



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**«Μελέτη της συμπεριφοράς του *Vibrio parahaemolyticus*, σε φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου του είδους *Gadus morhua* κατά τη διαδικασία του ξαμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες»**

**του**

**ΣΩΤΗΡΙΟΥ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ του ΙΩΑΝΝΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2016**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**«Μελέτη της συμπεριφοράς του *Vibrio parahaemolyticus*, σε φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου του είδους *Gadus morhua* κατά τη διαδικασία του ξαμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες»**

**του**

**ΣΩΤΗΡΙΟΥ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ του ΙΩΑΝΝΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2016**

## **Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Σολωμάκος Νικόλαος (Επιβλέπων, Επίκουρος Π.Θ.)**
- 2. Πεξαρά Ανδρεάνα (Επ. Καθηγήτρια Π.Θ.)**
- 3. Γκόβαρης Αλέξανδρος (Καθηγητής Π.Θ.)**

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας είναι η μελέτη της συμπεριφοράς του *V. parahaemolyticus* σε φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες (5 °C, 10 °C και 20 °C) που προσομοιάζουν τις ιδανικές και μη ορθές θερμοκρασιακές συνθήκες. Φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου μετά την παρασκευή τους μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Π.Θ. υπό συνθήκες ψύξης. Κατόπιν, κόπηκαν υπό άσηπτες συνθήκες σε δείγματα βάρους  $50 \pm 5$  g το καθένα και όλα τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες που συντηρήθηκαν αντίστοιχα σε 3 θερμοκρασίες  $5 \pm 1$  °C,  $10 \pm 1$  °C και  $20 \pm 1$  °C για 72 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε όλες τις ομάδες δειγμάτων του βακτηριακού εναιωρήματος *V. parahaemolyticus* ώστε ο πληθυσμός τους να κυμαίνεται στους  $4 \pm 0,5$  log cfu/g σάρκας. Τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60, και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος των δειγμάτων στις θερμοκρασίες, πραγματοποιούνταν προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των Enterobacteriaceae (EB) και του παθογόνου *V. parahaemolyticus* σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους ISO, όπως και φυσικοχημικός έλεγχος των δειγμάτων για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς τους σε NaCl,  $a_w$  και pH. Τα αποτελέσματα του φυσικοχημικού ελέγχου των δειγμάτων στο τέλος της διαδικασίας ξαρμυρίσματος (72 h) και στις 3 θερμοκρασίες (5 °C, 10 °C και 20 °C) έδειξαν ότι η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 1,9 %, το  $a_w$  0,975 και το pH 6,88. Η μικροβιολογική εξέταση έδειξε ότι οι αρχικοί πληθυσμοί για την OMX εμφάνισαν ανάπτυξη φτάνοντας στους 6,7, 7,4 και 8,1 log cfu/g στις 72 ώρες στους 5 °C, 10 °C και 20 °C, αντίστοιχα. Ομοίως, οι πληθυσμοί των Enterobacteriaceae στα δείγματα στους 5 °C βρίσκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 2,89, τους 3,62 και 4,6 log cfu/g την 72<sup>η</sup> ώρα στους 5 °C, 10 °C και 20 °C, αντίστοιχα. Τέλος, οι αρχικοί πληθυσμοί για το *V. parahaemolyticus* (4,1 log cfu/g) παρουσίασαν μικρή μείωση στους 5 °C φτάνοντας στους 3,6 log cfu/g στις 72 ώρες. Για τα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 20 °C οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* παρουσίασαν αύξηση από τις 24 ώρες και έφτασαν τους 7,5 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ( $P < 0.05$ ) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των

δειγμάτων στους 10 °C. Συνεπώς, ο υγρόγατος μπακαλιάρος πρέπει να εξετάζεται σε επίπεδο πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος για την παρουσία και τον πληθυσμό του *V. parahaemolyticus*, ενώ σε επίπεδο λιανικής πώλησης πρέπει να γίνεται ενημέρωση του καταναλωτή για την ορθή διαδικασία ξαρμυρίσματος σε θερμοκρασία ψύξης.

