Pseudomonas* spp. φάνηκε να παρεμποδίζεται σε όλες τις συγκαλλιέργειες με μέγιστη παρεμπόδιση στη συγκαλλιέργεια με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Το *Y. enterocolitica* παρεμποδίστηκε στις συγκαλλιέργειες με τα οξυγαλακτικά και με τους *Pseudomonas* spp. – οξυγαλακτικά βακτήρια και ευνοήθηκε με το *Pseudomonas* spp.. Τέλος τα οξυγαλακτικά φάνηκε να παρεμποδίστηκαν σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια σε όλες τις συγκαλλιέργειες ωστόσο στη συγκαλλιέργεια και των τριών παρουσιάστηκαν ως κυρίαρχα.

Λέξεις κλειδιά: *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., Οξυγαλακτικά βακτήρια, αλλοίωση, *Sparus aurata*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αλλοίωση ιχθύων.....	1
1.2 Τσιπούρα - <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758).....	2
1.3 Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών.....	3
1.4 Τροποποιημένη ατμόσφαιρα – MAP.....	4
1.4.1 Επίδραση στα ψάρια.....	6
1.4.2 Επίδραση στους παθογόνους μικροοργανισμούς.....	6
1.4.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	8
1.5 Αντικείμενο και στόχοι της πτυχιακής διατριβής.....	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
2.1 Παρασκευή και σύσταση Θρεπτικών υποστρωμάτων.....	12
2.2 Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας.....	14
2.2.1 Προμήθεια, συσκευασία και συντήρηση φιλέτων.....	14
2.2.2 Προετοιμασία δείγματος.....	15
2.3 Μεταβολές του πληθυσμού της <i>Y. enterocolitica</i> σε συγκαλλιέργεια ή μη με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε μοντέλα υποστρώματα ιχθύος.....	16
2.3.1 Προετοιμασία μοντέλου υποστρώματος.....	16
2.3.2 Εμβολιασμός και μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν.....	17
2.3.3 Προετοιμασία δείγματος.....	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	20
3.1 Μεταβολές της Ολικής Μικροβιακής χλωρίδας, των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του pH σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C.....	20
3.2 Μεταβολές του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και της <i>Y. enterocolitica</i> και μέτρηση pH σε μοντέλα υποστρώματα αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C.....	27

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
4.1 Φιλέτα αποθηκευμένα στους 5°C υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα.....	34
4.2 Μοντέλα υποστρώματα αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C.....	36
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	39
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40
6.1 Ξένη Βιβλιογραφία.....	40
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	46
6.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.....	46
7. ABSTRACT	47

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλλοίωση ιχθύων

Η διαδικασία της αλλοίωσης αποτελεί κύρια συνέπεια της βακτηριακής ανάπτυξης που εμφανίζεται αρχικά σε ιστούς/όργανα με φυσιολογική χλωρίδα, όπως είναι το έντερο, τα βράγχια και ιδιαίτερα το δέρμα και επεκτείνεται στη σάρκα. Αυτό, συμβαίνει έπειτα από την νεκρική ακαμψία, με επακόλουθο την παραγωγή μεταβολιτών όπως η αμμωνία, το υδρόθειο, η τριμεθυλαμίνη κλπ., που παράγουν δυσάρεστες οσμές και γεύσεις στα ψάρια (Simeonidou et al., 1998). Η αλλοίωση των ψαριών αποτελεί μια δυναμική διαδικασία, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι μικροοργανισμοί, η σύνθεση του προϊόντος και οι συνθήκες αποθήκευσης (Gram & Huss, 1996).

Όσον αφορά την ποιότητα, η μικροχλωρίδα ενός φρέσκου ιχθύος δεν εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος του ψαριού, αλλά έχει σχέση και με το φυσικό ενδιαίτημα αυτού. Αυτή η μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από αρνητικά κατά gram βακτήρια (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, κ.λπ.) και σε μικρότερες ποσότητες από θετικά κατά gram βακτήρια (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, κλπ.). Οι αναλογίες των διαφόρων ειδών βακτηρίων που εμφανίζονται στους ιχθύες προσδιορίζονται από γεωγραφικούς, κλιματικούς και εποχικούς παράγοντες (Gennari et al., 1999).

Παρόλο που οι μικροοργανισμοί είναι η κύρια αιτία της αλλοίωσης, ωστόσο δεν εμπλέκονται όλοι σε αυτήν. Αυτοί που συμμετέχουν κατ'εξοχήν είναι οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, που αρχικά παρουσιάζονται σε χαμηλή συγκέντρωση

και αποτελούν ένα μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας. Κατά την αποθήκευση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, οι οποίες σχετίζονται με τη θερμοκρασία και την ατμόσφαιρα, οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται ταχύτερα και παράγουν μεταβολίτες υπεύθυνους για την επιδείνωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ψαριών (Huis in't Veld, 1996). Παρόλα αυτά, η ποιότητα ορισμένων προϊόντων ψαριών είναι στενά συνδεδεμένη με τη δραστηριότητα των βακτηρίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αλλοίωσης και σχετίζονται με την διάρκεια ζωής του προϊόντος (Koutsoumanis et al., 2002).

Οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, που έχουν βρεθεί σε αλλοιωμένους ιχθύες, οι οποίοι είχαν συντηρηθεί σε πάγο, των εύκρατων και τροπικών υδάτων, είναι τα *Pseudomonas* spp. και *Shewanella putrefaciens*. Αντίθετα, σε ιχθύες αποθηκευμένους σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος κυριαρχούσαν κυρίως βακτήρια της οικογένειας *Vibrionaceae* (Gram, 1990). Επιπροσθέτως, σε ιχθύες των ψυχρών θαλασσών των εύκρατων κλιμάτων, οι οποίοι συντηρούνται σε κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι κυρίως το *Photobacterium phosphoreum* και το *S. putrefaciens* (Dalgaard et al., 1995). Σε ιχθύες θερμότερων θαλασσινών νερών και σε συσκευασίες κενού ή μειγμάτων αερίων, οι οποίοι ήταν αποθηκευμένοι υπό ψύξη, ευνοείται η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *Brochothrix thermosphacta* (Drosinos & Nychas, 1996 ; Koutsoumanis & Nychas, 1999 ; Taoukis et al., 1999).

1.2 Τσιπούρα - *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

Τα αλιεύματα είναι μία από τις σημαντικότερες πηγές θρεπτικών για τον άνθρωπο από αρχαιοτάτων χρόνων και αποτελούν μια εξέχουσα θέση στις διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου (Ackman, 1995). Τα κυριότερα συστατικά τους είναι πρωτεΐνες 6-28%, λίπη 0,1-67% και νερό 28-96% (Huss, 1995), ενώ συνολικά το ποσοστό του λίπους και του νερού στη σάρκα των ψαριών ανέρχεται στο 80% περίπου (Ackman, 1995). Ακόμη ένα πλεονέκτημα αυτών, είναι ότι αποτελούν τη μοναδική φυσική πηγή από την οποία μπορεί να προμηθευτεί ο ανθρώπινος οργανισμός το εικοσιπενταενοϊκό οξύ και το εικοσιδύο-εξαενοϊκό οξύ, τα οποία αποτελούν τους σημαντικότερους εκπροσώπους της σειράς ω-3 των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και το λινολεϊκό οξύ της σειράς ω-6 (Montero et al., 2008).

Συγκεκριμένα, η τσιπούρα είναι ένα βενθοπελαγικό ψάρι, το οποίο διαβιεί σε θαλασσινά και υφάλμυρα νερά, σε βάθη από 30 έως και 150m. Ζει στην υποτροπική ζώνη και εξαπλώνεται στον Ανατολικό Ατλαντικό, την Μεσόγειο θάλασσα και την Μαύρη θάλασσα. Είναι ένα παμφάγο είδος με ιδιαίτερη προτίμηση στα μικρά ζώα (Στεργίου και συν., 2011). Αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά είδη στις υδατοεκτροφές με κύριες χώρες εκτροφής την Ελλάδα, την Τουρκία, την Ισπανία και την Ιταλία, με συνολική ετήσια παραγωγή 154.821t υπολογισμένη από τον Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) για το έτος 2011 (<http1>).

1.3 Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών

Τα ωμά τρόφιμα εμφανίζουν ένα αρχικό μικροβιακό φορτίο με μια ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών. Ωστόσο, μόνο μερικοί από αυτούς είναι σε θέση να

πολλαπλασιαστούν και να αναπτυχθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Gram & Huss, 1996). Η μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις 10^7 - 10^9 cfu/g, στις οποίες οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν και η ανάπτυξη τους επηρεάζεται από αυτή την αλληλεπίδραση (Boddy & Wimpenny, 1992).

Οι τύποι αλληλεπιδράσεων έχουν μελετηθεί στα οικοσυστήματα των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των ανταγωνιστικών συμπεριφορών και των αλληλεπιδράσεων, όπου η ανάπτυξη ενός οργανισμού ευνοείται από την ανάπτυξη ενός άλλου (Gram et al., 2002). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μία ομάδα βακτηρίων κυριαρχεί πάνω σε μία άλλη στενά συνδεδεμένη ομάδα δεν είναι πάντα πλήρως κατανοητή (Gram & Huss, 1996). Μερικές τέτοιες ανταγωνίστηκες συμπεριφορές συμβαίνουν για τα θρεπτικά συστατικά. Αρκετοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων εμφανίζουν τέτοιες ανταγωνιστικές ικανότητες. Όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν μια μείωση του pH και παράγουν βακτηριοσίνες (Adams & Nicolaidis, 1997). Ορισμένα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν κατά τις αντιδράσεις αλλοίωσης να παράγουν NH_3 και τριμεθυλαμίνη, τα οποία είναι τοξικά για κάποια άλλα βακτήρια και μερικές φορές ακόμα και για βακτήρια που παράγουν και τα ίδια (Ellis et al., 2000).

1.4 Τροποποιημένη ατμόσφαιρα – MAP

Η συσκευασία υπό Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging-MAP) είναι η συσκευασία ενός προϊόντος σε ατμόσφαιρα η οποία έχει τροποποιηθεί, έτσι ώστε η σύνθεση της να είναι διαφορετική από αυτή του αέρα (Hintlian & Hotchkiss, 1986). Συγκεκριμένα, ο αέρας που βρίσκεται μέσα στη

συσκευασία αντικαθίσταται από καθορισμένη σύσταση αερίου ή από ένα μείγμα αερίων που διαφέρει από την σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα. Η αναλογία του κάθε αερίου προσδιορίζεται με βάση το μείγμα που εισάγεται μέσα στη συσκευασία, χωρίς να γίνεται κανένας περαιτέρω έλεγχος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Silliker and Wolfe, 1980).

Η τροποποιημένη ατμόσφαιρα εφαρμόστηκε στα τρόφιμα στη Βόρεια Αμερική και στη συνέχεια διαδόθηκε ευρύτατα, έτσι ώστε να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκα προϊόντα με παρατεταμένη διάρκεια ζωής (Sivertsvik et al., 2002).

Η τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε συνδυασμό με τη συντήρηση υπό ψύξη είναι μία μέθοδος διατήρησης τροφίμων και χρησιμοποιείται για μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως φρέσκο κρέας, πουλερικά, ιχθύες, τυριά, λουκάνικα, καφέδες, φρούτα, λαχανικά κ.α. (Brody, 1989 ; Sivertsvik, 2002). Η χρήση της συσκευασίας MAP με αυξημένες συγκεντρώσεις σε διοξείδιο του άνθρακα, φαίνεται να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων καθυστερώντας τη μικροβιακή ανάπτυξη σ' αυτά (Stiles, 1991).

Οι πρώτες εφαρμογές της MAP έγιναν με εμπειρική εφαρμογή και χρησιμοποιούνται ακόμη και τώρα για νωπά κρέατα, σκληρά τυριά και αλεσμένο καφέ είναι η συσκευασία υπό κενό. (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011). Όπως αναφέρθηκε και από τους Veranth & Robe (1979) και Parry (1993) το καλοκαίρι του 1978 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MAP για την μεταφορά 1.000 τόνων σολομού από το Anchorage της Αλάσκας στο Seattle της Washington των Η.Π.Α. Η μεταφορά διήρκεσε 10 ημέρες και το προϊόν όταν έφθασε στον προορισμό του, ήταν πολύ καλής ποιότητας.

