

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αξιολόγηση θρεπτικών υλικών για την καταμέτρηση μικροβιακών
πληθυσμών σε νοπούς ιχθύες»**

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΑΚΑΣΗΣ

ΒΟΛΟΣ 2011

**«Αξιολόγηση θρεπτικών υλικών για την καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών σε
νωπούς ιχθύες»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

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

2) Κωνσταντίνος Κορμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,

3) Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

Ευχαριστώ τους γονείς μου για την υπομονή,
την Παρλαπάνη Φωτεινή καθώς και τον καθηγητή
μου Μποζιάρη Ιωάννη για την βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Αλιεύματα.....	1
1.2 Αλλοίωση ιχθύων.....	1
1.3 Θρεπτικά υλικά.....	3
1.4 Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	4
1.4.1 Κλασσικές μέθοδοι.....	5
1.4.2 Μοριακές μέθοδοι.....	6
1.5 Αντικείμενο και στόχοι της πτυχιακής εργασίας.....	7
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	8
2.1 Προμήθεια και συντήρηση ιχθύων.....	8
2.2 Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων.....	8
2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά.....	8
2.2.2 Προετοιμασία δείγματος.....	11
2.3 Στατιστική επεξεργασία.....	13
2.4 Χαρακτηρισμός βακτηρίων.....	13
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	18
3.1 Καταμέτρηση του πληθυσμού της OMX σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.....	18
3.2 Καταμέτρηση αλλοιωγόνων βακτηρίων σε εκλεκτικά υλικά κατά τη συντήρηση τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>) στους 5 ⁰ C.....	20
3.3 Έλεγχος της εκλεκτικότητας των υλικών.....	21
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	29
4.1 OMX σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα.....	29

4.2 Καταμέτρηση βακτηρίων σε εκλεκτικά υλικά κατά τη συντήρηση τσιπούρας...	30
4.3 Έλεγχος εκλεκτικότητας υλικών.....	31
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	33
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	34
6.2 Ελληνική βιβλιογραφία.....	37
7. ABSTRACT.....	38
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού στα αλιεύματα και η εύρεση του καταλληλότερου υλικού, πιο συγκεκριμένα αυτού που θα μας δώσει τον μεγαλύτερο πληθυσμό Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX). Επίσης ελέγχθηκε η εκλεκτικότητα των κυριότερων εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών που συνεισφέρουν στην αλλοίωση των αλιευμάτων.

Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) οι οποίοι αποθηκεύτηκαν στους 5⁰C. Μετά την παρασκευή των θρεπτικών υλικών ακολούθησε δειγματοληψία από την σάρκα των ιχθύων, όπου έγινε και η καταμέτρηση της (OMX). Από τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, το TSA(Tryptone Soy Agar) με 9,23 log cfu/g φαίνεται να υποστηρίζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη μικροοργανισμών σε σχέση με τα άλλα υλικά. Αντίθετα το IA(Iron Agar) 2,5% παρουσιάζει την χαμηλότερη ανάπτυξη με 8,29 log cfu/g.

Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εκλεκτικότητας των υλικών. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι στο υλικό VRBGA(Violet Red Bile Glucose Agar) μπορούμε να απομονώσουμε και καταμετρήσουμε Εντεροβακτήρια μετρώντας αποικίες με συγκεκριμένες μορφολογικές ιδιότητες. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι στο CFC(Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar) αναπτύσσονται κυρίως *Pseudomonas*, και παράλληλα στο TCBS(Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν ανήκαν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τέλος, στο SAA(Starch Ampicillin Agar) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κυρίως *Pseudomonas* sp.

Λέξεις κλειδιά: Εκλεκτικότητα υλικών, Βιοχημικές δοκιμές, Αλλοίωση.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλιεύματα

Τα αλιεύματα από αρχαιοτάτων χρόνων κατέχουν σημαντική θέση στις διατροφικές- διαιτητικές συνήθειες του ανθρώπου (Ackman, 1995). Τα κύρια συστατικά της σάρκας τους είναι οι πρωτεΐνες σε ποσοστό 6-28%, οι λιπαρές ουσίες σε ποσοστό 0,1-67% και το νερό σε ποσοστό 28-96% (Huss, 1995), ενώ το συνολικό ποσοστό του περιεχόμενου λίπους και νερού στη σάρκα των ψαριών ανέρχεται σε 80% περίπου (Ackman, 1995). Επίσης, τα αλιεύματα αποτελούν τη μοναδική φυσική πηγή από την οποία μπορεί να προμηθευτεί ο ανθρώπινος οργανισμός τα EPA (εικοσιπενταενοϊκό οξύ) και DHA (εικοσιδύο-εξαενοϊκό οξύ), τα οποία αποτελούν τους σημαντικότερους εκπροσώπους της σειράς ω-3 των Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων (ΠΑΛΟ) και το λινολεϊκό οξύ της σειράς ω-6 (Montero *et al.*, 2008).

1.2 Αλλοίωση ιχθύων

Η αλλοίωση των ιχθύων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσεως μικροοργανισμών, ενζύμων (αυτόλυση) αλλά και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (τάγγιση), κυρίως όμως για τα λιπαρά ψάρια (Ashie *et al.*, 1996). Μεταξύ αυτών των κατηγοριών, η μικροβιακή δράση αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα που επιδρά στην αλλοίωση των νωπών ιχθύων. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για τη μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα είναι κυρίως αυτοί της αρχικής μικροχλωρίδας του τροφίμου και αυτοί οι οποίοι προέρχονται από επιμόλυνση (Huss, 2000). Στην εξωτερική επιφάνεια των ζωντανών ψαριών, στα βράγχια και στο πεπτικό τους σύστημα ανευρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί, η είσοδος των οποίων αποτρέπεται από τη φυσική άμυνα του οργανισμού τους (Adams and Moss, 1995). Μετά το θάνατο

των ψαριών, οι μικροοργανισμοί αυτοί εισέρχονται και διαχέονται στη σάρκα όπου αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έντονους ρυθμούς. Οι νωποί ιχθύες αποικούνται από μικροοργανισμούς οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος (από 10^2 έως 10^7 cfu/cm²) (Liston, 1980) στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα (10^3 και 10^9 cfu/g, αντίστοιχα) (Shewan, 1962). Η φυσική μικροχλωρίδα των ιχθύων που προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης αποτελείται από ψυχρότροφα, αερόβια και αναερόβια αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram and Huss, 1996: Huis in't Veld, 1996).

Στα νωπά αλιευτικά προϊόντα η κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη των Ειδικών Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών (EAM) (Gram and Huss, 1996). Πιο συγκεκριμένα, η αλλοίωση των ιχθύων είναι αποτέλεσμα μεταβολών στην οσμή και τη γεύση που προέρχονται από την παραγωγή ουσιών, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των μικροοργανισμών αυτών - EAM (Gram and Huss, 1996: Koutsoumanis and Nychas, 1999). Έως σήμερα, οι EAM που έχουν ανευρεθεί σε αλλοιωμένους ιχθύες των εύκρατων και τροπικών υδάτων, οι οποίοι είχαν συντηρηθεί σε πάγο, είναι τα *Pseudomonas* spp. και *Shewanella putrefaciens*, ενώ αυτοί που είχαν αποθηκευθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος κυριαρχούνταν κυρίως από βακτήρια της οικογένειας Vibrionaceae (Gram, 1990). Οι ιχθύες των θερμότερων θαλασσινών νερών σε συσκευασίες κενού και σε μείγμα αερίων, αποθηκευμένοι υπό ψύξη, ευνοούν την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lannelonque *et al.*, 1982) και του *Brochothrix*

thermosphacta (Drosinos and Nychas, 1996). Επιπλέον, ιχθύες των ψυχρών θαλασσών των εύκρατων κλιμάτων, οι οποίοι συντηρούνται σε κενό αποτελούνται κυρίως από το *Photobacterium phosphoreum* και το *Shewanella putrefaciens*, ενώ ιχθύες που συντηρούνται σε συσκευασία μείγματος αερίων αποτελούνται κυρίως από το *Photobacterium phosphoreum* (Dalgaard *et al.*, 1995).

1.3 Θρεπτικά υλικά

Η απομόνωση, διατήρηση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά τα οποία τους είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης το pH των θρεπτικών υλικών θα πρέπει να είναι κοντά σε βέλτιστη τιμή για να επιτευχθεί η άριστη ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Γενικά τα θρεπτικά υποστρώματα θα πρέπει να περιλαμβάνουν τα εξής συστατικά για την αύξηση των μικροοργανισμών: α) Μία ή περισσότερες πηγές άνθρακα, β) μια πηγή αζώτου, γ) βιταμίνες, δ) ανόργανα άλατα, ε) ιχνοστοιχεία. Τα θρεπτικά υποστρώματα μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας πηκτικός παράγοντας. Το πιο συνηθισμένο πηκτικό συστατικό που χρησιμοποιείται είναι το άγαρ. Το συστατικό αυτό προέρχεται από συγκεκριμένα φύκη (ροδοφύκη).

Τα θρεπτικά υποστρώματα διακρίνονται σε γενικά (μη εκλεκτικά) και σε εξειδικευμένα υποστρώματα (εκλεκτικά). Τα γενικά υποστρώματα περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών. Τα εξειδικευμένα ή εκλεκτικά υποστρώματα είναι εκείνα τα υποστρώματα που περιέχουν ένα ή περισσότερους παρεμποδιστικούς παράγοντες οι οποίοι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων ομάδων μικροοργανισμών, αλλά επιτρέπουν την ανάπτυξη στην

ομάδα που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους

- Με την διόρθωση του pH στο θρεπτικό υπόστρωμα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το θρεπτικό υλικό MRS Agar (de Man, Rogosa and Sharpe). Το pH αυτού του υλικού είναι 5,7-6,2 και χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση και απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων
- προσθήκη αντιβιοτικών ή
- άλλων ουσιών, που αναστέλλουν την δράση των μη επιθυμητών μικροοργανισμών (Πίν. 1.1)

Πίνακας 1.1: Εξειδικευμένα υποστρώματα που περιέχουν αντιβιοτικά/εκλεκτικές ουσίες. Προσαρμογή από Μποζιάρης (2010)

Θρεπτικό Υλικό	Αντιβιοτικό/συστατικό	Χρησιμοποιείται για απομόνωση/απαρίθμηση
Pseudomonas Agar	Cetrimide Fusidin Cephaloridine	Pseudomonas
Starch Ampicillin Agar	Ampicillin	Aeromonas
Rose Bengal Chloramphenicol Agar	Chloramphenicol	Ζύμες και μύκητες
Violet Red Bile Glucose Agar	Crystal violet, Bile salts	Enterobacteriaceae

1.4 Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση μικροοργανισμών

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών των τροφίμων αποτελεί επίπονη και συχνά δαπανηρή διαδικασία. Μπορεί να γίνει με κλασσικές μεθόδους ή μοριακές.

1.4.1 Κλασσικές μέθοδοι

Οι κλασσικές μέθοδοι βασίζονται στη μελέτη των μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών.

Μορφολογικά χαρακτηριστικά: Η μορφολογία και το χρώμα των αποικιών, το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων, τα δομικά χαρακτηριστικά (π.χ. η αντίδραση των κυττάρων στην χρώση Gram), η κίνηση ή όχι, η δημιουργία ενδοσπορίων καθώς και το μέγεθος και σχήμα αυτών.

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά: Η αφομοίωση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου, οι θερμοκρασίες ανάπτυξης, το εύρος αντοχής σε διάφορες συνθήκες, η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικές ουσίες καθώς και τα μεταβολικά προϊόντα, αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά που περιγράφουν την φυσιολογία των μικροοργανισμών. Διάφορες τυποποιημένες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με βάση τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά και μία από αυτές βασίζεται στη χρήση των API. Το σύστημα API περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Buissiere and Nardon (1968), και ο σκοπός της χρήσης τους είναι η ταχεία μελέτη του μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Η ιδέα όμως υπήρχε από το 1952 όπου οι Clarke and Cowan (1952), ανέπτυξαν μία σειρά από μικρο-μεθόδους κατά τις οποίες δημιούργησαν κατάλληλα υποστρώματα που περιείχαν ένζυμα για την δράση των μικροοργανισμών. Πίστευαν, όπως ομοίως και οι Manclark and Picklett (1961), ότι με αυτές τις δοκιμές είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός των βακτηρίων οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αντιδρούν στα συστατικά αυτών των υποστρωμάτων (ένζυμα). Σήμερα, αρκετά εργαστήρια χρησιμοποιούν τις δοκιμές των API για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών όπου με την χρήση αυτών μπορεί να μελετηθεί η

αφομοίωση διαφόρων υποστρωμάτων ανάλογα με την κατηγορία των μικροοργανισμών και τις μεταβολικές ιδιότητες που εξετάζονται (Cowan and Steel, 1993).

1.4.2. Μοριακές μέθοδοι

Η ανάγκη γρήγορης και έγκυρης ανίχνευσης των βακτηρίων έφερε την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, οι οποίες αναπτύχθηκαν με σκοπό να απαλείψουν τις αδυναμίες των κλασσικών μεθόδων ανίχνευσης. Οι βασικές μοριακές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι:

α) Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η (PCR) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση (δημιουργία πολλών αντιγράφων) ενός τμήματος DNA. Η PCR επιτρέπει σε μια μικρή ποσότητα DNA να αντιγραφεί πολλές φορές ώστε να είναι αρκετή και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία στάδια i) την αποδιάταξη του DNA στόχου ii) Σύνδεση των εκκινήτων στα άκρα του DNA – στόχου iii) Επέκταση των συμπληρωματικών αλυσίδων με την χρήση της Taq- πολυμεράσης. Επίσης στην PCR κάνουμε χρήση του γονιδίου 16sRNA, το οποίο είναι ένα γονίδιο από το μιτοχondριακό (mt) DNA, με χαρακτηριστικό ότι δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω του γεννήτορα, και το χρησιμοποιούμε για ταυτοποίηση των ειδών που μελετούμε.

β) Η τεχνική του υβριδισμού. Η τεχνική του υβριδισμού βασίζεται στην ομοιότητα του βακτηριακού DNA με την αλληλουχία του ιχνηθέτη που έχουμε επιλέξει. Στη συνέχεια η πρόσδεση του ιχνηθέτη με το βακτηριακό DNA γίνεται με

διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα σημαίνοντας τμήματα DNA με φοριζουσες ουσίες,

γ) Η αλληλούχιση. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι αλληλούχισης, οι οποίοι έχουν σαν σκοπό την αποτύπωση των βάσεων (A,G,T,U) από τις οποίες αποτελείται η νουκλεοτιδική αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.

1.5 Αντικείμενο και στόχοι της πτυχιακής εργασίας

Αντικείμενο της συγκεκριμένης έρευνας ήταν:

α) η διερεύνηση του καταλληλότερου υλικού για την καταμέτρηση του πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) σε νωπά αλιεύματα. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης και καταμέτρησης της OMX σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου, δηλαδή του υλικού στο οποίο είναι δυνατόν να καταμετρηθεί ο μεγαλύτερος πληθυσμός της OMX.

β) ο έλεγχος της εκλεκτικότητας των κυριότερων εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών που συνεισφέρουν στην αλλοίωση των αλιευμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προμήθεια και συντήρηση ιχθύων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αγοράστηκαν ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) από την αγορά του Βόλου, οι οποίες προέρχονταν από μονάδα υδατοκαλλιέργειας. Μεταφέρθηκαν μέσα σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο στο χώρο του εργαστηρίου εντός 20 min από την αγορά τους. Οι ιχθύες μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του εργαστηρίου τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς θύλακες (polybags) και αποθηκεύθηκαν, στους 5⁰C.

2.2 Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων

2.2.1 Μικροβιολογικά υλικά

Τα υλικά προμηθεύθηκαν από τα LAB M (Lancashire, UK) εκτός από το STAA, το MRS και το VRBGA όπου προμηθεύθηκαν από την Biolife (Μιλάνο, Ιταλία).

α) Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

- **Iron Agar (IA)**

1. Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται: πεπτόνη 20 g, εκχύλισμα κρέατος 3,0 g, εκχύλισμα ζύμης 3,0 g, κιτρικός σίδηρος 3,0 g/l, θειοθειικό νάτριο 0,3 g, NaCl 5 g, L-κυστεΐνη 0,6 g, άγαρ 14 g.
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 7,4.
4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.

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

1. Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται 41,5 g του υλικού VRBGA το οποίο περιέχει (g/L): εκχύλισμα ζύμης 3,0 g, πεπτόνη 7,0 g, χλωριούχο νάτριο 5,0 g, χολικά άλατα 1,5 g, γλυκόζη 10,0 g, χρωστική Neutral red 0,03 g, χρωστική Crystal violet 0,002 g, άγαρ 12,0 g.
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Τοποθετούμε τη φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά (δεν χρειάζεται επιπλέον αποστείρωση).

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

1. Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται 55 g του υλικού MRS το οποίο περιέχει (g/L) : μίγμα από πεπτόνες 10,0 g, εκχύλισμα ζύμης 5,0 g, εκχύλισμα κρέατος 10,0 g, γλυκόζη 20,0 g, φωσφορικό κάλιο 2.0 g, οξικό νάτριο 5,0 g, θειικό μαγνήσιο 0,2 g, θειικό μαγγάνιο 0.05 g, Tween 1,08 g, κιτρικό αμμώνιο 2,0 g
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.

- **Tryptone Soy Agar (TSA)**

1. Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται: τρυπτόνη 15,0 g, πεπτόνη σόγιας 5,0 g, χλωριούχο νάτριο 5,0 g, άγαρ 15,0 g
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.
4. Μοιράζουμε σε τρυβλία

- **Thallus Acetate Cyloheximide Actidion Agar (STAA)**

1. Σε φιάλη των 500 ml ζυγίζονται και προσθέτονται 17,3 g του υλικού STAA το οποίο περιέχει (g/L): πεπτόνη 20,0 g, εκχύλισμα ζύμης 2,0 g, όξινο φωσφορικό κάλιο 1,0 g, θειικό μαγνήσιο 1,0 g, άγαρ 13,0 g.
2. Προσθέτουμε 7,5 ml γλυκερόλης
3. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.
5. Προστίθενται τα αντιβιοτικά Thallus Acetate, Cyloheximide, Actidion
6. Μοιράζουμε σε τρυβλία

- **Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC)**

1. Σε φιάλη των 500 ml ζυγίζονται και προσθέτονται 24,2 g του υλικού CFC το οποίο περιέχει (g/L): πεπτόνη από ζελατίνη 16,0 g, υδρόλυμα καζεΐνης 10,0 g, θειικό κάλιο 10,0 g, χλωριούχο μαγνήσιο 1,4 g, άγαρ 11,0 g.
2. Προσθέτουμε 5 ml γλυκερόλης
3. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.
5. Προστίθενται τα αντιβιοτικά Cetrimide, Fusidin και Cephaloridine
6. Μοιράζουμε σε τρυβλία

- **Plate Count Agar (PCA)**

1. Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται τρυπτόνη 5,0 g, εκχύλισμα ζύμης 2,5 g, γλυκόζη 1,0 g, άγαρ 12,0 g.
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 7
4. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.