1.4.1 Επίδραση στα ψάρια

Η αλλοίωση των ψαριών διαχωρίζεται σε τέσσερις φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει το χρονικό περιθώριο όπου το ψάρι «χάνει» την φρεσκότητα του και αποκτά ανούσια γεύση. Αυτό συμβαίνει λόγω της δράσης των ενζύμων στη σάρκα του. Κατά τη διάρκεια των σταδίων δύο και τρία, ο αριθμός των βακτηρίων και των προϊόντων του μεταβολισμού τους αυξάνονται. Στην τέταρτη φάση περιλαμβάνεται η αποσύνθεση του τροφίμου. Η συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα επιδρά στις φάσεις της αλλοίωσης, επιμηκύνοντας την πρώτη και αναστέλλοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην δεύτερη και τρίτη φάση. (Huss, 1995).

1.4.2 Επίδραση στους παθογόνους μικροοργανισμούς

Η ακριβής δράση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους μικροοργανισμούς δεν είναι εφικτή έπειτα από την εμφάνιση διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Listeria monocytogenes* και *Yersinia enterocolitica* (Gram & Huss, 1996).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ εμφανίζουν παρεμποδιστικό χαρακτήρα στους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* και *Y. enterocolitica*. Ο βαθμός παρεμπόδισης αυξάνεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας, αλλά μειονεκτεί λόγω πιθανής ανάπτυξης του *Clostridium botulinum* τύπου E το οποίο είναι ικανό να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψύξης σε συνδυασμό με ανοξικές συνθήκες (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011 ; Erkmen, 1996 ; Erkmen, 2000 ; Ballestra et al., 1996 ; Gill & Reichelt, 1989).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά το *Clostridium*, αρκετοί ερευνητές ενδιαφέρονται για την ενδεχόμενη αύξησή του σε συσκευασίες τροφίμων υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η επικείμενη ανησυχία είναι αρκετά εύλογη, εξαιτίας της παθογούς σημαντικότητας του μικροοργανισμού. Αναλυτικότερα, το *C. botulinum*, παράγει μια νευροτοξίνη που προκαλεί παράλυση στο πρόσωπο και ταξινομείται σε τύπους A, B, C, D, E, F και G. Συγκεκριμένα οι τύποι A, B και F είναι σημαντικοί για τους ανθρώπους, ενώ το *Clostridium perfringens*, είναι το είδος που προκαλεί γαστρεντερικές διαταραχές (Hintlian & Hotchkiss, 1986).

Όσον αφορά την παραγωγή τοξινών, θεωρείται ιδιαίτερα επικίνδυνη για ένα προϊόν και προτιμάται να ανιχνευθεί πριν από τον καταναλωτή. Επιπροσθέτως, ενδείκνυται η αποθήκευση του τροφίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες (<3,3°C) και σε ατμόσφαιρες που περιέχουν τουλάχιστον 2% CO₂, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη του *C. botulinum* τύπου E (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).

Οι Lyver et al. (1998a,b) μελέτησαν την αλληλεπίδραση δύο παθογόνων μικροοργανισμών σε εμβολιασμένο νωπό και μαγειρεμένο surimi με 10³ σπόρια *L. monocytogenes* και 10⁴ σπόρια *C. botulinum* τύπου E. Τα surimi αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα με διαπερατότητα σε οξυγόνο και αποθηκεύτηκαν στους 4 και στους 12°C για 28 ημέρες χωρίς ιδιαίτερη αλλοίωση από το *C. botulinum*. Η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε με βραδύτερο ρυθμό και τα προϊόντα είχαν ακόμη αποδεκτή μυρωδιά και εμφάνιση.

Από τους Devere & Boskou (1996) μελετήθηκε η in vitro επίδραση των εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων στην αλλοίωση μπακαλιάρου, *Gadus morhua*, υπό MAP (60%CO₂ : 30%O₂ : 10%N₂) από το *S. putrefaciens*. Παρατηρήθηκε, ότι η αύξηση της ποσότητας του CO₂ (≥ 50%) παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *S.*

putrefaciens και μειώνει την παραγωγή τριμεθυλαμίνης. Στο μπακαλιάρο (*Gadus morhua*) αλλά και στην ιριδιζούσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μελετήθηκε η ανάπτυξη των *Aeromonas* spp. και *Y. enterocolitica* από τους Davis και Slade το 1995. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες MAP (60%CO₂ : 40%N₂, 40%CO₂ : 30%N₂ : 30%O₂, 60%CO₂ : 40%N₂, 80%CO₂ : 20%N₂) και οι ιχθύες αποθηκεύτηκαν στους 0,5 και 12°C. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κάτω από ατμόσφαιρα πλούσια σε CO₂ και πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

1.4.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Η χρήση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στη συντήρηση των αλιευμάτων, εκτός από πλεονεκτήματα εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η αλλαγή στη σύνθεση των αερίων, που οφείλεται στη δραστηριότητα των ενζύμων της σάρκας και των μικροοργανισμών, η αλλαγή της ατμόσφαιρας σε περίπτωση που ανοιχθεί η συσκευασία και παραγωγή διάφορων δυσάρεστων οσμών, που γίνονται αντιληπτές κατά το άνοιγμα της συσκευασίας (Βαρελτζής, 1999).

Για την αποφυγή των μειονεκτημάτων αυτών, επινοήθηκε το σύστημα συντήρησης με εμπλουτισμένες ατμόσφαιρες CO₂ συνεχούς ροής (Carbon dioxide enriched controlled flow-through atmospheres). Με το σύστημα αυτό, η ατμόσφαιρα των αερίων παραμένει σταθερή και οι δυσάρεστες οσμές που παράγονται στη διάρκεια της συντήρησης απομακρύνονται με τη ροή των αερίων (Oberlender et al., 1983).

Μία επιτυχημένη συσκευασία MAP, επιτυγχάνεται από το συνδυασμό διαφόρων παραγόντων. Κάποιοι από αυτούς είναι οι ακόλουθοι: καλής ποιότητας πρώτες ύλες, ορθές πρακτικές υγιεινής κατά την αλυσίδα, επιλογή του καταλληλότερου υλικού συσκευασίας, ασφαλής εξοπλισμός, σωστή διατήρηση και έλεγχος της θερμοκρασίας, κατάλληλο μίγμα αερίων για το εκάστοτε προϊόν και σωστή αναλογία αερίου/προϊόντος (Soccol & Oetterer 2003).

Η ευρεία εξάπλωση της συσκευασίας MAP στην αγορά απέδειξε στην πράξη ότι τα πλεονεκτήματα της είναι πολύ πιο σημαντικά από τα αντίστοιχα μειονεκτήματα. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν πρώτα τα πλεονεκτήματα και στη συνέχεια τα μειονεκτήματα της συσκευασίας αυτής.

Πλεονεκτήματα συσκευασίας MAP

1. Παράταση διάρκειας ζωής, 50-400%, ανάλογα με το προϊόν έτσι ώστε να επιτευχθεί λιγότερη μετακίνηση των προϊόντων, μεταξύ των αποθηκευτικών χώρων και των ραφιών έκθεσης.
2. Ελαχιστοποίηση των αποβλήτων από τα ακατάλληλα προϊόντα έπειτα από το τέλος της ζωής τους.
3. Εξαιρετική παρουσίαση, λόγω της αργής επιδείνωσης της εμφάνισης από τον τόπο παραγωγής έως και την κατανάλωση και ελκυστική απεικόνιση, λόγω της διαρρύθμισης της συσκευασίας.
4. Ελαχιστοποίηση της χρήσης τεχνητών συντηρητικών στην συνεχώς αυξανόμενη «πράσινη ανάπτυξη».
5. Παροχή προϊόντων υψηλής ποιότητας.

6. Αποφυγή απώλειας νερού, μόλυνσης κατά των χειρισμό και άσχημων οσμών (Sivertsvik et al.,2002).

Μειονεκτήματα συσκευασίας MAP

1. Υψηλό κόστος για προμήθεια εξοπλισμού, αερίων και υλικών συσκευασίας.
2. Απαιτείται έλεγχος της θερμοκρασίας για την πλήρη ασφάλεια του τροφίμου.
3. Απαίτηση διαφορετικών μιγμάτων αερίων ανάλογα με το είδος του τροφίμου.
4. Αύξηση του όγκου της συσκευασίας η οποία επηρεάζει και το κόστος μεταφοράς και τον απαιτούμενο χώρο για έκθεση του προϊόντος.
5. Απαιτείται καλή εκπαίδευση του προσωπικού για την χρήση του εξοπλισμού.
6. Τα πλεονεκτήματα τα οποία έχουν αναφερθεί παύουν να ισχύουν με το άνοιγμα της συσκευασίας (Papp, 1993).

1.5 Αντικείμενο και στόχοι της πτυχιακής εργασίας

Αντικείμενο της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η διερεύνηση της τύχης του ψυχρότροφου παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica*, σε ανταγωνισμό με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων. Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε σε φιλέτο τσιπούρας, αλλά και σε μοντέλο υπόστρωμα, προσομοιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούν κατά την συντήρηση των φιλέτων ιχθύων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Έτσι έγινε δυνατή η μελέτη των πληθυσμιακών μεταβολών της *Y.*

enterocolitica σε συγκαλλιέργεια ή μη με τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την ασφάλεια των προϊόντων.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Παρασκευή και σύσταση Θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα υλικά Iron Agar, TSA και TSB προμηθεύθηκαν από την LAB M (Lancashire, UK). Τα MRD, MRS και VRBGA προμηθεύθηκαν από την Biolife (Milan, Italy) και το GSP Agar προμηθεύτηκε από την Merck (Darmstadt, Germany).

- **Iron Agar (IA)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού Iron Agar προσθέτονται σε φιάλη των 1000 ml, 20g πεπτόνη, 3g εκχύλισμα κρέατος, 3g εκχύλισμα ζύμης, 3g κιτρικός σίδηρος, 0.3g θειοθειικό νάτριο, 5g NaCl, 0.6g L-κυστεΐνη και 14g άγαρ. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό και ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 7,4. Έπειτα ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

- **Mann Rogosa Sharpe agar (MRS)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού MRS προσθέτονται σε φιάλη 55g του υλικού MRS, το οποίο περιέχει (g/L) : 10g μίγμα από πεπτόνες, 5g εκχύλισμα ζύμης, 10g εκχύλισμα κρέατος, 20g γλυκόζη, 2g φωσφορικό κάλιο, 5g οξικό νάτριο, 0.2g θειικό μαγνήσιο, 0.05g θειικό μαγγάνιο, 1.08g Tween και 2g κιτρικό αμμώνιο. Στη συνέχεια, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

- **Maximum Recovery Diluent (MRD)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού MRD προσθέτονται σε φιάλη 9.5g του υλικού, το οποίο περιέχει (g/L) : 1g πεπτόνη και 8.5g χλωριούχο νάτριο. Στη συνέχεια, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό, τοποθετούμε στο κατάλληλο σκεύος και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

- **Pseudomonas-Aeromonas Selective Agar Base (GSP Agar)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού GSP Agar προσθέτονται σε φιάλη 45g του υλικού, το οποίο περιέχει (g/L) : 10g γλουταμικό νάτριο L(+), άμυλο, 20g διαλύτης, 2g δισόξινο φωσφορικό κάλιο, 0.5 g θειικό μαγνήσιο, 0.35g ερυθρό στης φαινόλης (phenol red) και 12g άγαρ. Στη συνέχεια, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Έπειτα, τοποθετούμε το υλικό στο υδατόλουτρο μέχρι να φτάσει στους 45°C. Προσθέτουμε πενικιλίνη G 100.000 IU, ρυθμίζουμε το pH περίπου στο 7.2 ± 0.2 και μοιράζουμε σε τρυβλία.

- **Tryptone Soy Agar (TSA)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού TSA προσθέτονται σε φιάλη 15g τρυπτόνη, 5g πεπτόνη σόγιας, 5g χλωριούχο νάτριο και 15g άγαρ. Έπειτα, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Τοποθετούμε το υλικό στο υδατόλουτρο μέχρι να φτάσει στους 45°C, για να μοιραστεί σε τρυβλία.