- **Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS)**

1. Σε φιάλη των 500 ml ζυγίζονται και προσθέτονται 44 g του υλικού το οποίο περιέχει (g/L): εκχύλισμα ζύμης 5,5 g, πεπτόνη 10,0 g, Θειοθειικό νάτριο 10,0 g, κιτρικό νάτριο 10,0 g, χολικά άλατα 9,0 g, σουκρόζη 17,0g, γλωριούχο νάτριο 10,0 g, κιτρικό σίδηρος 10,0g, κυανό της βρωμοθυμόλης (Bromothymol Blue) 0,04 g, κυανό της θυμόλης (Thymol Blue) 0,04 g, άγαρ 15,0 g
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Τοποθετούμε τη φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά (δεν χρειάζεται επιπλέον αποστείρωση)

- **Starch Ampicillin Agar (SAA)** (Palumbo *et al.*, 1985)

1. Σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίζονται και προσθέτονται πεπτόνη 10 g, εκχύλισμα κρέατος 3 g, γλωριούχο νάτριο 5,0 g, ερυθρό της φαινόλης (Phenol red) 0,02 g, άμυλο 10 g, άγαρ 15 g,
2. Συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό
3. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 οC για 15 λεπτά.
4. Προστίθενται ampicillin 0,01 g

2.2.2 Προετοιμασία δείγματος

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγμα 10 g εις πενταπλούν (n=5), από πέντε (5) διαφορετικούς ιχθύες, μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες όπου προσθέτονταν 90 ml Maximum Recovery Diluent(MRD) και ακολουθούσε

ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher. Κατόπιν πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις με την μεταφορά 1 ml δείγματος σε 9 ml αποστειρωμένου MRD.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν:

➤ Ολική μικροβιακή χλωρίδα σε

- Plate Count Agar και Plate Count Agar με 1,5% και 2,5% αλάτι
- Tryptone Soy Agar και Tryptone Soy Agar με 1,5% και 2,5% αλάτι.
- Iron Agar και Iron Agar με 1,5% και 2,5% αλάτι

και καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25⁰C για 2-3 μέρες.

➤ Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (*Shewanella putrefaciens*) σε Iron Agar (IA,) Ακολουθούσε καταμέτρηση των μαύρων μόνο αποικιών μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25⁰C για 2-3 ημέρες. (Gram *et al.*, 1987).

➤ *Brochothrix thermosphacta* σε STAA, και επώαση σε θερμοκρασία 25⁰C για 3-5 ημέρες.

➤ Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25⁰C για 3-5 ημέρες.

➤ *Pseudomonas* sp. σε CFC Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25⁰C για 2-3 ημέρες

➤ Enterobacteriaceae σε (VRBGA και επώαση σε θερμοκρασία 37⁰C για 24 ώρες

➤ *Vibrio* sp. σε TCBS και επώαση σε θερμοκρασία 37⁰C για 24 ώρες

➤ *Aeromonas* sp. σε Starch Ampicillin Agar (SA) και επώαση σε θερμοκρασία 30⁰C για 24 ώρες

2.3 Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι στατιστικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το STATISTICA 6.0. Οι διαφορές στις μέσες τιμές των βακτηριακών πληθυσμών ελέγχθηκαν πραγματοποιήθηκαν t –tests, και ANOVA ακολουθούμενο από Tukey's significance difference test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%. Για τις παρουσιάσεις των αποτελεσμάτων σε πίνακες και σχήματα χρησιμοποιήθηκε το MS Excel.

2.4 Χαρακτηρισμός βακτηρίων

Ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε απομονώνοντας μικροοργανισμούς που αναπτύχθηκαν στα εκλεκτικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση σημαντικών μικροοργανισμών στα αλιεύματα, όπως είναι το CFC, VRBGA, SA και TCBS (Πιν. 1.1). Αρχικά έγινε καταμέτρηση και μορφολογικός διαχωρισμός των αποικιών σύμφωνα με το χρώμα, και το σχήμα. Από τις μορφολογικά διαφορετικές αποικίες που προέκυψαν στα υλικά CFC, VRBGA TCBS και SA, αντιπροσωπευτικός αριθμός αποικιών από κάθε ομάδα μεταφέρονταν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό TSA όπου με τη μέθοδο της γραμμικής μετασποράς (streaking) και μετά την επώαση αυτών για 18-24 ώρες πραγματοποιούνταν ο έλεγχος της καθαρότητας αυτών των αποικιών. Κατόπιν ακολουθούσαν οι παρακάτω δοκιμές:

α) Χρώση Gram

Αποικίες μεταφέρονταν και προσηλώνονταν, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τη βοήθεια εργαστηριακού λύχνου Bunsen. Αρχικά για την χρώση χρησιμοποιήθηκε κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet) για 1 με 2 λεπτά και ακολουθούσε ξέπλυμα με νερό, ιώδιο για 1 λεπτό και ξέπλυμα με αιθανόλη (95%), σαφρανίνη για 30

δευτερόλεπτα και ξέπλυμα με νερό. Έπειτα, οδηγούνται στο μικροσκόπιο, όπου γίνονταν παρατήρηση του χρώματος και του σχήματος των βακτηρίων. Η ένδειξη του κόκκινου και μπλε χρώματος έδειχνε την αρνητική ή θετική αντίδραση του μικροοργανισμού στη χρώση, αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα σημειώνονταν το σχήμα του (κόκκος, βάκιλλος, σπειρίλιο).

β) Δοκιμή της οξειδάσης

Με τη βοήθεια αποστειρωμένου ξύλινου ραβδίου μεταφέρονταν ορισμένη ποσότητα από την εξεταζόμενη αποικία πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με διάλυμα 1 % w/v τετραμεθυλο-π-φαινυλενοδιαμίνης και 0,1 % w/v ασκορβικό οξύ. Η παραγωγή μπλε χρώματος αποτελούσε την ένδειξη της θετικής αντίδρασης.

γ) Δοκιμή της καταλάσης

Με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου, πραγματοποιούνταν μεταφορά μιας αποικίας μέσα σε σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (10 % v/v H₂O₂) που είχε τοποθετηθεί πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η παρουσία του ενζύμου της καταλάσης σηματοδοτούνταν από την απελευθέρωση αερίου οξυγόνου με τη μορφή αφρισμού.

ε) Μεταβολισμός της γλυκόζης (Hugh and Leifson medium)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τροποποιημένη μορφή από Scholefield (1964) του μέσου καλλιέργειας των Hugh and Leifson (1953), όπως περιγράφεται από τους Harrigan and MacCance (1976). Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε αποστειρωμένο ημιστερέο μέσο καλλιέργειας των Hugh and Leifson (τρυπτόνη 1,0; g/l, NaCl 5,0 g/l; K₂HPO₄ 0,3 g/l; κυανό της βρωμοθυμόλης 3,0 ml/l (1% w/v); acid fuchsin 1,5 ml/l (1% w/v); άγαρ 4,5 g/l; pH 7,1, στο οποίο προστίθεται γλυκόζη (1 % w/v) μετά την αποστείρωση), τοποθετούνταν ο κάθε ένας μικροοργανισμός με

βακτηριολογική βελόνα και κάθετη φορά. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία 25⁰C για 2-7 ημέρες και οι παρατηρήσεις που προέκυπταν από το μέσο αυτό ήταν:

-*Οξειδωτικός μεταβολισμός*. Η μεταβολή του πράσινου χρώματος του δείκτη σε πορτοκαλοκίτρινο στην επιφάνεια του σωλήνα, αποτελούσε την ένδειξη του οξειδωτικού χαρακτήρα του εξεταζόμενου μικροοργανισμού.

-*Ζυμωτικός μεταβολισμός*. Η μεταβολή του πράσινου χρώματος του δείκτη σε πορτοκαλοκίτρινο κατά μήκος όλου του σωλήνα. Η ένδειξη αυτή σηματοδοτούσε τον ζυμωτικό μεταβολισμό των κυττάρων.

Ταυτοποίηση των κατά Gram-αρνητικών βακτηρίων με τη μέθοδο του API 20 NE (non-enteric bacteria) και 20 E (enteric bacteria)

Οι δοκιμές χρώση Gram, καταλάση, οξειδάση και έλεγχος του μεταβολισμού της γλυκόζης καθόρισαν τον τύπο του API που χρησιμοποιούνταν (Εικ. 2.1). Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια που αντέδρασαν θετικά ή/και αρνητικά στην οξειδάση και παρουσίαζαν οξειδωτικό μεταβολισμό ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 NE, ενώ αυτά που αντέδρασαν θετικά ή/και αρνητικά στην οξειδάση και παρουσίαζαν ζυμωτικό μεταβολισμό ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 E.



Εικόνα 2.1 Οδηγός ταυτοποίησης των Gram (-) βακίλων με τη μέθοδο των API (Πηγή: API Guide prospectus, Biomerieux).

Με τη χρήση αποστειρωμένου κρίκου πραγματοποιούνταν μεταφορά της επιθυμητής ποσότητας μικροοργανισμών από την καθαρή καλλιέργεια σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 7 ml και 5 ml διαλύματος αποστειρωμένου αλατούχου ύδατος για το API 20 NE και για το API 20 E, αντίστοιχα. Ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός της ταινίας του API και προσθέτονταν παραφινέλαιο όπου απαιτούνταν. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν επώαση των κυτίων στους $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ για 24 ώρες για τα API 20 NE και στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ για 24 ώρες για τα API 20 E. Μετά το πέρας του 24 ώρου πραγματοποιούνταν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, επιπρόσθετες

εξετάσεις και επώαση των κυτίων για επιπλέον 24 ώρες. Ακολουθούσε η ανάγνωση και ερμηνεία των ταινιών. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος apiweb™ (Biomerieux, France).

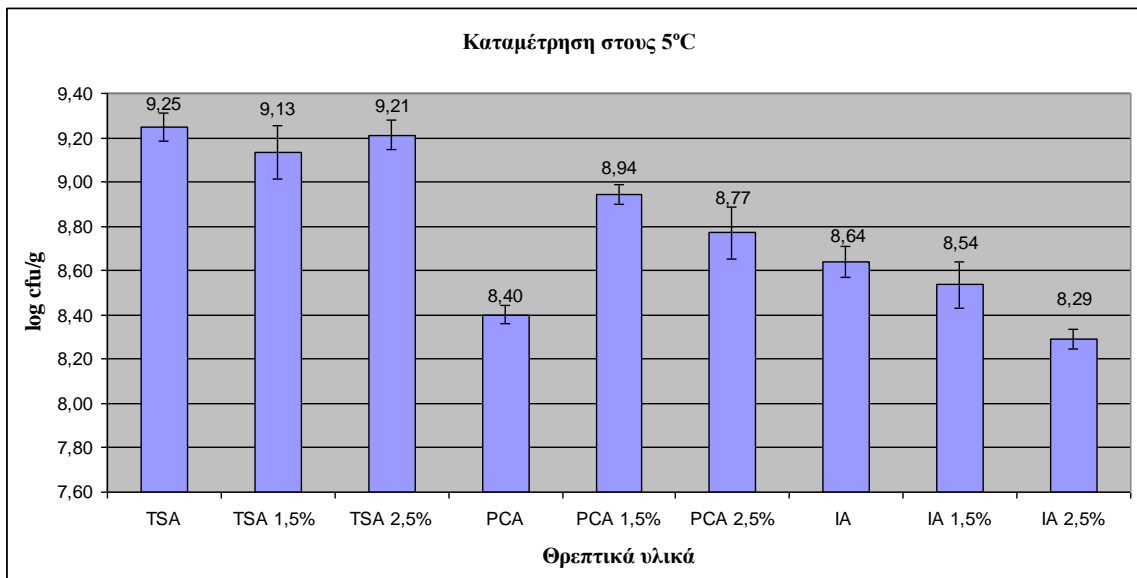


Εικόνα 3. Κυτίο API (Biomerieux)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καταμέτρηση του πληθυσμού της OMX σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.

Οι πληθυσμοί της OMX (για n=5 επαναλήψεις) σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά για τον έλεγχο του καταλληλότερου υλικού παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 3.1). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν, σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*) στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής τους σε θερμοκρασία συντήρησης των 5⁰C.



Σχήμα 3.1 Καταμέτρηση του πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) σε TSA, TSA 1,5%NaCl, TSA 2,5% NaCl PCA, PCA 1,5% NaCl, PCA 2,5% NaCl, IA, IA 1,5% NaCl και IA 2,5% NaCl σε σάρκα ιχθύων τσιπούρας κατά τη συντήρησή τους στους 5⁰C. Οι μπάρες συμβολίζουν το ± τυπική απόκλιση

Οι στατιστικές διαφορές των μέσων τιμών των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1

Πίνακας 3.1 Επίπεδο σημαντικότητας (p) μεταξύ των μέσων μικροβιακών πληθυσμών (log cfu/g) στα διάφορα θρεπτικά υλικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος, όπως προέκυψαν χρησιμοποιώντας ANOVA και post hoc Tukey's significance difference test. Με έντονους χαρακτήρες σημειώνονται οι τιμές p μεγαλύτερες του 0,05 και συνεπώς οι μέσοι δεν διαφέρουν στατιστικά.

A/A		TSA	PCA	IA	TSA 1.5	PCA 1.5	IA 1.5	TSA 2.5	PCA 2.5	IA 2.5
1	TSA		0.000173	0.000173	0.804382	0.000632	0.000167	0.999817	0.000167	0.000167
2	PCA	0.000173		0.001628	0.000167	0.000893	0.329160	0.000167	0.011348	0.572918
3	IA	0.000173	0.001628		0.000167	0.000679	0.868176	0.000167	0.353822	0.016466
4	TSA 1.5	0.804382	0.000167	0.000167		0.011880	0.000173	0.963871	0.000200	0.000167
5	PCA 1.5	0.000632	0.000893	0.000679	0.011880		0.000174	0.002266	0.399296	0.000167
6	IA 2.5	0.000167	0.329160	0.868176	0.000173	0.000174		0.000167	0.009518	0.109084
7	TSA 2.5	0.999817	0.000167	0.000167	0.963871	0.002266	0.000167		0.000173	0.000173
8	PCA 2.5	0.000167	0.011348	0.353822	0.000200	0.399296	0.009518	0.000173		0.000173
9	IA 2.5	0.000167	0.572918	0.016466	0.000167	0.000167	0.109084	0.000173	0.000173	

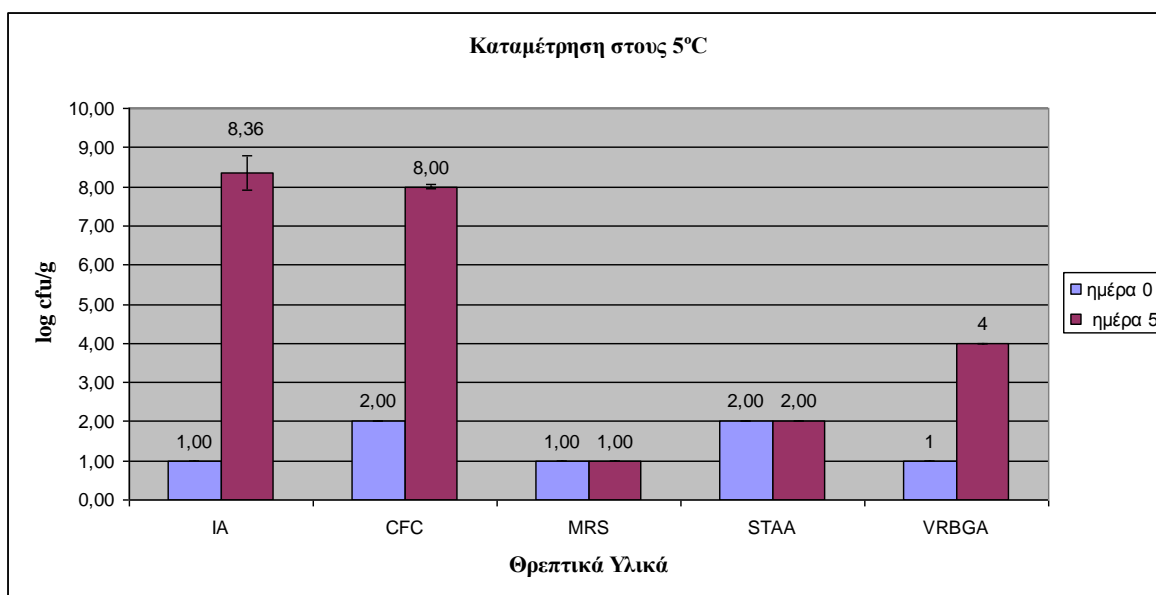
Το TSA (9,23 log cfu/g) φαίνεται να υποστηρίζει την μεγαλύτερη ανάπτυξη πληθυσμού μικροοργανισμών καθώς και τα TSA με NaCl παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα υπόλοιπα υλικά. Όπως παρατηρούμε το PCA δείχνει να έχει μικρότερη τιμή (8,40 log cfu/g) από τα υπόλοιπα τα οποία περιέχουν NaCl, ενώ το IA 2,5% την μικρότερη (8,29 log cfu/g).

Πράγματι βλέπουμε ότι από τα στατιστικά αποτελέσματα προκύπτει πως το TSA 2,5% και το TSA 1,5% έχουν πολύ μικρές στατιστικές διαφορές με το TSA, και συνολικά παρατηρούμε ότι αυτά είναι τα τρία υλικά τα οποία μας δίνουν το μεγαλύτερο μικροβιακό πληθυσμό. Το PCA σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία είναι χειρότερο και από το PCA 1,5 % και το PCA 2,5% , καθώς όπως παρατηρούμε τα PCA 1,5% και PCA 2,5% δεν έχουν στατιστικές διαφορές. Βλέποντας το υλικό IA διακρίνουμε πως στατιστικά δεν διαφέρει με το IA 1,5% και αυτά τα δύο υλικά παρουσιάζουν μεγαλύτερο μικροβιακό πληθυσμό από το IA 2,5%. Τέλος

συμπεραίνουμε ότι το PCA, το IA 1,5% και IA 2,5% δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους καθώς και ότι αυτά τα υλικά έχουν τον μικρότερο μικροβιακό πληθυσμό.

3.2 Καταμέτρηση αλλοιωγόνων βακτηρίων σε εκλεκτικά υλικά κατά τη συντήρηση τσιπούρας (*Sparus aurata*) στους 5°C

Στο παρακάτω σχήμα (Σχ.3.2) παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των βακτηρίων που παράγουν H₂S σε IA, *Pseudomonas sp.* σε CFC, οξυγαλακτικά σε MRS, *Brochothrix thermosphacta* σε STAA και Enterobacteriaceae σε VRBGA, που απαντώνται στην αρχή και στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά τη συντήρησή τους στους 5°C.