- **Tryptone Soy Broth (TSB)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού TSB προσθέτονται σε φιάλη 30g του υλικού, το οποίο περιέχει (g/L) : 17g τρυπτόνη, 3g πεπτόνη σόγιας, 5g χλωριούχο νάτριο, 2.5g όξινο φωσφορικό κάλιο και 2.5g δεξτρόζη. Αργότερα, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό, τοποθετούμε στο κατάλληλο σκεύος και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

- **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)**

Για την δημιουργία 1L θρεπτικού υλικού VRBGA προσθέτονται σε φιάλη 41.5g του υλικού, το οποίο περιέχει (g/L): 3g εκχύλισμα ζύμης, 7g πεπτόνη, 5g χλωριούχο νάτριο, 1.5g χολικά άλατα, 10g γλυκόζη, 0.03g χρωστική Neutral red, 0.002g χρωστική Crystal violet και 12g άγαρ. Στη συνέχεια, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό και τοποθετούμε τη φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα, έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά (δεν χρειάζεται επιπλέον αποστείρωση).

2.2 Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας

2.2.1 Προμήθεια, συσκευασία και συντήρηση φιλέτων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φιλέτα τσιπούρας (*Sparus aurata*) βάρους περίπου 100-120g από τις ιχθυοκαλλιέργειες «ΔΙΑΣ».

Διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, τα φιλέτα της πρώτης εμβολιάστηκαν με *Y. enterocolitica* (*Yersinia enterocolitica* CITY 650, *Yersinia enterocolitica* CITY 844) ενώ της δεύτερης όχι. Η προμήθεια των μικροοργανισμών έγινε από τη βιβλιοθήκη μικροοργανισμών του εργαστηρίου και αναγεννήθηκαν σε TSB έως ότου φτάσουν σε πληθυσμό 10^7 - 10^8 . Στη συνέχεια αραιώθηκαν διαδοχικά έτσι ώστε ο αρχικός πληθυσμός κάθε εμβολίου να είναι περίπου 10^3 και εμβολιάστηκαν στα φιλέτα. Στη συνέχεια, συσκευάστηκαν σε απορροφητικά δισκάκια από διογκωμένη πολυστερίνη (SIRAP GEMA) με πλαστικό φιλμ BDF 8050F (SEALED AIR) σε συνθήκες MAP, συγκέντρωσης CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30% (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Έπειτα, μεταφέρθηκαν μέσα σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο στο χώρο του εργαστηρίου το συντομότερο δυνατό έπειτα από την συσκευασία τους και αποθηκεύθηκαν στους 5°C.

2.2.2 Προετοιμασία δείγματος

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγμα 10g εις τριπλούν από διαφορετικά φιλέτα και μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, όπου προσθέτονταν 90ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Έπειτα, ακολουθούσε ομογενοποίηση για 1-2 λεπτά σε συσκευή Stomacher και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν δεκαδικές αραιώσεις με την μεταφορά 1ml δείγματος σε 9 ml αποστειρωμένου Maximum Recovery Diluent (MRD).

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν:

- ✓ Ολική μικροβιακή χλωρίδα σε TSA. Έπειτα από την επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 1 ημέρα.

- ✓ Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella putrefaciens*) σε Iron Agar. Μετά από καταμέτρηση των μαύρων μόνο αποικιών έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 2-3 ημέρες.
- ✓ Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25°C για 3-4 ημέρες.
- ✓ *Pseudomonas* spp. σε GSP Agar. Μετά από καταμέτρηση των ροζ-μωβ μόνο αποικιών έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 1 ημέρα.
- ✓ *Aeromonas* spp. σε GSP Agar. Μετά από καταμέτρηση των κίτρινων μόνο αποικιών έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 1 ημέρα.
- ✓ *Enterobacteriaceae* σε VRBGA και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 1 ημέρα.

Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH των δειγμάτων σε pH-μετρο (pH 730, inoLab, WTW series). Στις μεταβολές των πληθυσμών προσαρμόστηκε η σιγμοειδής εξίσωση του Baranyi χρησιμοποιώντας το λογισμικό Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts, 1994).

2.3 Μεταβολές του πληθυσμού της *Y. enterocolitica* σε συγκαλλιέργεια ή μη με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε μοντέλα υποστρώματα ιχθύος

2.3.1 Προετοιμασία μοντέλου υποστρώματος

Για την δημιουργία του υποστρώματος ψαριού, αρχικά προμηθευθήκαμε τους ιχθύες από την ιχθυοκαλλιέργεια «ΔΙΑΣ» οι οποίοι και μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά κιβώτια στο εργαστήριο. Προβήκαμε στην φιλετοποίηση των ιχθύων. Τα φιλέτα ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher μαζί με ίση

ποσότητα απιονισμένου νερού. Ομογενοποιήθηκαν για 2-3 λεπτά. Απομακρύνθηκαν τα φιλέτα και φιλτραρίστηκε ο ζωμός, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα. Τοποθετήθηκε ο ζωμός σε φιάλη και θερμάνθηκε έτσι ώστε να έρθει σε θερμοκρασία βρασμού για 5 λεπτά. Διηθήθηκε με ειδικό φίλτρο Whatman και μεταφέρθηκε σε μία καθαρή φιάλη έτσι ώστε να βράσει για 30 λεπτά. Μετρήθηκε το pH του τελικού ζωμού, ρυθμίστηκε περίπου στο 6,45 και αφήθηκε να κρυώσει. Σε Duran των 500mL φτιάχνεται 250mL Agar. Αποστειρώνεται και αφήνεται στο υδατόλουτρο έτσι ώστε να έρθει στην θερμοκρασία 45°C όπου και θα μπορεί να γίνει η ανάμειξη με τον ζωμό κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, το μοντέλο μεταφέρεται σε τρυβλία και ψύχεται (Dalgaard, 1995).

2.3.2 Εμβολιασμός και μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν

Για τον εμβολιασμό των μοντέλων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί από τη βιβλιοθήκη μικροοργανισμών του εργαστηρίου:

- ✓ *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae*),
- ✓ Οξυγαλακτικά βακτήρια (*Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Carnobacterium divergens*).
- ✓ *Yersinia enterocolitica* (*Yersinia enterocolitica* CITY 650, *Yersinia enterocolitica* CITY 844)

Οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε TSB και επώαστηκαν έως ότου φτάσουν πληθυσμό 10^7 - 10^8 . Στη συνέχεια ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις σε MRD. Μεταφέρθηκε στο εκάστοτε μοντέλο 1ml από την κατάλληλη αραιώση ώστε μετά την

επίστρωση ο αρχικός πληθυσμός στο υπόστρωμα να είναι περίπου $5 \cdot 10^3$ cfu/g. Στη συνέχεια, τα μοντέλα υποστρώματα συσκευάστηκαν σε απορροφητικά δισκάκια από διογκωμένη πολυστερίνη (SIRAP GEMA) με πλαστικό φιλμ BDF 8050F (SEALED AIR) σε συνθήκες MAP, συγκέντρωσης CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%. Και μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο στο χώρο του εργαστηρίου το συντομότερο δυνατό και αποθηκεύθηκαν στους 5°C.

2.3.3 Προετοιμασία δείγματος

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγμα 1g εις τριπλούν από ένα τρυβλίο του εκάστοτε δείγματος, μεταφέρονταν ασηπτικά σε 9 ml αποστειρωμένου MRD και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Vortex. Κατόπιν πραγματοποιούνταν δεκαδικές αραιώσεις με την μεταφορά 1 ml δείγματος σε 9 ml αποστειρωμένου MRD.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν:

- ✓ Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25°C για 3-4 ημέρες.
- ✓ *Pseudomonas* sp. σε GSP Agar. Μετά από καταμέτρηση των ροζ-μωβ μόνο αποικιών έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 1 ημέρα.
- ✓ *Yersinia enterocolitica* σε VRBGA και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 1 ημέρα.

Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH των δειγμάτων σε pH-μετρο (pH 730, inoLab, WTW series). Στις μεταβολές των πληθυσμών προσαρμόστηκε η σιγμοειδής εξίσωση

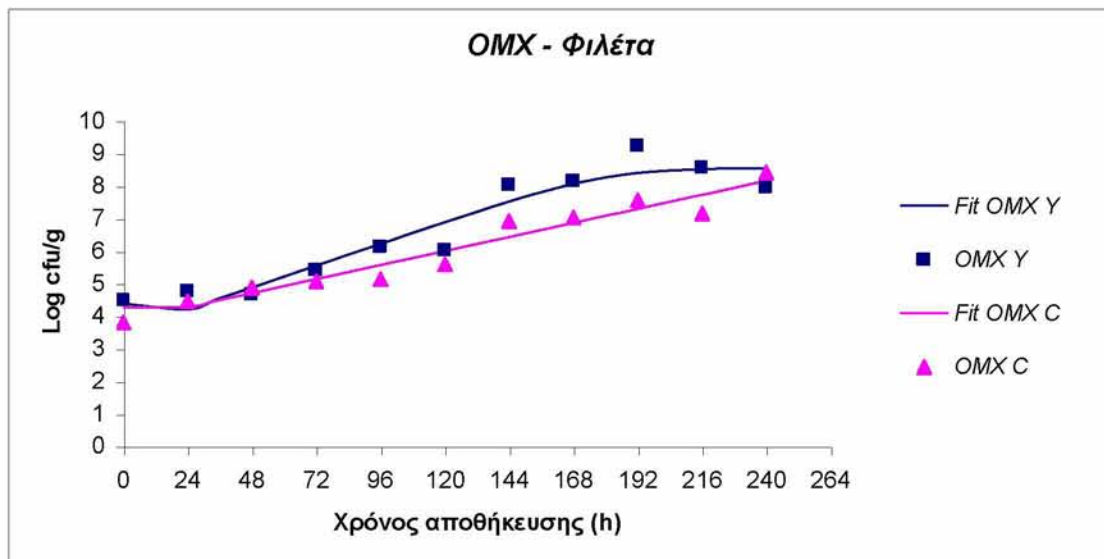
του Baranyi χρησιμοποιώντας το λογισμικό Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts, 1994).

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

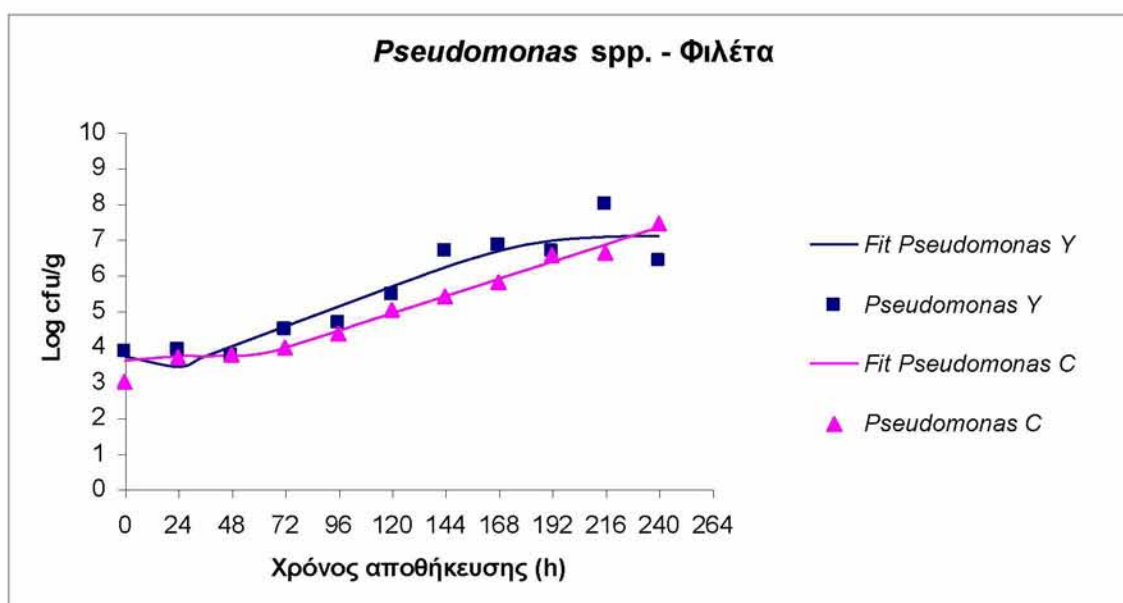
3.1 Μεταβολές της Ολικής Μικροβιακής χλωρίδας, των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του pH σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C

Οι αρχικοί πληθυσμοί για την Ολική μικροβιακή χλωρίδα στα εμβολιασμένα φιλέτα (OMX Y) και μη (OMX C) που προσδιορίστηκαν πειραματικά ήταν $4,48 \pm 0,03$ και $3,80 \pm 0,11 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα. Ενώ οι τελικοί πληθυσμοί ήταν $7,94 \pm 0,04$ και $8,42 \pm 0,09 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα (Σχ. 1). Στα φιλέτα τα οποία εμβολιάστηκαν παρουσιάστηκε μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης σε σχέση με τα φιλέτα των μαρτύρων (Πιν. 2).