Σχήμα 3.2 Πληθυσμοί ορισμένων βακτηρίων που απαντώνται στην αρχή και στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά τη συντήρησή τους στους 5°C και απαριθμούνται σε εκλεκτικά υλικά. Οι μπάρες συμβολίζουν το ± τυπική απόκλιση

Σχεδόν όλοι οι πληθυσμοί φαίνεται να βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης των 1 ή 2 log cfu/g ανά περίπτωση, στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων τσιπούρας. Όπου το 1 log cfu/g είναι για υλικά στα οποία γίνεται επίστρωση και στα 2

log cfu/g ενσωμάτωση. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων που παράγουν H₂S σε IA (8,36 log cfu/g), οι *Pseudomonas* sp. σε CFC (8 log cfu/g) και τα Enterobacteriaceae σε VRBGA (4 log cfu/g) φθάνουν σε υψηλά επίπεδα στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων αυτών. Τα οξυγαλακτικά σε MRS και ο *Brochothrix thermosphacta* σε STAA φαίνεται να παραμένουν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 1 ή 2 log cfu/g, αντίστοιχα, έως το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

3.3 Έλεγχος της εκλεκτικότητας των υλικών

Οι μορφολογικά διαφορετικές αποικίες που απομονώθηκαν από τα εκλεκτικά μέσα καλλιέργειας CFC, VRBGA, SA και TCBS μελετήθηκαν φαινοτυπικά με κλασσικές δοκιμές, όπως ήδη αναφέρθηκαν, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

Στο πίνακα 3.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ομαδοποίηση και χαρακτηρισμό των αποικιών που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υλικό CFC. Διακρίθηκαν μορφολογικά 4 διαφορετικές τύποι αποικιών, CFC1, CFC2, CFC3 και CFC4 από 11, 20, 50 και 10 αποικίες αντίστοιχα σε σύνολο 101 αποικιών του τρυβλίου. Ελήφθησαν τυχαία 2, 2, 5 και 2 αποικίες από τις CFC1, CFC2, CFC3 και CFC4 αντίστοιχα και εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς Χρώση Gram, σχήμα κυττάρου, αντίδραση στην οξειδάση, καταλάση και ζύμωτικό-οξειδωτικό μεταβολισμό (H&L).

Πίνακας 3.1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που λήφθησαν από ιχθύες τσιπούρας από το εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους CFC.

Κωδικός βακτηρίου	Αριθμός αποικιών	Αριθμός αποικιών που λήφθησαν	Χρώμα αποικίας Σχήμα	Χρώση Gram	Σχήμα βακτηρίων	Οξειδάση	Καταλάση	H&L
CFC1	11	2	Κυκλικές	-	β	+	+	O

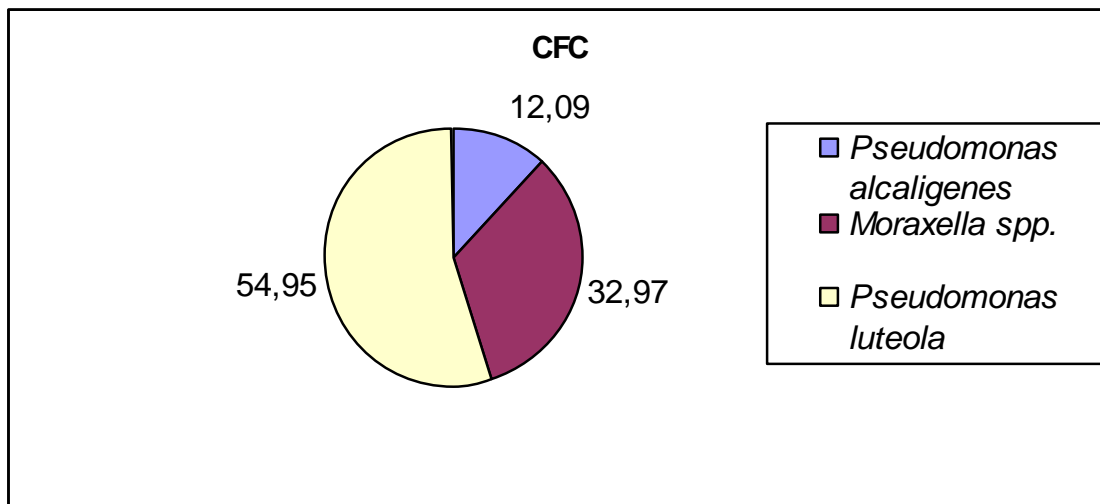
			Πορτοκαλί					
CFC2	20	2	Κυκλικές Φωσφορούχες	-	β	+	+	O
CFC3	50	5	Κυκλικές Κρεμ	-	β	+	+	O
CFC4	10	2	Κυκλικές Κρεμ ανοιχτό	-	β	+	+	O

β: βάκιλλος, O: οξειδωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης στο αντίστοιχο μέσο, Z: ζυμωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση ή θετική μεταβολή

Κατόπιν οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι αποικιών που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό CFC (1,2,3,4) ταυτοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας το API20 NE (βλέπε παράρτημα I) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 και με τη μορφή διαγράμματος τύπου πίτας στο Σχήμα 3.3. Φαίνεται ότι οι ομάδες αποικιών CFC1 και CFC3 ήταν *Pseudomonas* σε συνολικό ποσοστό 67,03% και οι CFC2 και CFC4, *Moraxella* σε συνολικό ποσοστό 32,97% εκ του συνολικού αριθμού αποικιών στο τρυβλίο.

Πίνακας 3.2. Ταυτοποίηση και ποσοστιαία κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας στη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων τσιπούρας στο εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους CFC.

Κωδικός μικροοργανισμού	Ταυτοποίηση	Αριθμός μ/ο	Σύνολο %
CFC 1	<i>Pseudomonas</i> sp.	11	12,09
CFC 2 και 4	<i>Moraxella</i> spp.	30	32,97
CFC 3	<i>Pseudomonas luteus</i>	50	54,95



Σχήμα 3.3 Ποσοστιαία επί τις εκατό κατανομή ομάδων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν εκλεκτικό υλικό CFC.

Στο πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ομαδοποίηση και χαρακτηρισμό των αποικιών που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υλικό VRBGA. Διακρίθηκαν μορφολογικά 3 διαφορετικές τύποι αποικιών, VRBGA1, VRBGA2, VRBGA3 από 10, 8 και 3 αποικίες αντίστοιχα σε σύνολο 23 αποικιών του τρυβλίου. Ελήφθησαν τυχαία 2, 2 και 1 αποικίες από VRBGA1, VRBGA2, VRBGA3 αντίστοιχα και εξετάσθηκαν περαιτέρω ως προς Χρώση Gram, σχήμα κυττάρου, αντίδραση στην οξειδάση, καταλάση και ζύμωτικό-οξειδωτικό μεταβολισμό (H&L).

Κατόπιν οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι αποικιών που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό VRBGA (1,2,3,) ταυτοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας το API₂₀ NE και API 20 (βλέπε παράρτημα I και II). Στον Πίνακα 3.4 καθώς και στο Σχήμα 3.4 φαίνονται τα ποσοστά που αποτελούν οι πληθυσμοί των τριών διαφορετικών αποικιών που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό VRBGA (1,2,3). Το μεγαλύτερο ποσοστό φαίνεται να έχουν οι ομάδες αποικιών VRBGA1 του είδους *Pseudomonas fluorescens*, ενώ ακολουθεί το VRBGA2 με *Aeromonas hydrophila/sobria/caviae* και τέλος το VRBGA3 έχοντας ένα μικρό ποσοστό (14,29%) αποτελούν βακτήρια του γένους

Enterobacter. Να σημειωθεί ότι τα *Enterobacter* έδωσαν μεγάλες στρογγυλές μωβ αποικίες με δακτύλιο, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα όπου οι αποικίες ήταν μικρές χωρίς δακτύλιο.

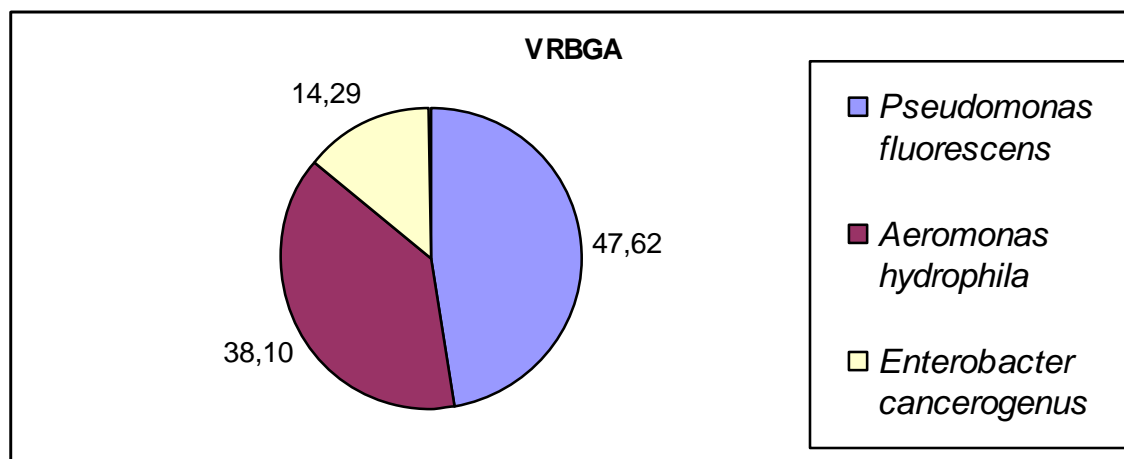
Πίνακας 3.3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που λήφθηκαν από ιχθύες τσιπούρας από το εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους VRBGA.

Κωδικός βακτηρίου	Αριθμός αποικιών	Αριθμός αποικιών που λήφθηκαν	Χρώμα - Σχήμα	Χρώση Gram	Σχήμα βακτηρίων	Οξειδάση	Καταλάση	H&L
VRBGA1	10	2	Κυκλικές μικρές Μωβ χωρίς δακτύλιο	-	β	+	+	O/-
VRBGA2	8	2	Ραβδοειδής Μωβ	-	β	+	+	Z
VRBGA3	3	1	Κυκλικές μεγάλες Μωβ με δακτύλιο	-	β	-	+	Z

β: βάκιλλος, O: οξειδωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης στο αντίστοιχο μέσο, Z: ζυμωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση ή θετική μεταβολή

Πίνακας 3.4 Ταυτοποίηση και ποσοστιαία κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας στη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων τσιπούρας στο εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους VRBGA.