Αντιστοίχως καταμετρήθηκαν και οι πειραματικοί αρχικοί πληθυσμοί των εμβολιασμένων με *Yersinia enterocolitica* φιλέτων (*Pseudomonas* Y) και των μαρτύρων (χωρίς *Yersinia enterocolitica*) (*Pseudomonas* C) οι οποίοι ήταν $3,85 \pm 0,11$ και $3,00 \pm 0,00 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα. Οι τελικοί πειραματικοί πληθυσμοί για τα εμβολιασμένα φιλέτα ήταν $6,38 \pm 0,27$ ενώ για τους μάρτυρες $7,43 \pm 0,12 \log \text{ cfu/g}$, ωστόσο στα εμβολιασμένα φιλέτα εμφανίστηκε η στατική φάση εντός 192 ωρών ενώ στους μάρτυρες δεν επήλθε έως το πέρας του πειράματος (Σχ. 2). Όπως και στην OMX, οι ψευδομονάδες στα φιλέτα που εμβολιάστηκαν παρουσίασαν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης και δεν παρουσίασαν φάση προσαρμογής. (Πιν. 2).



Σχήμα 1. Μεταβολές του πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία OMX Y και OMX C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit OMX Y και Fit OMX C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

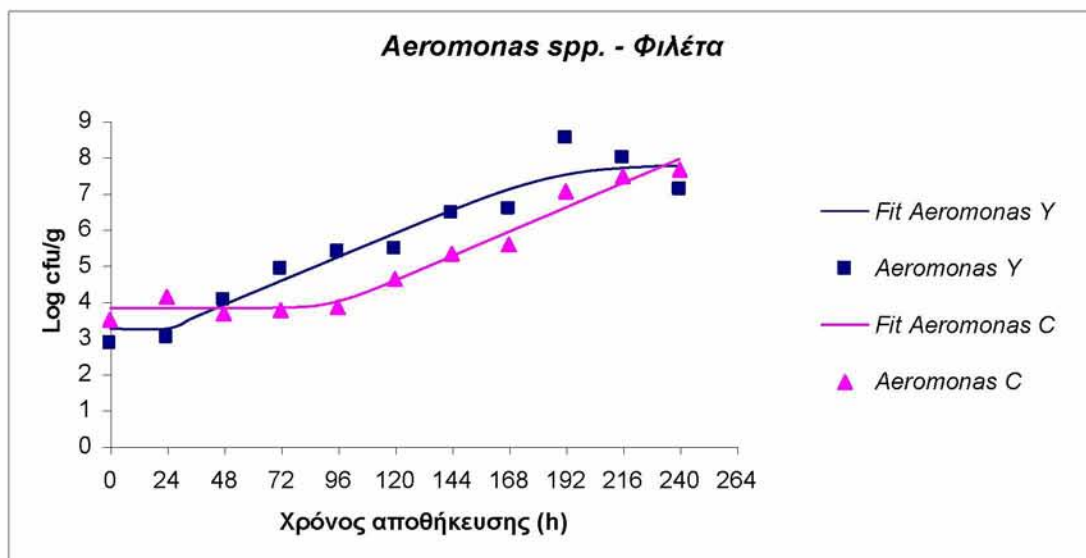


Σχήμα 2. Μεταβολές του πληθυσμού των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.), σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία *Pseudomonas* Y και *Pseudomonas* C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit *Pseudomonas* Y και Fit *Pseudomonas* C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

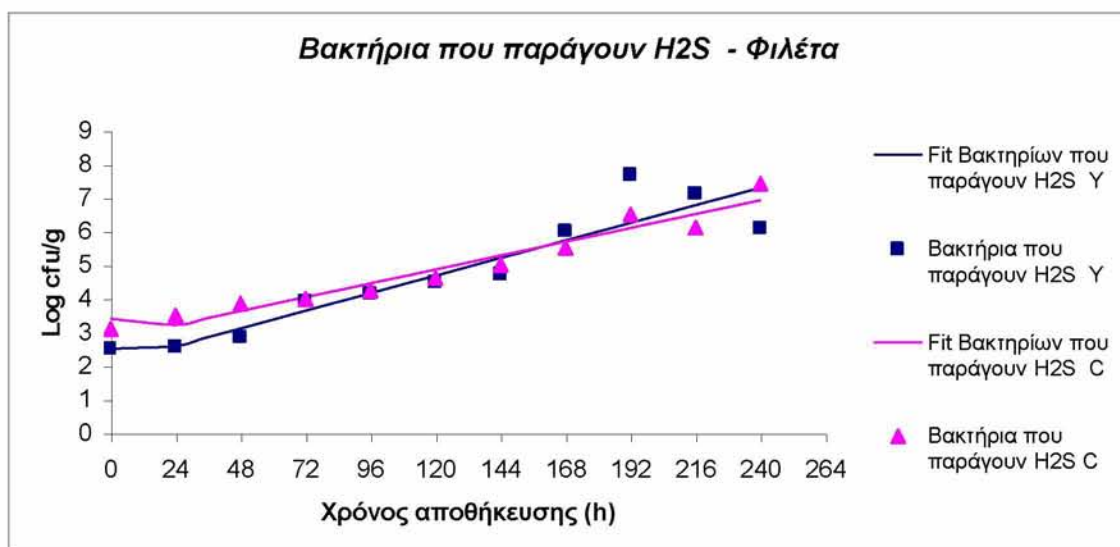
Για τις αερομονάδες οι πειραματικοί αρχικοί πληθυσμοί των εμβολιασμένων φιλέτων (*Aeromonas* Y) αλλά και των αντίστοιχων μαρτύρων (*Aeromonas* C) ήταν $2,85 \pm 0,09$ και $3,48 \pm 0,22 \log \text{ cfu/g}$. Ωστόσο οι αερομονάδες ήταν ο μοναδικός μικροοργανισμός ο οποίος δεν εμφάνισε διαφορά στον ειδικό ρυθμό αύξησης μεταξύ των δύο σειρών, εμβολιασμένων και μη (Πιν.2). Οι τελικοί πειραματικοί πληθυσμοί ήταν $7,10 \pm 0,05$ για τα εμβολιασμένα φιλέτα τα οποία παρουσίασαν στατική φάση περίπου στις 192 ώρες και $7,64 \pm 0,09 \log \text{ cfu/g}$ για τους μάρτυρες οι οποίοι δεν εμφάνισαν στατική φάση (Σχ. 3).

Τα βακτήρια που παράγουν H_2S παρουσίασαν πειραματικούς αρχικούς πληθυσμούς για τα εμβολιασμένα φιλέτα (H_2S Y) και μη (H_2S C), $2,85 \pm 0,09$ και $3,48 \pm 0,22 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται τα βακτήρια που παράγουν είχαν μικρότερο πληθυσμό στα εμβολιασμένα φιλέτα σε αντίθεση με τους μάρτυρες. Οι τελικοί πληθυσμοί για τα εμβολιασμένα φιλέτα ήταν $6,08 \pm 0,04$ και $7,43 \pm 0,14 \log \text{ cfu/g}$ για τους μάρτυρες. (Σχ. 4).

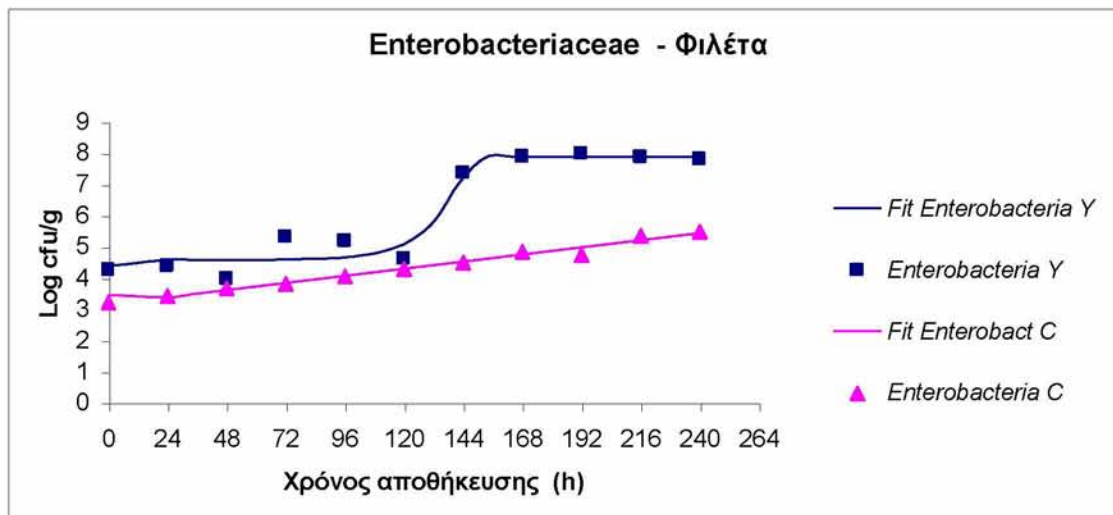
Οι πειραματικοί αρχικοί πληθυσμοί των Enterobacteriaceae στα εμβολιασμένα φιλέτα (Enterobacteriaceae Y) και των μαρτύρων (Enterobacteriaceae C) ήταν $4,26 \pm 0,04$ και $3,22 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$. Ενώ οι τελικοί πειραματικοί πληθυσμοί ήταν $7,80 \pm 0,00$ και $5,49 \pm 0,05 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα (Σχ. 5). Ωστόσο στα συγκεκριμένα δείγματα παρουσιάστηκε 37 φορές μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός αύξησης στα φιλέτα με το *Y. enterocolitica* και διαφορά σχεδόν $2,5 \log \text{ cfu/g}$ μεταξύ των τελικών πληθυσμών σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ανίχνευση του *Y. enterocolitica* στο υλικό VRBGA όπου και καταγράφηκε ο πληθυσμός (Πιν.2).



Σχήμα 3. Μεταβολές του πληθυσμού των Αερομονάδων, σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία *Aeromonas* Y και *Aeromonas* C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit *Aeromonas* Y και Fit *Aeromonas* C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).



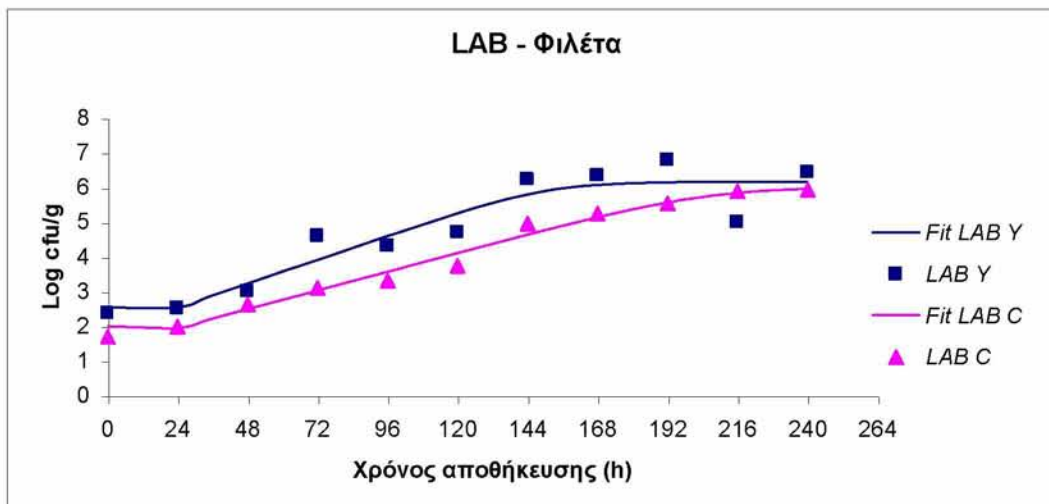
Σχήμα 4. Μεταβολές του πληθυσμού των βακτηρίων που παράγουν H₂S, σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία Βακτήρια που παράγουν H₂S Y και Βακτήρια που παράγουν H₂S C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit Βακτηρίων που παράγουν H₂S Y και Fit Βακτηρίων που παράγουν H₂S C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).



Σχήμα 5. Μεταβολές του πληθυσμού των Enterobacteriaceae σε VRBGA, σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία Enterobacteriaceae Y και Enterobacteriaceae C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit Enterobacteriaceae Y και Fit Enterobacteriaceae C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσίασαν πειραματικούς αρχικούς πληθυσμούς στα εμβολιασμένα φιλέτα (LAB Y) $2,37 \pm 0,05$ και στους μάρτυρες (LAB C) $1,70 \pm 0,11$ log cfu/g. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά με την OMX όσον αφορά την στατική φάση η οποία επήλθε στις 168 ώρες για τα εμβολιασμένα φιλέτα. Οι τελικοί πειραματικοί πληθυσμοί ήταν $6,44 \pm 0,12$ και $5,93 \pm 0,04$ log cfu/g για τα φιλέτα των μαρτύρων (Σχ. 6).

Οι τιμές του pH καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου ζωής των φιλέτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι αρχικές τιμές pH ήταν 6,37 και 6,34 για τα εμβολιασμένα φιλέτα και τους μάρτυρες αντίστοιχα. Στα φιλέτα των μαρτύρων, το pH εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση του (6,23) στις 192 ώρες και το μέγιστο του (6,38) στις 240 ώρες.



Σχήμα 6. Μεταβολές του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας με (Y) ή χωρίς (C), *Y. enterocolitica* κατά τη συντήρησή τους στους 5°C. Τα σημεία LAB Y και LAB C εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα ενώ τα Fit LAB Y και Fit LAB C είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

Πίνακας 1. Τιμές pH των φιλέτων σε όλη την διάρκεια του χρόνου ζωής των φιλέτων εμβολιασμένων (Y) και μη (C).

Χρόνος (h)	pH	
	Φιλέτα C	Φιλέτα Y
0	6,34	6,37
24	6,37	6,45
48	6,27	6,21
72	6,29	6,39
96	6,32	6,34
120	6,38	6,33
144	6,28	6,27
168	6,33	6,11
192	6,23	6,19
216	6,32	6,33
240	6,38	6,17

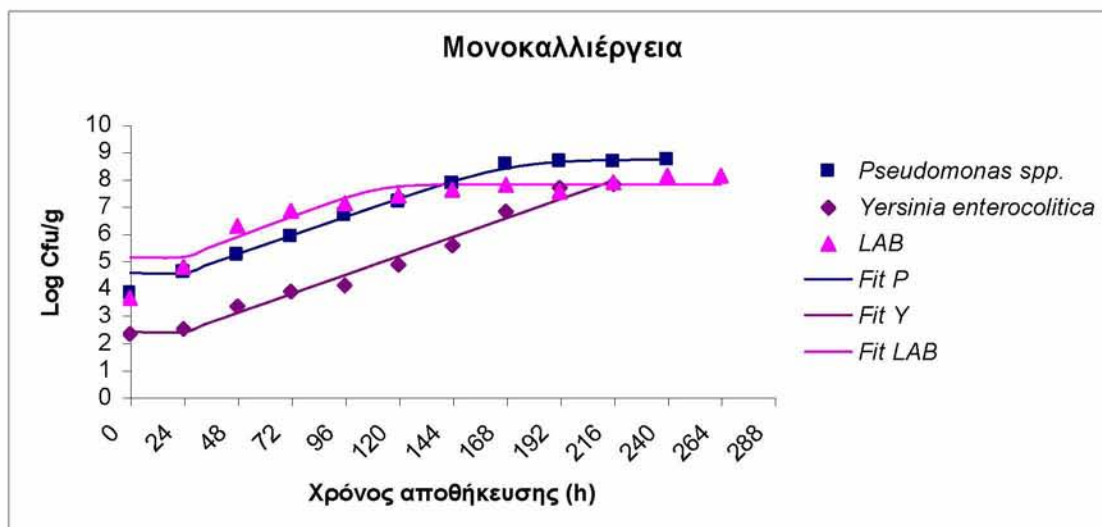
Συνολικά, στα φιλέτα τσιπούρας εμβολιασμένα και μη, δίδεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης, η φάση προσαρμογής, ο αρχικός και ο τελικός πληθυσμός των ολικών μικροβιακών χλωρίδων (OMX), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas*), των Αερομονάδων (*Aeromonas*), των βακτηρίων που παράγουν H₂S, των *Enterobacteriaceae* και των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) (Πίν. 2).

Πίνακας 2. Κινητικές παράμετροι (μέσοι όροι ± τυπ. αποκλιση, 3 επαναλήψεων) της Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas*), των Αερομονάδων (*Aeromonas*), των βακτηρίων που παράγουν H₂S, των *Enterobacteriaceae* και των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), σε φιλέτα ιχθύων τσιπούρας εμβολιασμένα με *Y. enterocolitica* (Y) και μη (C) αποθηκευμένα στους 5°C.

	Ειδικός ρυθμός αύξησης (h ⁻¹)	Φάση προσαρμογής (h)	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός (log cfu/g)
OMX Y	0,030 ± 0,004	-	4,387 ± 0,249	8,557 ± 0,016
OMX C	0,017 ± 0,001	-	4,282 ± 0,006	> 8,162
<i>Pseudomonas</i> Y	0,029 ± 0,012	-	3,716 ± 0,226	7,031 ± 0,139
<i>Pseudomonas</i> C	0,019 ± 0,000	39,289 ± 3,600	3,592 ± 0,230	> 7,329
<i>Aeromonas</i> Y	0,027 ± 0,001	-	3,240 ± 0,021	7,777 ± 0,164
<i>Aeromonas</i> C	0,028 ± 0,000	69,471 ± 5,880	3,818 ± 0,092	> 7,949
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S Y	0,023 ± 0,003	-	2,509 ± 0,350	6,831 ± 0,000
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S C	0,018 ± 0,001	-	3,407 ± 0,301	> 6,935
<i>Enterobacteriaceae</i> Y	0,336 ± 0,224	128,276 ± 0,310	4,388 ± 0,249	7,904 ± 0,008
<i>Enterobacteriaceae</i> C	0,009 ± 0,001	-	3,465 ± 0,064	> 5,444
LAB Y	0,028 ± 0,001	-	2,546 ± 0,103	6,167 ± 0,014
LAB C	0,021 ± 0,000	-	1,998 ± 0,025	6,056 ± 0,025

3.2 Μεταβολές του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και της *Y. enterocolitica* και μέτρηση pH σε μοντέλα υποστρώματα αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C

Η αύξηση των μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.*, *Y. enterocolitica* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) καταμετρήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων σε καλλιέργειες μόνα τους, αλλά και σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς. Ο αρχικός πληθυσμός των *Pseudomonas spp.* σε μονοκαλλιέργεια ήταν $3,81 \pm 0,02$, ενώ ο τελικός $8,70 \pm 0,03$ log cfu/g αν και μπήκε στη στατική φάση εντός 168 ωρών (Σχ.8). Υπήρξε μία ομαλότητα στο pH καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος με μέγιστο κατά το τέλος των πειραμάτων (6,93) (Πιν. 3). Το *Y. enterocolitica* σε μονοκαλλιέργεια παρουσίασε αρχικό πληθυσμό $2,32 \pm 0,07$ και τελικό $7,82 \pm 0,02$ log cfu/g ωστόσο δεν επήλθε σε στατική φάση έως τις 216 ώρες (Σχ. 8). Όσο αφορά το pH παρουσιάστηκε μέγιστο στις 144 ώρες (6,97) αλλά και ελάχιστο στις 96 ώρες (6,09) (Πιν. 3). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του *Pseudomonas spp.* και *Y. enterocolitica* παρουσίασε μία ταύτιση στην καλλιέργεια ελέγχου και ήταν $0,028 \text{ h}^{-1}$ (Πίν. 4). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσίασαν αρχικό πληθυσμό $3,62 \pm 0,10$. Ενώ τελικό $8,11 \pm 0,09$ log cfu/g και επήλθαν στη στατική φάση εντός 120 ωρών (Σχ. 8). Το pH εμφάνισε διακυμάνσεις με ελάχιστη τιμή το 6,28 που ταυτίστηκε και με το τέλος του πειράματος και μέγιστη 6,52 στις 72 ώρες (Πιν. 3). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην καλλιέργεια ελέγχου ήταν $0,031 \text{ h}^{-1}$.

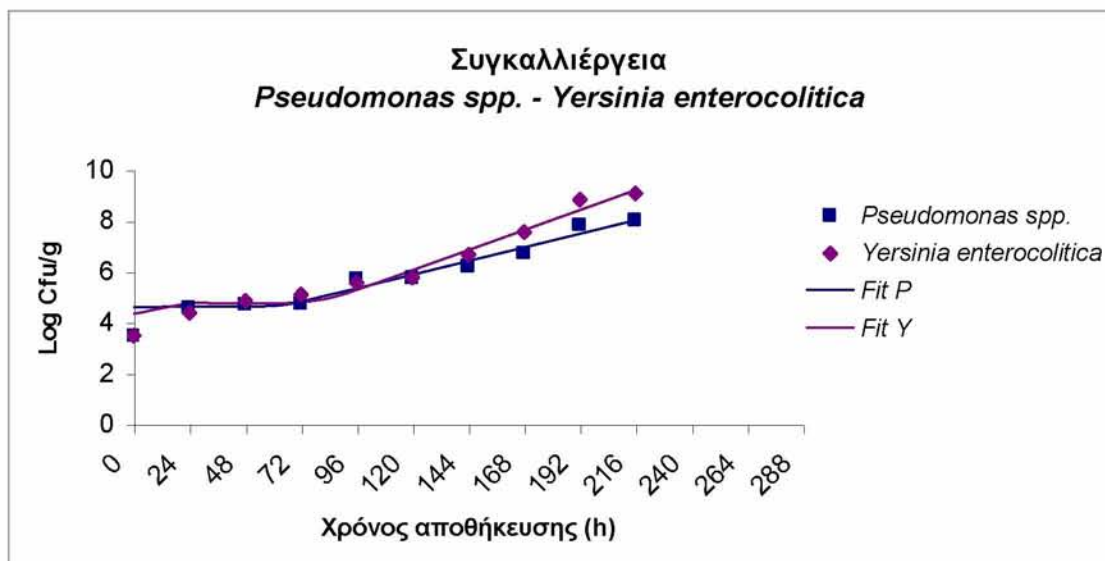


Σχήμα 8. Καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp., της *Yersinia enterocolitica* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), σε μονοκαλλιέργεια σε μοντέλο υπόστρωμα στους 5°C. Τα σημεία εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα και οι καμπύλες είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

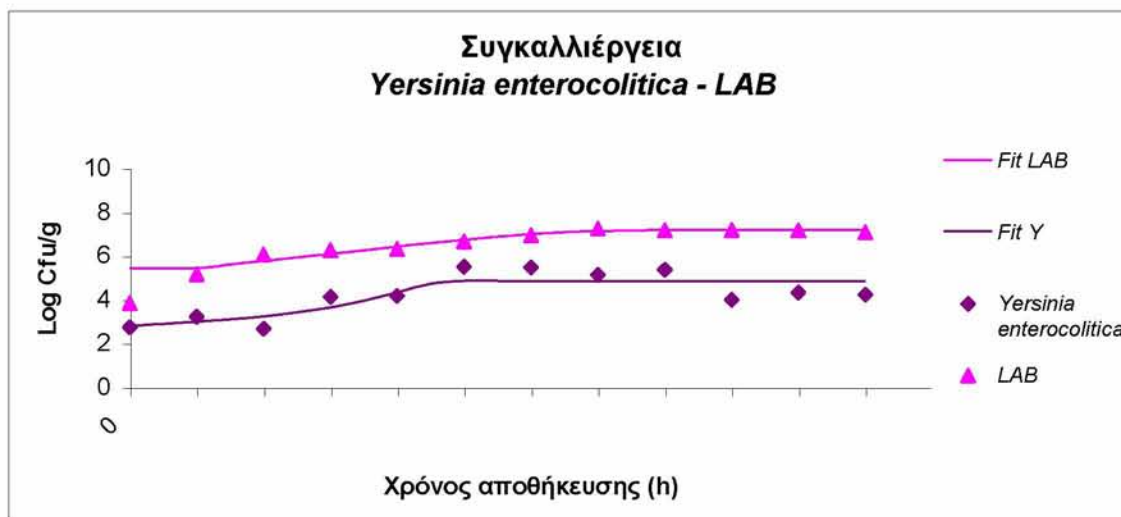
Στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. - *Yersinia enterocolitica* (PY), ο *Pseudomonas* spp. παρουσίασε αρχικό πληθυσμό $3,46 \pm 0,05$ και τελικό $8,01 \pm 0,05$ log cfu/g. Ο αρχικός πληθυσμός του *Y. enterocolitica* ήταν $3,48 \pm 0,05$, ενώ ο τελικός $9,06 \pm 0,04$ log cfu/g. (Σχ. 9). Το pH παρουσιάζει μείωση από τις 24 έως και τις 120 ώρες και απότομη αύξηση και παρουσία μέγιστου στις 144 ώρες (7,01) (Πιν. 3). Το συγκεκριμένο δείγμα ήταν το μοναδικό που παρουσίασε φάση προσαρμογής και για τους δύο μικροοργανισμούς. Στην συγκαλλιέργεια PY το *Pseudomonas* spp. εμφάνισε μία μείωση $0,006 \text{ h}^{-1}$ στον ρυθμό αύξησης του σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου ενώ η *Y. enterocolitica* ευνοήθηκε κατά $0,003 \text{ h}^{-1}$ (Πιν. 4).