Κωδικός μικροοργανισμού	Ταυτοποίηση	Αριθμός μ/ο	Σύνολο %
VRBGA1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	47,62
VRBGA2	<i>Aeromonas hydrophila/sobria/caviae</i>	8	38,10
VRBGA3	<i>Enterobacter</i> sp.	3	14,29



Σχήμα 3.4 Ποσοστιαία επί τις εκατό κατανομή ομάδων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν εκλεκτικό υλικό VRBGA.

Στο πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ομαδοποίηση και χαρακτηρισμό των αποικιών που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υλικό SA. Διακρίθηκαν μορφολογικά 3 διαφορετικές τύποι αποικιών, SA1, SA2, SA3 από 35, 10 και 14 αποικίες αντίστοιχα σε σύνολο 49 αποικιών του τρυβλίου. Ελήφθησαν τυχαία 4, 2 και 2 αποικίες από SA1, SA2, SA3 αντίστοιχα και εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς Χρώση Gram, σχήμα κυττάρου, αντίδραση στην οξειδάση, καταλάση και ζύμωτικό-οξειδωτικό μεταβολισμό (H&L).

Πίνακας 3.5 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που λήφθησαν από ιχθύες τσιπούρας από το εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους SA.

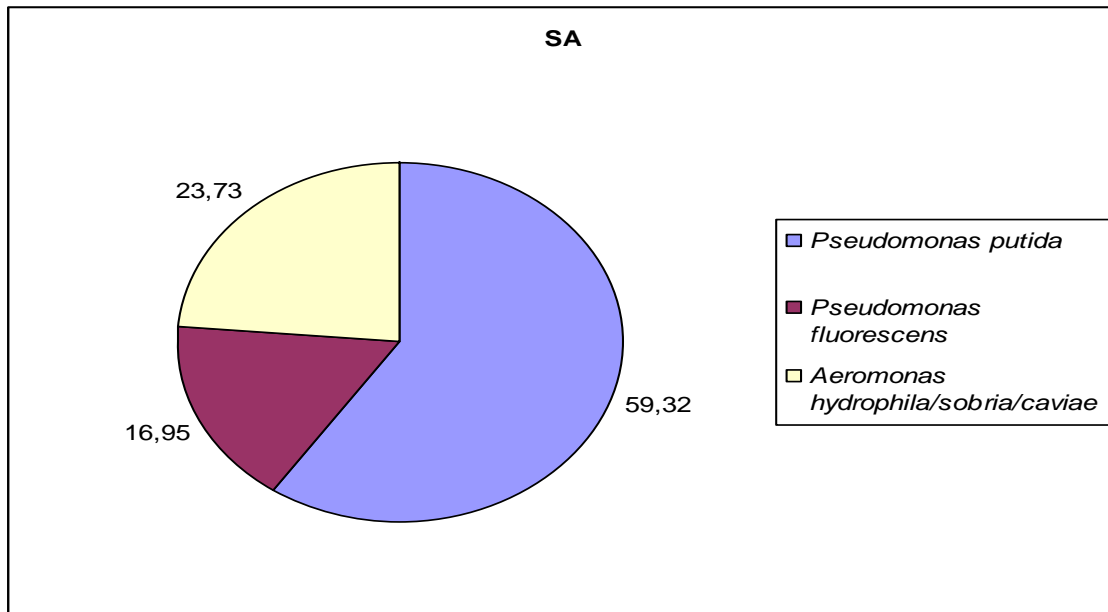
Κωδικός βακτηρίου	Αριθμός αποικιών	Αριθμός αποικιών που λήφθησαν	Σχήμα Χρώμα	Χρώση Gram	Σχήμα βακτηρίου	Οξειδάση	Καταλάση	H&L
SA1	35	4	Κυκλικές ελαφρά Ροζ	-	β	+	+	O/-
SA2	10	2	Κυκλικές κιτρινό-πορτοκαλί	-	β	+	+	O
SA3	14	2	Κυκλικές ελαφρά Ροζ	-	β	+	+	Z

β: βάκιλλος, O: οξειδωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης στο αντίστοιχο μέσο, Z: ζύμωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση ή θετική μεταβολή

Κατόπιν οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι αποικιών που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό SA (1,2,3,) ταυτοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας το API 20 NE και API 20 (βλέπε παράρτημα I και II). Οι τρεις διαφορετικές αποικίες που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό SA(1,2,3) ταυτοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6 και στο Σχήμα 3.5. Το μεγαλύτερο ποσοστό φαίνεται να ανήκει στο υλικό SA1 στο οποίο είχαμε *Pseudomonas putida* με ποσοστό 59,32 % ομοίως και στο SA2 γένος *Pseudomonas*, ενώ στο SA3 το γένος *Aeromonas*, του οποίου το μέσο καλλιέργειας είναι το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, φαίνεται να καταλαμβάνει μόνο το 23,73% του συνόλου των αποικιών που καταμετρήθηκαν.

Πίνακας 3.6 Ταυτοποίηση και ποσοστιαία κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας στη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων τσιπούρας στο εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους SA.

Κωδικός μικροοργανισμού	Ταυτοποίηση	Αριθμός μ/ο	Σύνολο %
SA1	<i>Pseudomonas putida</i>	35	59,32
SA2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	16,95
SA3	<i>Aeromonas hydrophila/sobria/caviae</i>	14	23,73



Σχήμα 3.5 Ποσοστιαία επί τις εκατό κατανομή ομάδων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν εκλεκτικό υλικό SA.

Στο πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ομαδοποίηση και χαρακτηρισμό των αποικιών που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υλικό TCBS. Διακρίθηκαν μορφολογικά 3 διαφορετικές τύποι αποικιών, TCBS1, TCBS2, TCBS3 από 69, 22 και 17 αποικίες αντίστοιχα σε σύνολο 49 αποικιών του τρυβλίου. Ελήφθησαν τυχαία 6, 2 και 2 αποικίες από TCBS1, TCBS2, TCBS3 αντίστοιχα και εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς Χρώση Gram, σχήμα κυττάρου, αντίδραση στην οξειδάση, καταλάση και ζύμωτικό-οξειδωτικό μεταβολισμό (H&L).

Πίνακας 3.7 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που λήφθηκαν από ιχθύες τσιπούρας από το εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους TCBS.

Κωδικός βακτηρίου	Αριθμός αποικιών	Αριθμός αποικιών που λήφθηκαν	Σχήμα Χρώμα	Χρώση Gram	Σχήμα βακτηρίων	Οξειδάση	Καταλάση	H&L
TCBS1	69	6	Κυκλικές Κίτρινες	-	β	-	+	Z
TCBS2	22	2	Κυκλικές Πράσινες	-	β	-	+	Z
TCBS3	17	2	Κυκλικές	-	β	-	+	Z

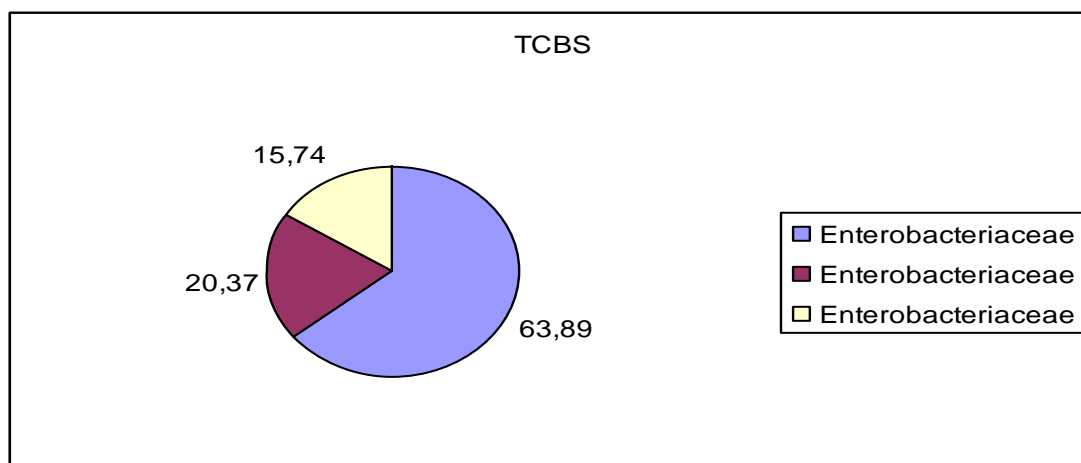
			Μαύρες					
--	--	--	--------	--	--	--	--	--

β: βάκιλλος, Ο: οξειδωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης στο αντίστοιχο μέσο, Ζ: ζυμωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση ή θετική μεταβολή

Κατόπιν οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι αποικιών που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό TCBS (1,2,3,) ταυτοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας το API 20 NE και API 20 (βλέπε παράρτημα I και II). Όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8 και στο Σχήμα 3.6 παρατηρούμε ότι οι τρεις διαφορετικές αποικίες που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό TCBS (1,2,3) φαίνεται να ανήκουν όλες στην οικογένεια Enterobacteriaceae.

Πίνακας 3.8 Ταυτοποίηση και ποσοστιαία κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας στη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων τσιπούρας στο εκλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους TCBS.