Στη συγκαλλιέργεια *Yersinia enterocolitica* – οξυγαλακτικών (YLAB) καταμετρήθηκε ο αρχικός πληθυσμός του *Y. enterocolitica* και ήταν $2,74 \pm 0,03$, ενώ ο τελικός $4,23 \pm 0,05$ log cfu/g. Αντίστοιχα έγινε και η καταμέτρηση των οξυγαλακτικών, τα οποία εμφάνισαν αρχικό πληθυσμό $3,84 \pm 0,14$ και τελικό $7,09 \pm 0,01$ log cfu/g. (Σχ. 10). Παρουσιάστηκε στατική φάση στο *Y. enterocolitica* εντός 120 ωρών και στα

οξυγαλακτικά βακτήρια έπειτα από 168 ώρες. Το pH εμφάνισε ελάχιστο (6,38) στις 216 ώρες και μέγιστο στο τέλος των πειραμάτων. Όσον αφορά τον ειδικό ρυθμό αύξησης τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφάνισαν την μέγιστη μείωση $0,018 \text{ h}^{-1}$ ενώ το *Y. enterocolitica* παρουσίασε μείωση $0,005 \text{ h}^{-1}$ και επικράτησε έναντι των οξυγαλακτικών (Πιν. 4).



Σχήμα 9. Καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp. και του *Yersinia enterocolitica* σε συγκαλλιέργεια μοντέλου υποστρώματος στους 5°C. Τα σημεία εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα και οι καμπύλες είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

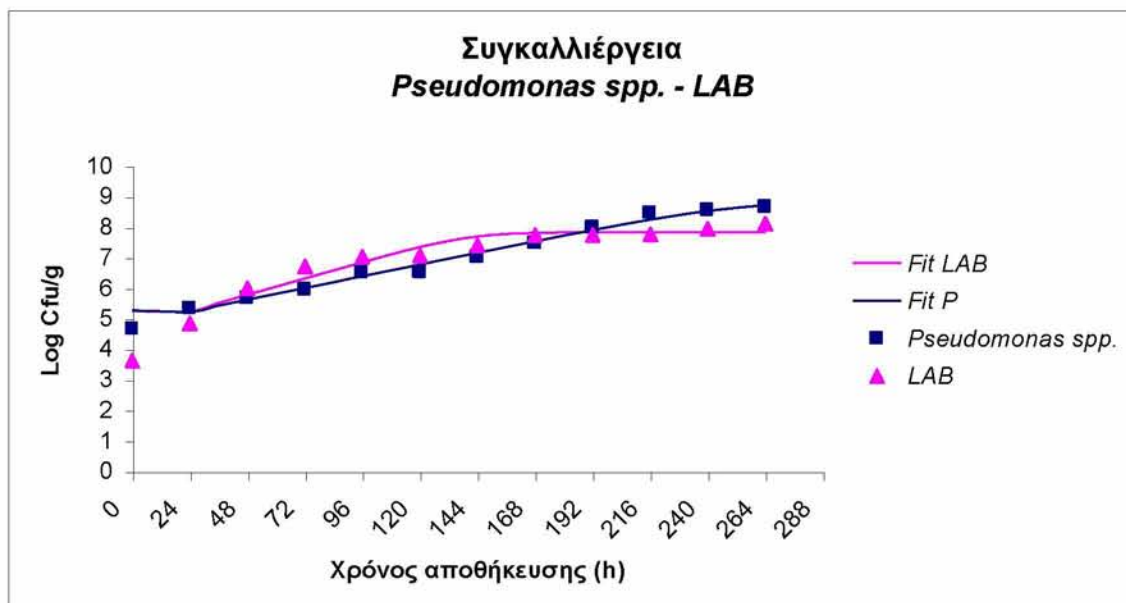


Σχήμα 10. Καταμέτρηση των *Yersinia enterocolitica* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε συγκαλλιέργεια των μοντέλων υποστρώματος στους 5°C. Τα σημεία εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα και οι καμπύλες είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

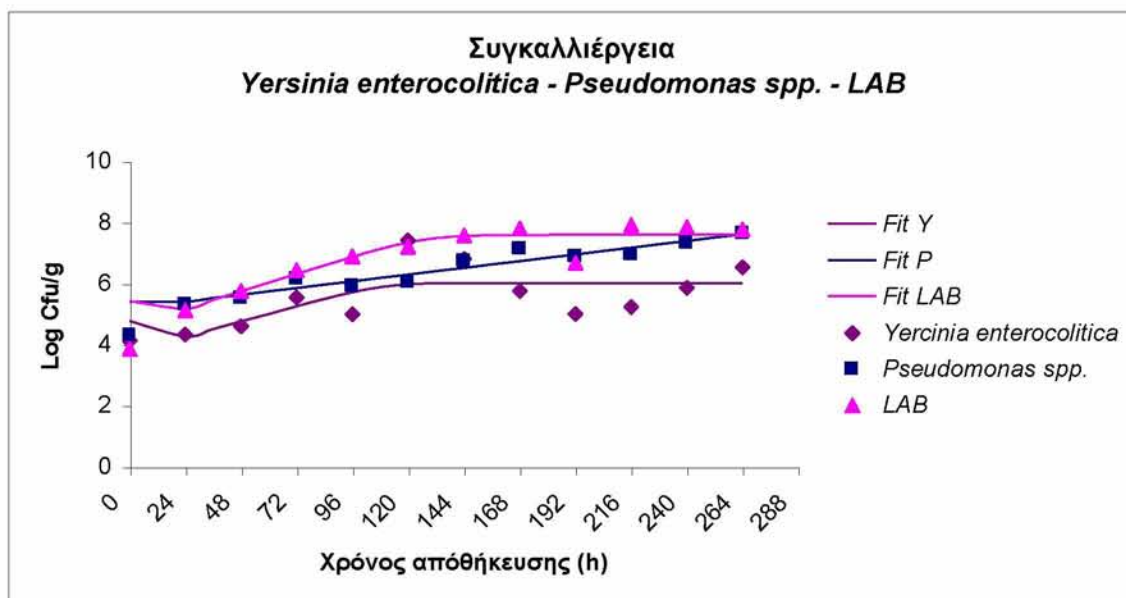
Στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. – οξυγαλακτικά βακτήρια (PLAB) ο *Pseudomonas* spp. είχε αρχικό πληθυσμό $4,65 \pm 0,00$, τελικό $8,66 \pm 0,07$ log cfu/g και έπειτα από τις 168 ώρες παρουσίασε στατική φάση. Τα οξυγαλακτικά βακτηρία (LAB) είχαν αρχικό $3,61 \pm 0,12$ και τελικό $8,11 \pm 0,04$ log cfu/g χωρίς να επέλθουν σε στατική φάση (Σχ. 11). Το pH είχε μέγιστο στις 216 ώρες (6,87) και ελάχιστο στις 192 (6,20) (Πιν. 3). Ο *Pseudomonas* spp. παρουσίασε μείωση $0,013 \text{ h}^{-1}$ στον ειδικό ρυθμό αύξησης ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια $0,009 \text{ h}^{-1}$ και φάνηκε να κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Πιν. 4).

Στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. – *Y. enterocolitica* – οξυγαλακτικά βακτήρια (PYLAB), ο αρχικός πληθυσμός του *Pseudomonas* spp. ήταν $4,29 \pm 0,20$, ενώ ο τελικός $7,62 \pm 0,00$ log cfu/g χωρίς την παρουσία στατικής φάσης. Το *Y. enterocolitica* είχε αρχικό πληθυσμό $4,12 \pm 0,03$ και τελικό $6,52 \pm 0,02$ log cfu/g με παρουσία στατικής φάσης από τις 120 ώρες. Αντίστοιχα, έγινε και η καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), τα οποία παρουσίασαν αρχικό πληθυσμό $3,84 \pm 0,14$ ενώ τελικό $7,76 \pm 0,04$ log cfu/g και εμφάνισαν στατική φάση εντός 144 ωρών (Σχ. 12). Το pH παρουσίασε ελάχιστο στις 24 ώρες (6,21) και μέγιστο στις 96 ώρες (6,45). Κυρίαρχα φάνηκαν να είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια με ειδικό ρυθμό αύξησης $0,018 \text{ h}^{-1}$ έπειτα το *Y. enterocolitica* με $0,013 \text{ h}^{-1}$ και τέλος το *Pseudomonas* spp. με $0,009 \text{ h}^{-1}$ (Πιν. 4). Στην συγκεκριμένη καλλιέργεια όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν μείωση σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες.

Στα μοντέλα υποστρώματος, δίνονται ο ειδικός ρυθμός αύξησης, η φάση προσαρμογής, ο αρχικός και ο τελικός πληθυσμός των *Pseudomonas* spp., του *Y. enterocolitica* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στον Πίνακα 4 ενώ τα αντίστοιχα pH στον Πίνακα 3.



Σχήμα 11. Καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp. σε GSP Agar και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε MRS, σε συν-καλλιέργεια των μοντέλων υποστρωμάτων στους 5°C. Τα σημεία εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα και οι καμπύλες είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).



Σχήμα 12. Καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp., *Y. enterocolitica* και οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), σε μοντέλο υποστρώμα σε συγκαλλιέργεια στους 5°C. Τα σημεία εμφανίζουν τους πληθυσμούς που έδωσαν τα πειράματα και οι καμπύλες είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994).

Συνοψίζοντας ο *Pseudomonas* spp. παρεμποδίζεται σε όλες τις συγκαλλιέργειες με μέγιστη παρεμπόδιση στη συγκαλλιέργεια με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η *Y. enterocolitica* παρεμποδίζεται στις συγκαλλιέργειες με τα οξυγαλακτικά βακτήρια και με τους *Pseudomonas* spp. – οξυγαλακτικά βακτήρια και ευνοείται με τον *Pseudomonas* spp.. Τέλος τα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται να παρεμποδίζονται σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια σε όλες τις συγκαλλιέργειες ωστόσο στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. – *Y. enterocolitica* – οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφανίζονται ως κυρίαρχα.

Πίνακας 3. Τιμές pH των *Pseudomonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, οξυγαλακτικά βακτήρια και όλων των πιθανών συνδυασμών τους σε εμβολιασμένο μοντέλο υπόστρωμα αποθηκευμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 5°C.