Κωδικός μικροοργανισμού	Ταυτοποίηση	Αριθμός μ/ο	Σύνολο %
TCBS1	<i>Enterobacter</i> sp.	69	63,89
TCBS2	<i>Enterobacter</i> sp.	22	20,37
TCBS3	<i>Enterobacter</i> sp.	17	15,74



Σχήμα 3.6 Ποσοστιαία επί τις εκατό κατανομή ομάδων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν εκλεκτικό υλικό TCBS.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 OMX σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα.

Από τα υλικά που εξετάστηκαν προέκυψε ότι το TSA φαίνεται να υποστηρίζει ανάπτυξη μεγαλύτερου πληθυσμού μικροοργανισμών σε σχέση με τα υπόλοιπα υλικά, ενώ το IA 2,5% και το PCA την μικρότερη. Παρόλα αυτά το PCA χρησιμοποιείται επίσημα για την καταμέτρηση της OMX στα τρόφιμα σύμφωνα με το ISO 4833 και ISO 17410. Επιπλέον το IA χρησιμοποιείται σε διάφορες μελέτες για την καταμέτρηση της OMX στα ιχθυηρά (Boziaris *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Valle *et al.*, (1998) χρησιμοποιώντας τα υλικά PCA και TSA πάνω σε διάφορα είδη ψαριών (γάυρο, σκορπίνα και μπακαλιάρο) για t=5days κατάληξαν πως το TSA είναι το καταλληλότερο υλικό καθώς παρουσίαζε την μεγαλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη σε όλα τα προαναφερθέντα ψάρια όπως βλέπουμε στον παρακάτω πίνακα (Πιν 4.1).

Πινάκός 4.1 Παρουσίαση μικροβιακού πληθυσμού πάνω σε είδη ψαριών στα αντίστοιχα υλικά. (Από Valle *et al.*, 1998)

Log cfu/g	Γάυρος	Σκορπίνα	Μπακαλιάρος
PCA	4.39±0.34	5.03±0.22	4.43±0.33
TSA	4.58±0.34	5.09±0.22	4.62±0.32

Επίσης αναφέρεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό των μικροοργανισμών αναπτύχθηκε καλύτερα σε επώαση των τρυβλίων στους 20⁰C σε TSA 1.38% NaCl (Valle, *et al.*, 1998). Παρόλα αυτά και με επώαση στους 25⁰C δεν διέφερε στατιστικά η OMX μεταξύ TSA, TSA 1,5% και TSA 2,5%.

Επίσης έγιναν δοκιμές και *Shewanella putrefaciens* πάνω σε PCA και TSA και τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλες στατιστικές διαφορές μεταξύ των PCA και TSA. Πιο

συγκεκριμένα το TSA είχε μεγαλύτερο πληθυσμό (6,9 log cfu/g) από το PCA (4,2 log cfu/g) (Malle *et al.*, 1998).

4.2 Καταμέτρηση βακτηρίων σε εκλεκτικά υλικά κατά τη συντήρηση τσιπούρας (*Sparus aurata*) στους 5⁰C

Οι πληθυσμοί όλων των βακτηρίων στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα διότι, θεωρητικά, η σάρκα των υγιών εν ζώη ιχθύων θεωρείται απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς (Huss, 1950). Στη συνέχεια παρατηρείται αύξηση στους πληθυσμούς της OMX, των *Pseudomonas* sp. και των Enterobacteriaceae κατά τη συντήρηση, διότι η διαδικασία αλλοίωσης ξεκινά μετά τον θάνατο του. Κατά την παραμονή των ιχθύων σε θερμοκρασίες ψύξης (5⁰C) ο πληθυσμός της OMX και του *Pseudomonas* sp. έφτασε περίπου τους 8 log cfu/g σε 7 ημέρες, ενώ τα Enterobacteriaceae περίπου τους 4 log cfu/g στο ίδιο χρονικό διάστημα. Η αύξηση του αριθμού των *Pseudomonas* sp. συμβαίνει διότι είναι ψυχρότροφα (Ashie *et al.*, 1996) και επιπλέον η συντήρηση των ιχθύων της Μεσογείου σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών του γένους αυτού και σε πολλές περιπτώσεις συντήρησης ο μικροοργανισμός αυτός αποτελεί τον EAM (Koutsoumanis and Nychas, 1999). Τα Enterobacteriaceae δεν δείχνουν τον ίδιο ρυθμό αύξησης με τους *Pseudomonas* sp. διότι λίγα είδη ή γένη είναι ψυχρότροφα. Τέλος, τα οξυγαλακτικά και ο *Brochothrix thermosphacta* βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 1 ή 2 log cfu/g, αντίστοιχα, έως το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται κυρίως σε ιχθύες των θερμότερων θαλασσινών νερών, αποθηκευμένων υπό ψύξη, σε συσκευασίες κενού και σε μείγμα αερίων (MAP) (Lanelonque *et al.*, 1982; Drosinos and Nychas, 1996).

4.3 Έλεγχος εκλεκτικότητας υλικών

Σύμφωνα με τον μικροβιολογικό έλεγχο (φαινοτυπικές δοκιμές) που πραγματοποιήθηκε στα εκλεκτικά υλικά CFC, VRBGA, SA και TCBS με σκοπό την εξακρίβωση για το αν τα συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο των μικροοργανισμών που θέλουμε να μελετήσουμε ή τελικά επιτρέπουν την ανάπτυξη και άλλων ομάδων μικροοργανισμών, βρέθηκε ότι τελικά παρά την ύπαρξη παρεμποδιστικού παράγοντα (πχ. αντιβιοτικά, χρωστικές, άλατα κτλ) στα συγκεκριμένα υλικά ευνοείται και η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών διαφορετικών από αυτών που επιθυμούμε να καταμετρήσουμε. Πιο συγκεκριμένα μπορεί, το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων που καταμετρήθηκαν στο μέσο καλλιέργειας CFC ήταν βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (περίπου 67%), ενώ σημαντικό ποσοστό αποτελούσε το γένος *Moraxella* (33%). Στο VRBGA βρέθηκε να επικρατούν αριθμητικά βακτήρια του είδους *Pseudomonas fluorescens* (47,62%) και των *Aeromonas* sp. (38,10 %), ενώ μόνο μικρό ποσοστό (14,29%) αποτελούν βακτήρια του γένους *Enterobacter* τα οποία ανήκουν στα *Enterobacteriaceae*. Παρόλα αυτά στο VRBGA δεν παίρνουμε λάθος πληροφορία για τον αριθμό των Εντεροβακτηρίων διότι κανονικά καταμετρούνται μόνο οι μωβ αποικίες με δακτύλιο που τελικά είναι μόνο Εντεροβακτήρια. Επίσης, τα *Pseudomonas* sp. αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων που καταμετρήθηκαν στο SA, ενώ το γένος *Aeromonas* sp., του οποίου το μέσο καλλιέργειας είναι το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, καταλαμβάνει μόνο το 23,73% του συνόλου των αποικιών που καταμετρήθηκαν. Τέλος, όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υλικό TCBS ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* (γένος *Enterobacter*) και καθόλου δεν απομονώθηκαν *Vibrio* sp. Το ότι δεν απομονώθηκαν καθόλου *Vibrio* sp στο TCBS από την σάρκα του ψαριού,

σημαίνει ότι αυτός ο μέσος όρος αν και άφθονος στο θαλάσσιο περιβάλλον (Farmer, 2006) δεν είναι μέσος όρος που συνεισφέρει στην αλλοίωση των ιχθύων. Από τα αποτελέσματα που έχουμε από αναφορές στο υλικό CFC παρατηρείτε ότι έχουμε ανάπτυξη *Pseudomonas* sp, καθώς υπάρχει και μια μικρή ανάπτυξη *Shewanella putrefaciens* (Mead, 1985) βέβαια στη δική μας περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Επίσης όπως διαπιστώνουν οι Tryfinopoulou *et al.*,(2001), το υλικό CFC παρουσιάζεται ως το καταλληλότερο για την ανάπτυξη *Pseudomonas*, αλλά επίσης μας αναφέρει πως υπάρχει και ανάπτυξη *Shewanella putrefaciens*.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τέλος από την παρούσα εργασία διαπιστώνεται ότι:

- Το TSA είναι το καταλληλότερο υλικό για καταμέτρηση OMX καθώς μας παρουσίασε το μεγαλύτερο μικροβιακό πληθυσμό.
- Στο VRBGA ενώ αναπτύσσονται και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούμε να απομονώσουμε Εντεροβακτήρια καθώς καμετρούμε συγκεκριμένες μορφολογικές αποικίες.
- Το SA υποστηρίζει την ανάπτυξη *Pseudomonas* sp.
- Στο TCBS εκτός από *Vibrio* αναπτύσσονται και βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae.
- Τέλος στο CFC διακρίνουμε ανάπτυξη κυρίως *Pseudomonas* sp αλλά υποστηρίζει και την ανάπτυξη *Aeromonas*.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ackman R. G. (1995) Composition and Nutrive Value of Fish and Shellfish Lipids. In: A. Ruitter (Ed) Fish and Fishery products, composition. Nutritive Properties and Stability, UK, p 117-156

Adams M.R., Moss M.O. (1995) Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry

Amstrong G.S., Wyllie S. G., Leach D.N. (1994) Effects of preservation by gammairradiation on the nutritional Quality of Australian fish. Food Chemistry, 50:351-357

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

Boziaris S., Kordila A., Neofitou C. (2011) Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures

Buissière J., Nardon P. (1968) Microméthode d'identification des bactéries. I. Intérèt de la quantification des caractères biochimiques. Ann Inst Pasteur (Paris), 2:218–231

Cowan S.T., Steel P. (1993) Manual for the Identification of Medical Bacteria Cambrige University Press

Clarke P.H., Cowan S.T. (1952) Biochemical methods for bacteriology. Journal of General Microbiology, 6:187

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

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.

Farmer III JJ (2006) The family Vibrionaceae. Prokaryotes, 6:495-507

Gibson D.M. (1995) Hygiene and safety of food. In: A. Ruitter (Ed) Fish and Fishery products, composition. Nutritive properties and Stability, UK, p 243-260

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

Graham A. F., Mason D.R., Peck M.W. (1996) Predictive model of the effect of temperature, pH and sodium chloride on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology*, 31: 69-85

Haard N.F. (1995) Composition and Nutritive Value of fish Proteins and other Nitrogen Compounds. In: A. Ruiter (Ed) *Fish and Fishery products, composition. Nutritive Properties and Stability*, UK, p 77-116

Holick M.F. (2002) Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, 9:87-98

Holub B. J. (1992) Potential health benefits of the omega-3 fatty acids in fish. In: G. Bligh (Ed.) *Seafood Science and Technology*. Fishing News Books: a division of Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford, London, Edinburgh, Cambridge (USA), Carlton-Victoria (Australia).

Huss H.H. (1993) Assurance of seafood quality. *FAO Fisheries Technological Paper 334*, FAO, Rome, Italy

Huss H.H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technological Paper 348*, FAO, Rome, Italy

Huss H.H. (2000) Prevention and control of hazard in seafood. *Food control*, 11: 149-156

Huss H.H., Reilly A., Karim Ben Embarek P. (2000) Prevention and control of hazard in seafood. *Food Control*, 11: 149-156.

Huss H.H. (1993) Assurance of seafood quality. *Food Agriculture Organisation (FAO). Fisheries Technical Paper 334*. FAO, Rome, Italy.

Huss H.H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. *Food Agriculture Organisation (FAO). Fisheries Technical Paper 348*. FAO, Rome, Italy.

Huss H.H. (1997) Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, 8: 91-98.

Huss H.H. (2004) Assessment and management of seafood safety and quality. *Food Agriculture Organisation (FAO)*. FAO, Rome, Italy

Huss H.H. (1993) Assurance of seafood quality. FAO Fisheries Technological Paper 334, FAO, Rome, Italy

Huss H.H. (2000) Prevention and control of hazard in seafood. Food Control, 11: 149-156

HuisVeld J.H.J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33: 1-18

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 10⁰C. Applied and Environmental Microbiology, 65: 698-706

Lanelonque M., Finne G., Hanns M. O., Nickelson R., Vanderzant C. (1982) Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ – enriched atmospheres. Journal of Food Protection, 45:1197-1203

Lalitha K.V, Gopakumar K (2000) Distribution and ecology of Clostridium botulinum and aquatic environments of a tropical region. Food Microbiology, 7:535-541

Liston J. (1980) Microbiology in Fishery Science. In: Connell, J.J. and staff of Torry Research Station (eds.) Advances in Fish Science and Technology. Fishing News Books, Farnham, Surrey, England, p 138-157

Malle P., Valle M., Demarque P. (1998) Detection and enumeration of H₂S bacteria: application to *shewanella putrefaciens* (cip). Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 6:93-102

Manclark C.R., Pickett M.J. (1961) Diagnostic bacteriological screening procedures. Lab Word, 12:446

Mead G.C. (1985) Enumeration of pseudomonads using cephaloridine-fucidin-cetrimide agar (CFC). International Journal of Microbiology, 2:21-26

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

Motarjemi Y., Kaferstein F. (1999) Food safety, Hazard Analysis and Critical Control Point and the increase in foodborne diseases: a paradox? Food Control, 10:325-333

Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk C.B., Baird R.M. (1995) Essentials of the Microbiology of Foods. Wiley and Sons, USA

Notermans S. (1999) Detection of Neurotoxins of Clostridium Botulinum. Academic Press. p.463

Pakkala P., Hielm S. (1998) Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked whitefish. International Journal of Food Microbiology, 43:1-5

Palumbo S.A., Maxino F., Williams A.C., Buchanan R.L., Thayer, D.W. (1985) Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of Aeromonas hydrophila. Applied and Environmental Microbiology, 50:1027-1030

Patterson M.F. (2005) Microbiology of pressure-treated foods. A REVIEW. Journal of Applied Microbiology, 98:1400–1409

Sallam Kh.I., Ahmed A.M., Elgazzar M.M., Eldaly E.A. (2007) Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4⁰C. Food Chemistry, 102:1061–1070

Shewan J.M. (1962) The bacteriology of fresh spoiling fish and some related chemical changes. J. Hawthorn and J. Muil Leitch (eds), Rec. Advances in Food Science, 1:167-193

Tryfinopoulou P., Drosinos E.H, Nychas G.-J.E. (2001) Performance of Pseudomonas CFC-selective medium in he fish storage ecosystems. Journal of Microbiological Methods, 47:243-247

Valle M., Eb P., Tailliez R., Malle P. (1998) Optimization of the enumeration of total aerobic bacterial flora in the flesh of seafish. Journal os Rapid Methods and Automation in Microbiology, 6:29-42

6.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Μποζιάρης Ι. (2010) Υγιεινή και συντήρηση εδώδιμων αλιευμάτων. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

7. ABSTRACT

The aim of the project was the evaluation of various culture media and to figure out the most appropriate for enumeration of total viable counts (TVC). Furthermore the examination of the selectivity of the main selective culture media that are used for the enumeration of specific spoilage microorganism.

The particular research was accomplished using gilthead, sea-bream (*Sparus aurata*) stored at 5⁰C. From the media used TSA with 9.23 log cfu/, gave the higher bacterial counts. On the opposite, IA with 2.5% NaCl, presented the smaller growth 8,29 log cfu/g.

During the second part of the project results showed that VRBGA can be used for enumeration of Enterobacteriaceae by counting only the colonies with specific morphological attributes. Besides it was noticed that in CFC grown mostly *Pseudomonas* sp., On TCBS the bacteria that grew belonged in the family of Enterobacteriaceae. On SA *Pseudomonas* sp. can also grow.

Keywords: Media selectivity, Biochemical tests, Spoilage.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίν 1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μη-εντερικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το επιλεκτικό μέσο καλλιέργειάς τους (CFC, SA, VRBGA και TCBS) από τη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων και ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο του API 20 NE.

Δοκιμές	Κωδικός αποικιών						SA1	SA2
	CFC1	CFC2	CFC3	CFC4	VRBGA1			
Μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη	+	+	+	+	+	-	+	
Παραγωγή ινδόλης	-	-	-	-	-	-	-	
Οξειδωση γλυκόζης	-	-	+	-	-	-	-	
Υδρόλυση αργινίνης	-	-	+	-	+	+	+	
Ουρεάση	-	-	-	-	-	+	-	
Υδρόλυση εσκουλίνης	-	-	+	-	-	-	-	
Υδρόλυση ζελατίνης	+	-	+	-	-	-	-	
Π-νιτρο-φαινυλο-βD-γαλακτοπυρανοζίδιο	-	-	+	-	-	-	-	
Γλυκόζη	-	-	+	-	+	+	+	
Αραβινόζη	-	-	+	-	+	+	+	
Μαννόζη	-	-	+	-	+	+	+	
Μαννιτόλη	-	-	+	-	+	-	+	
N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη	+	-	-	-	+	-	+	
Μαλτόζη	+	-	-	-	-	-	-	
Γλυκονικό οξύ	-	-	-	-	+	+	+	
Καπρικό οξύ	+	+	+	+	+	+	+	
Αντιπικό οξύ	-	-	-	-	-	-	-	

Μηλικό οξύ	-	-	-	-	+	+	+
Κιτρικό οξύ	+	-	-	-	+	+	+
Φαινυλο-οξεικό οξύ	+	+	-	+	-	-	-
Ταυτοποίηση	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Moraxella spp</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Moraxella spp</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Πίν. 2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που απομονώθηκαν από το επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας τους (VRBGA) από τη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων και ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο του API 20 E.

Δοκιμές	Κωδικός αποικιών					SA3
	VRBGA2	VRBGA3	TCBS 1	TCBS 2	TCBS 3	
Παραγωγή NO ₂	+	+	+	+	+	+
Αναγωγή σε N ₂	-	-	-	-	-	-
Κινητικότητα	-	+	+	+	+	-
Ανάπτυξη στο MacConkey agar	+	+	+	+	+	+
Οξείδωση της γλυκόζης	+	+	+	+	+	+
Ζύμωση της γλυκόζης	+	+	+	+	+	+
Ορθο-νιτρο-φαινυλο-βD-γαλακτοπυρανοζίδιο	+	+	+	+	+	+
Διυδρολάδη της αργινίνης	+	+	+	+	+	+
Δεκαρβοξυλάση της λυσίνης	-	-	-	-	-	-
Δεκαρβοξυλάση της	-	-	-	-	-	-

ορνιθίνης						
Αφομοίωση κιτρικών	-	+	+	+	+	-
Παραγωγή H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Παραγωγή ουρεάσης	-	-	-	-	-	-
Διαμίνωση της τρυπτοφάνης (Απαμίνωση)	-	-	-	-	-	-
Παραγωγή ινδόλης	+	-	-	-	-	+
Παραγωγή ακετοΐνης	-	+	+	+	+	-
Ζελατινάση	+	-	-	-	-	+
Γλυκόζη	+	+	+	+	+	+
Μαννιτόλη	+	+	+	+	+	+
Ινοσιτόλη	-	-	-	-	-	-
Σορβιτόλη	-	-	-	-	-	-
Ραμνόζη	-	+	+	+	+	-
Σουκρόζη	+	-	-	-	-	+
Μελιβιόζη	-	-	-	-	-	-
Αμυγαλίνη	+	+	+	+	+	+
Αραβινόζη	+	+	+	+	+	+
Ταυτοποίηση	Aeromonas hydrophila / sobria / caviae	Enterobacter	Enterobacter			Aeromonas hydrophila / sobria / caviae