Χρόνος (h)	PH						
	<i>Pseudomonas</i> <i>spp.</i>	<i>Y.</i> <i>enterocolitica</i>	LAB	PY	YLAB	LABP	YLABP
0	6,30	6,53	6,47	6,44	6,45	6,48	6,40
24	6,01	6,31	6,36	6,04	6,35	6,26	6,21
48	6,18	6,23	6,31	6,12	6,31	6,31	6,25
72	6,10	6,35	6,52	6,23	6,30	6,48	6,34
96	6,15	6,09	6,43	6,17	6,37	6,36	6,45
120	6,31	6,21	6,35	6,03	6,36	6,37	6,36
144	6,93	6,97	Δ.Μ.	7,01	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.
168	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.
192	Δ.Μ.	Δ.Μ.	6,38	Δ.Μ.	6,25	6,20	6,26
216	Δ.Μ.	Δ.Μ.	6,44	Δ.Μ.	6,13	6,87	6,24
240	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.	Δ.Μ.
264	Δ.Μ.	Δ.Μ.	6,28	Δ.Μ.	6,38	6,39	6,30

- Δ.Μ. Δεν μετρήθηκε

Πίνακας 4. Κινητικές παράμετροι (μέσοι όροι \pm τυπ. αποκλιση, 3 επαναλήψεων) των *Pseudomonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και των συνδυασμών τους σε εμβολιασμένα μοντέλο υπόστρωμα αποθηκευμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 5°C.

		Ειδικός ρυθμός αύξησης (h ⁻¹)	Φάση προσαρμογής (h)	Αρχικός πληθυσμός (log ₁₀ Cfu/g)	Τελικός πληθυσμός (log ₁₀ Cfu/g)
<i>Pseudomonas</i> spp.		0,028 \pm 0,000	-	4,559 \pm 0,062	8,718 \pm 0,075
	<i>Y. enterocolitica</i>	0,028 \pm 0,000	-	2,392 \pm 0,028	> 7,944
	LAB	0,031 \pm 0,004	-	5,125 \pm 0,126	7,804 \pm 0,049
PY	P	0,022 \pm 0,000	36,072 \pm 5,015	4,605 \pm 0,031	> 8,023
	Y	0,031 \pm 0,004	61,627 \pm 5,582	4,345 \pm 0,602	> 9,208
YLAB	LAB	0,013 \pm 0,000	-	5,442 \pm 0,051	7,178 \pm 0,028
	Y	0,023 \pm 0,005	-	2,793 \pm 0,342	4,837 \pm 0,044
PLAB	P	0,015 \pm 0,000	-	5,274 \pm 0,041	8,909 \pm 0,000
	LAB	0,022 \pm 0,002	-	5,256 \pm 0,152	7,840 \pm 0,045
YPLAB	LAB	0,018 \pm 0,005	-	5,415 \pm 0,189	7,696 \pm 0,105
	P	0,009 \pm 0,000	-	5,412 \pm 0,217	> 7,611
	Y	0,013 \pm 0,007	-	4,576 \pm 0,324	6,046 \pm 0,000

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Φιλέτα αποθηκευμένα στους 5°C υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα

Οι πληθυσμοί στα φιλέτα της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των ψευδομονάδων, των αερομονάδων, των βακτηρίων που παράγουν H₂S, των εντεροβακτηρίων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφανίστηκαν σε αρχικές συγκεντρώσεις πάνω από 10⁴ cfu/g. Τα φιλέτα εμφάνισαν τελικούς πειραματικούς πληθυσμούς ολικής μικροβιακής χλωρίδας 8,4 στα εμβολιασμένα φιλέτα και 7,9 log cfu/g στα μη εμβολιασμένα. Παρόμοιους πληθυσμούς εμφανίζει και το πείραμα των Begdona et al. (2013) σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (CO₂ : 48% / N₂ : 50% / O₂ : 2%) σε φιλέτα σαυριδιού στους 2°C. Οι αρχικές συγκεντρώσεις στους ιχθύες είναι περίπου 10³ ωστόσο στα φιλέτα παρουσιάζετε μία αύξηση της OMX δεδομένου του γεγονότος ότι υπάρχουν περαιτέρω επιμολύνσεις κατά την φιλετοποίηση τους. Οι συγκεντρώσεις των τελικών πληθυσμών ήταν ιδιαίτερα αυξημένες διότι γνωρίζουμε ότι κατά το πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής των προϊόντων φθάνει σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 10⁷ με 10⁸ log cfu/g (Gram & Huss, 1996 ; Balamatsia et al., 2007).

Ο τελικός πληθυσμός των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) ήταν 6,3 log cfu/g για τα εμβολιασμένα φιλέτα με *Y. enterocolitica*. Όπως φαίνεται, παρουσιάζεται μία μείωση του τελικού πληθυσμού σε σχέση με τα φιλέτα των μαρτύρων τα οποία εμφάνισαν 7,4 log cfu/g. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των μικροοργανισμών ωστόσο κάτι τέτοιο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς (Gram, 1993). Όσον αφορά τα φιλέτα των μαρτύρων οι τελικοί πληθυσμοί ταυτίζονται με τους πληθυσμούς που παρουσίασαν οι Kykkidou et al. (2009) σε

συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4°C σε φρέσκα φιλέτα ξιφία, όπως και οι Tryfinopoulou et al. (2002) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα σε συνθήκες MAP (40% : CO₂ / 30% : N₂ / 30% : O₂).

Οι αερομονάδες (*Aeromonas* spp.) ήταν 7,1 log cfu/g για τα φιλέτα μαρτύρων και 7,6 log cfu/g για τα εμβολιασμένα φιλέτα. Όσον αφορά τους μάρτυρες, οι Hozbor et al. (2006) μελέτησαν τον πληθυσμό των αερομονάδων σε φιλέτα ατλαντικού σολωμού 0°C και παρουσίασαν πληθυσμούς περίπου 6 log cfu/g κάτι που δικαιολογείται λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας. Κοντά στους 7 log cfu/g παρουσίασαν και οι Davies & Slade το 1995 σε φιλέτα ιριδίζουσας πέστροφας αποθηκευμένα στους 5°C σε συνθήκες 60% : CO₂ / 40% : N₂.

Ο πληθυσμός των βακτηρίων που παράγουν H₂S καταμετρήθηκε στους 6 log cfu/g στα εμβολιασμένα φιλέτα και στους 7,4 log cfu/g στα μη. Οι Nosedá, et al. το 1993 μελέτησαν ανάλογους πληθυσμούς σε φιλέτα *Pangasius hypophthalmus* αποθηκευμένα στους 4°C και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (50% : CO₂ / 50% : N₂). Κάτι ανάλογο μελετήθηκε από τους Dalgaard, et al. (1993), σε φιλέτα μπακαλιάρου του ατλαντικού αποθηκευμένα σε συσκευασίες MAP στους 0°C και προέκυψαν παρεμφερείς πληθυσμοί με την παρούσα έρευνα.

Τα Enterobacteriaceae παρουσίασαν μεγάλη απόκλιση μεταξύ των φιλέτων που δεν είχαν εμβολιασθεί με αυτά που εμβολιάστηκαν με το παθογόνο σχεδόν 10² cfu/g. Τα φιλέτα τα οποία εμβολιάστηκαν εμφάνισαν πληθυσμό 7,8 log cfu/g ενώ τα φιλέτα μάρτυρες 5,4 log cfu/g. Πληθυσμούς κοντά στο 5,4 log cfu/g εμφανίζουν και οι Arashisar et al. (2004) σε παρόμοιες συνθήκες (2.5% : O₂ / 7.5% : N₂ / 90% : CO₂) στους 4°C. Όσον αφορά τα φιλέτα τα οποία εμβολιάστηκαν, παρουσίασαν

αναμενόμενα αποτελέσματα δεδομένου του γεγονότος ότι η *Y. enterocolitica* ανήκει στα Enterobacteriaceae και καταμετράτε σε VRBGA (Bottone, 1993).

Ο τελικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) ήταν 5,9 log cfu/g στα φιλέτα τα οποία δεν εμβολιάστηκαν, αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Tsironi et al. (2011) οι οποίοι εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα στις ίδιες ώρες με το πείραμα μας σε θερμοκρασία 5°C και συνθήκες MAP (35% : CO₂). Τα εμβολιασμένα φιλέτα εμφάνισαν τελικό πληθυσμό 6,4 log cfu/g, ωστόσο δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη για να επέλθει σύγκριση.

4.2 Μοντέλα υποστρώματα αποθηκευμένα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 5°C

Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. μονοκαλλιέργεια εμφάνισε τελικό πληθυσμό 8,7 log cfu/g. Παρόμοιοι πληθυσμοί εμφανίζονται και στα αποτελέσματα των Eyles et al., (1993) σε μοντέλο υπόστρωμα ωστόσο δεν υπήρξε επακριβή ταύτιση, διότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μίγματα αερίων στην κάθε συσκευασία. Η *Y. enterocolitica* παρουσίασε τελικό πληθυσμό σε καλλιέργεια μόνη της 7,8 log cfu/g και παρουσίασε αποτελέσματα τα οποία ήταν συναφή με τους Vereecken et al. (2003) αν και το εν λόγω πείραμα έγινε σε θερμοκρασία 37°C. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφάνισαν τελικό πληθυσμό 8,1 log cfu/g κάτι που έχει παρατηρηθεί και από τον Françoise (2010) ότι μερικοί *Lactobacillus* και *Carnobacterium* μπορούν να επιβιώνουν και να αντιστέκονται σε διάφορες συνθήκες επιβεβαιώνεται και στην παρούσα έρευνα.

Στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. –*Y. enterocolitica*, ο *Pseudomonas* spp. παρουσίασε τελικό πληθυσμό 8 και η *Y. enterocolitica* 9 log cfu/g. Σύμφωνα με τους

Schiemann & Olson το 1984, οι οποίοι μελέτησαν την ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* σε συγκαλλιέργειες με άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια στους 32°C σε αερόβιες συνθήκες προέκυψε ότι η *Y. enterocolitica* επηρεαζόταν από την παρουσία των άλλων μικροοργανισμών και δεν έφτανε σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Αντίθετα στα αποτελέσματα τις δικής μας έρευνας παρουσιάζεται η επικράτηση της *Y. enterocolitica* σε σχέση με τους ψευδομονάδες.

Στη συγκαλλιέργεια *Y. enterocolitica* - οξυγαλακτικά βακτήρια, η *Y. enterocolitica* παρουσίασε τελικό πληθυσμό 4,2 και τα οξυγαλακτικά βακτήρια 7 log cfu/g. Κάτι παρόμοιο αναφέρεται και από τους Vereecken et al., 2003, οι οποίοι μελέτησαν το παθογόνο *Y. enterocolitica* σε συγκαλλιέργεια με το *Lactobacillus sakei*. Η μελέτη έγινε σε μοντέλο υπόστρωμα στους 37 και 4°C αυτό που προέκυψε είναι ότι η *Y. enterocolitica* εμφανίζει απότομη πτώση όταν το *L. sakei* παρουσιάζετε σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Η ανασταλτική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλετε στην καμπύλη παραγωγής γαλακτικού οξέως το οποίο επηρεάζει τα παθογόνα και εισέρχονται πρόωρα στη στατική φάση. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Janssen et al., 2006. Οι Jeppesen & Huss το 1993 ασχολήθηκαν με την μελέτη των παθογόνων μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *Y. enterocolitica* σε συγκαλλιέργειες με τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Leuconostoc* spp. και το *Lactobacillus plantarum*σε. Στην μελέτη που διεξήχθη σε μοντέλο μαγειρεμένων αποφλοιωμένων γαρίδων στους 5°C παρουσιάστηκε το ίδιο φαινόμενο σε συνθήκες αέρα.

Στην συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. - LAB, ο *Pseudomonas* spp. παρουσίασε τελικό πληθυσμό 8,6 και τα οξυγαλακτικά βακτήρια 8,1 log cfu/g. Λόγω των συνθηκών MAP θεωρητικά οι ψευδομονάδες θα έπρεπε να αναστέλλονται και τα οξυγαλακτικά να ευνοούνται, ωστόσο τα αποτελέσματα εμφάνισαν το αντίθετο. Αυτό θα μπορούσε να

αιτιολογηθεί λόγω των στελεχών αλλά και του μίγματος των αερίων που χρησιμοποιήθηκαν (Koutsoumanis et al., 2000).

Στην συγκαλλιέργεια *Y. enterocolitica* – *Pseudomonas* spp. - LAB, η *Y. enterocolitica*. παρουσίασε τελικό πληθυσμό 6,5 log cfu/g. Ο *Pseudomonas* spp. 7,6 και τα οξυγαλακτικά βακτήρια 7,7 log cfu/g. Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρουσιάστηκε από τους Tsigarida et al. (2003) οι οποίοι μελέτησαν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών *S. putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* και *Pseudomonas* spp. σε μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες μεταξύ τους σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι ο *Pseudomonas* spp. κυριάρχησε στα δείγματα που ήταν με την *S. putrefaciens* και στο δείγμα με τον *Brochothrix thermosphacta* ωστόσο δεν ευνοήθηκε στο δείγμα και των τριών μικροοργανισμών και κυριάρχησε το *Brochothrix thermosphacta*. Η κυριάρχηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να επιβεβαιώνεται και από τους Bagi & Buchanan (1993) οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν την τάση να επιβιώνουν σε μοντέλα καλύτερα από τα αρνητικά κατά Gram.

Γενικότερα από μελέτες έχει προκύψει ότι θα πρέπει να ερευνηθεί εις βάθος η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών είτε στη σάρκα ψαριού είτε σε μοντέλα υποστρώματα για να κατανοηθούν επακριβώς οι μηχανισμοί της αλλοίωσης σε ιχθύες (Drosinos & Nychas, 1997 ; Pin et al., 2002).

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Στο μοντέλο υπόστρωμα το *Pseudomonas* spp. παρεμποδίζεται σε όλες τις συγκαλλιέργειες με μέγιστη την παρεμπόδιση του από τα οξυγαλακτικά στη συγκαλλιέργεια του με αυτά.
- ✓ Τα οξυγαλακτικά φαίνεται να παρεμποδίζονται σε όλες τις συγκαλλιέργειες σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια, ωστόσο στη συγκαλλιέργεια *Pseudomonas* spp. – *Y. enterocolitica* – οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφανίζονται ως κυρίαρχα
- ✓ Το *Y. enterocolitica* φαίνεται να ευνοείται στη συγκαλλιέργεια με τον *Pseudomonas* spp. στο μοντέλο υπόστρωμα και να παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια.
- ✓ Συνοψίζοντας, το *Y. enterocolitica* παρεμποδίζεται σε συγκαλλιέργειες όπου υπάρχουν οξυγαλακτικά βακτήρια.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξένη Βιβλιογραφία

- Ackman R.G. (1995) Composition and Nutritive Value of Fish and Shellfish Lipids. In A. Ruiter (Ed), Fish and Fishery products, composition, Nutritive Properties and Stability, UK, p117-156.
- Adams M.R., Nicolaides L. (1997) Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8:227-239.
- Arashisar S., Hisar O., Kaya M., Yanik T. (2004) Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 209– 214.
- Bagi L. K., Buchanan R. L. (1993) Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Letters in Applied Microbiology*, 17(1):37-39.
- Balamatsia C.C., Patsias A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2007) Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: Correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*, 104:1622–1628.
- Ballestra P., Abreu Da Silva A., Cuq J.L. (1996) Inactivation of *Escherichia coli* by Carbon Dioxide under Pressure. *Journal of Food Science*, 61(4):829-831.
- Baranyi J. Roberts T.A. (1994) A dynamic approach to predicting microbial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23:277-294.
- Begõna A., Hernández I., Baliño-Zuazo L., Barranco A. (2013) Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets (*Trachurus trachurus*) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures. *Journal of Science and Food Agriculture*, 93: 2179-2187.
- Boddy L., Wimpenny J.W.T. (1992) Ecological concepts in food Microbiology. *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement*, 73:23-38.

- Bottone E.J. (1999) Review: *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*, 1:323-333.
- Brody A.L. (1989) Modified atmosphere packaging of seafoods. In: Controlled/modified atmosphere/vacuum packaging of foods. Food and Nutrition Press, Inc., Connecticut, USA, p 59-65.
- Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283-294.
- Dalgaard P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26:319-333.
- Davis A.R., Slade A. (1995) Fate *Aeromonas* and *Yersinia* on modified-atmosphere-packaged (MAP) cod and trout. *Letters in Applied Microbiology*, 21: 354-358.
- Debevere J., Boskou G. (1996) Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA – producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 31:221-229.
- Drosinos E.H., Nychas G.J.E. (1996) *Brochothrix thermosphata*, a dominant organism in mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere. *Italian Journal of Food Science*, 4:323-329.
- Drosinos E. H., Nychas G.-J.E. (1997) Production of acetate and lactate in relation to glucose content during modified atmosphere storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) at 0±1°C. *Food Research International*, 30:711–717.
- Ellis R.J., Timms-Wilson T.M., Bailey M.J. (2000) Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environment Microbiology*, 2:274-284.
- Erkmen O. (1997) Antimicrobial Effect of Pressurized Carbon Dioxide on *Staphylococcus aureus* in Broth and Milk. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 826–829.
- Erkmen O. (2000) Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide. *Food Microbiology*, 17: 225-232.

- Eyles M.J., Moir C.J., Davey J.A. (1993) The effects of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic pseudomonads on a surface in a model system. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 97-107.
- Françoise L. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27: 698-709.
- Gennari M., Leo C., Bracci S., Tomaselli S. (1999) Modificazioni della microflora aerobica presente sulla cute e nelle branchie delle sarde (*Chupea pilchardus*) durante la conservazione in ghiaccio. Prima nota. *Arch Vet It*, 37:1-16.
- Gill C.O., Reichelt M.P. (1989) Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiology*, 6:223-230.
- Gram L. (1990) Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice and at ambient temperature. Paper presented at SEAFOOD 2000 in Halifax, Canada. 12-16 May 1990.
- Gram L. (1993) Inhibitory Effect against Pathogenic and Spoilage Bacteria of *Pseudomonas* Strains Isolated from Spoiled and Fresh Fish. *Applied And Environmental Microbiology*, 59(7) : 2197–2203.
- Gram L., Huss H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33:121-37.
- Gram L., Ravn L., Rasch M., Bartholin Bruhn J., Christensen A.B., Givskov M. (2002) Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78:79– 97.
- Hintlian C.B., Hotchkiss, J.H. (1986) The safety of modified atmosphere packaging: a review. *Journal Food Technology*, 40:70-76.
- Huis in't Veld J.H.J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33:1-18.
- Huss H.H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technological Paper 348*, FAO, Rome, Italy.

- Hozbor M.C., Saiz A.I., Yeannes M.I., Fritz R. (2006) Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). LWT-Food Science and Technology, 39: 99-104.
- Janssen M., Geeraerd A.H., Logist F., De Visscher Y., Vereecken K.M., Debevere J., Devlieghere F., Van Impe J.F. (2006) Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. International Journal of Food Microbiology, 111: 59–72.
- Jeppesen V.F. & Huss H.H. (1993) Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. International Journal of Food Microbiology, 19: 179-186.
- Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. (1999) Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. Applied Environmental Microbiology, 65:698–706.
- Koutsoumanis K., Taoukis P.S., Drosinos E.H., Nychas G.J.E. (2000) Applicability of an Arrhenius Model for the Combined Effect of Temperature and CO₂ Packaging on the Spoilage Microflora of Fish. Applied Environmental Microbiology, 66(8): 3528–3534.
- Koutsoumanis K., Giannakourou M.C., Taoukis P.S., Nychas G.J.E. (2002) Application of Shelf Life Decision System (SLDS) to marine cultured fish quality. International Journal of Food Microbiology, 73:375-82.
- Kykkidou S., Giatrakou V., Papavergou A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2009) Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. Food Chemistry, 115: 169–175.
- Lyver A., Smith J.P., Tarte I., Austin J. Blanchfield B. (1998a) Competitive inhibition of *Clostridium botulinum* type E by *Bacillus* species in a modified atmospheres. Food Research International, 31:311-319.

- Lyver A., Smith J.P., Tarte I., Farber J.J. Natress F.M. (1998b) Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in a value-added seafood product stored under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 15:379-389.
- Montero D., Grasso V., Izquierdo M.S., Ganga R., Real F., Tort L., Caballero M.J. Acosta F. (2008) Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 24:147-155.
- Nosedá B., Islam Md.T., Eriksson M., Heyndrickx M., De Reu K., Van Langenhove H., Devlieghere F. (2012) Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology*, 30:408-419.
- Oberlender V., Hanna M.O., Miget R., Vanderzant C. Finne G. (1983) Storage characteristics of fresh sword-fish steaks stored in carbon dioxide-enriched controlled (flow-trough) atmospheres. *Journal of Food Protection*, 46: 434-440.
- O'Connor-Shaw R.E., Reyes V.G. (1999) *Use of Modified-atmosphere Packaging*. Academic Press.
- Parry R.T. (1993) Introduction. In: *Principles and applications of modified atmosphere packaging of food*. Blackie Academic & Professional, London, p 1-18.
- Pin, C., D. García de Fernando, J. Gonzalo, and A. Ordóñez. 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied Environmental Microbiology* 68:4441–4447.
- Schiemann D.A., Olson S.A. (1984) Antagonism by Gram-Negative Bacteria to Growth of *Yersinia enterocolitica* in Mixed Cultures. *Applied And Environmental Microbiology*, 48(3): 539-544.
- Siliker J.H., Wolfe S.K., (1980) Microbiological safety considerations in controlled-atmosphere storage of meats, *Food Technology*, 34:59-63.

- Simeonidou S., Govaris A., Vareltzis K. (1998) Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International*, 30:479-84.
- Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes J.T. (2002) A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37:107-127.
- Soccol M.C.H., Oetterer M. (2003) Use of Modified Atmosphere in Seafood Preservation, *An International Journal*, 46(4): 569-580.
- Stiles M.E. (1991) Scientific principles of controlled/modified atmosphere packaging. In: Ooraikul B. & Stiles M.E. (eds) *Modified Atmosphere Packaging of Food*. Horwood E, London, p 18-25.
- Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. (1999) Use of time temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 53:21-31.
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.-J.E. (2002) Characterization of *Pseudomonas* spp. Associated with Spoilage of Gilt-Head Sea Bream Stored under Various Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 65–72.
- Tsigarida E., Boziaris I.S., Nychas G.-J.E. (2003) Bacterial Synergism or Antagonism in a Gel Cassette System. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(12) : 7204–7209.
- Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E., Taoukis P.S. (2011) Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1156-1163.
- Veranth M.F., Robe K. (1979) CO₂-enriched atmosphere keeps fish fresh more than twice as long. *Food Process*, 40:76-79.

Vereecken K.M., Devlieghere F., Bockstaele A., Debevere J., Van Impe J.F. (2003) A model for lactic acid-induced inhibition of *Yersinia enterocolitica* in mono- and coculture with *Lactobacillus sakei*. Food Microbiology, 20:701–713.

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Στρατάκος Α.Χ. (2011) Τεχνολογίες επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσ/νίκη, σελ. 12: 217-225.

Βαρελτζής Κ. (1999) Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλιευμάτων. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. Θεσ/νίκη, σελ. 63-64.

Στεργίου Ι.Κ., Καραχλέ Κ.Π., Τσίκληρας Α., Μαμαλάκης Η. (2011) Κραυγή ιχθύος ~ Ψάρια των ελληνικών θαλασσών ~ Βιολογία-Αλιεία-Διαχείριση. Εκδόσεις Πατάκη. Αθήνα, σελ. 278-280.

6.3 Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

http1 : FAO. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en#tcNA00EA

(Πρόσβαση: 10-08-2013)

7 ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the fate of the pathogen *Yersinia enterocolitica* in competition with other fish, spoilage microorganisms on sea bream (*Sparus aurata*) fillets and on model fish substrate. The experiments were conducted in conditions of modified atmosphere (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) and cold storage at 5 ° C. The model was consisted of sea bream juice and agar, thus investigation of the population changes of *Y. enterocolitica* in co-culture and monoculture with *Pseudomonas* spp. and lactic acid bacteria (LAB) was feasible.

In fillets inoculated with *Y. enterocolitica* the total viable counts, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. and lactic acid bacteria reached faster their stationary phase compared to the control fillets. The H₂S producing bacteria exhibited lower populations in fillets inoculated with *Yersinia* and also counts in VRBGA had a sharp increase. In model fish substrate *Pseudomonas* spp. was inhibited in all co-cultures while the maximum inhibition occurred in co-culture with LAB. The *Y. enterocolitica* was inhibited in co-cultures with LAB and *Pseudomonas* spp. - LAB and benefited in co-culture with *Pseudomonas* spp.. Finally LAB were slightly inhibited in all co-cultures compared to its monoculture but in co-culture with *Pseudomonas* spp. and *Y. enterocolitica* were dominant.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., *Lactic acid bacteria*, Spoilage, *Sparus aurata*.