**Λέξεις κλειδιά:** Μπακαλιάρος, ξαρμύρισμα, *V.parahaemolyticus*, θερμοκρασία

## Abstract

The objective of this research was to study the behavior of *V. parahaemolyticus* in filleted dry salted cod during desalting process at various temperatures (5 °C, 10 °C and 20 °C), at similar, ideal and incorrect temperature conditions. Fillets of dry salted cod transferred to Department of Food Hygiene of Animal Origin of the UTH under refrigeration. Then fillets cut aseptically into samples weighting  $50 \pm 5$  g each and all samples were divided into 3 groups and were maintained at 3 temperatures of  $5 \pm 1$  °C,  $10 \pm 1$  °C and  $20 \pm 1$  °C for 72 hours. Fish samples were inoculated with *V. parahaemolyticus* and their population adjusted at  $4 \pm 0.5$  log cfu / g. At every sampling point (0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours), the determination of the Total Viable Count (TVC), Enterobacteriaceae (EB) and pathogenic *V. parahaemolyticus* were carried out according to ISO standard methods as well as physicochemical testing of samples for NaCl content,  $a_w$  and pH. Control samples were also used for physicochemical analysis. The findings, at the end of the desalting process (72 h) at three storage temperatures, showed that the sample content of NaCl was 1.9 %,  $a_w$  0.975 and pH 6.88. The microbiological analysis showed that initial populations for TVC reached at 6,7, 7,4 and 8,1 log cfu / g in 72 hours at 5 °C, 10 °C and 20 °C, respectively. Similarly, populations of Enterobacteriaceae were under the detection limit (2 log cfu / g) of up to 48 hours in the samples at 5 °C, and then reached the level of 2.89, 3.62 and 4.60 log cfu / g in 72 at 5 °C, 10 °C and 20 °C, respectively. Finally, the initial populations for *V. parahaemolyticus* (4.1 log cfu / g) showed a slight decrease to 5 °C reaching to 3.6 log cfu / g in 72 hours. For samples were desalted at 20 °C, populations of *V. parahaemolyticus* increased from 4.1 log cfu / g at 24 hours to 7.5 log cfu / g at 72 hours. The populations of aforementioned microorganism remained significantly higher ( $P < 0.05$ ) from 24 hours to the end of process in relation to populations of the samples at 10 °C. Consequently, dry salted cod should be tested in the raw material and finished product level for the presence and population of *V. parahaemolyticus*, while at the retail level should be informing consumers for the proper desalting procedure refrigerated.

**Keywords:** cod, desalting, *V. parahaemolyticus*, temperature

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΣΕΛΙΔΑ

A.	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
B.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	ii
Γ.	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	iii

## ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	3

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

<b>1.1.</b>	<b>Γενικά</b>	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	<b>Βιολογία του μπακαλιάρου του ατλαντικού (<i>Gadus morhua</i>)</b>	<b>6</b>
1.2.1.	Συστηματική κατάταξη	9
1.2.2.	Μορφολογικά χαρακτηριστικά	11
1.2.3.	Βιότοπος	12
1.2.4.	Τροφή	12
1.2.5.	Αναπαραγωγή	13
1.2.6.	Γεωγραφική εξάπλωση	13
<b>1.3.</b>	<b>Ο μπακαλιάρος στη διατροφή του ανθρώπου</b>	<b>14</b>
<b>1.4.</b>	<b>Μέθοδοι επεξεργασίας μπακαλιάρου</b>	<b>16</b>
1.4.1.	Αλάτιση μπακαλιάρου	16
1.4.1.1.	Προετοιμασία	18
1.4.1.2.	Αλάτιση	18
1.4.1.3.	Αποθήκευση	19
1.4.1.4.	Ωρίμανση	19
1.4.2.	Ξήρανση μπακαλιάρου	20
1.4.3.	Κάπνιση μπακαλιάρου	22
<b>1.5.</b>	<b>Η σημερινή κατάσταση στα αποθέματα μπακαλιάρου</b>	<b>23</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

<b>2.1.</b>	<b>Εισαγωγικά δεδομένα</b>	<b>26</b>
<b>2.2.</b>	<b>Βιολογία του <i>V. parahaemolyticus</i></b>	<b>26</b>
<b>2.3.</b>	<b>Συνθήκες ανάπτυξης</b>	<b>27</b>
<b>2.4.</b>	<b>Επιβίωση</b>	<b>28</b>
2.4.1.	Επιβίωση του <i>V. parahaemolyticus</i> σε συνθήκες ψύξης	28
2.4.2.	Επιβίωση του <i>V. parahaemolyticus</i> σε συνθήκες κατάψυξης	28
2.4.3.	Επιβίωση του <i>V. parahaemolyticus</i> κατά τη θερμική επεξεργασία	29
2.4.4.	Επιβίωση του <i>V. parahaemolyticus</i> κατά την ακτινοβόληση	29
2.4.5.	Επιβίωση του <i>V. parahaemolyticus</i> κατά την επίδραση της υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΥΠ)	29
<b>2.5.</b>	<b>Μολυσματικοί παράγοντες</b>	<b>30</b>
<b>2.6.</b>	<b>Παθογένεια</b>	<b>33</b>
<b>2.7.</b>	<b>Κατανομή και Μέθοδοι Ανίχνευσης του <i>V. parahaemolyticus</i></b>	<b>34</b>
2.7.1.	Μέθοδοι ανίχνευσης	35
2.7.1.1.	Κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης	35
2.7.1.2.	Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης	36
2.7.1.3.	Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης	38
<b>2.8.</b>	<b>Επιδημιολογικά δεδομένα και επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία</b>	<b>39</b>



## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.	Παρασκευή δειγμάτων	42
3.2.	Φυσικοχημικός έλεγχος	46
3.3.	Μικροβιολογική ανάλυση	46
3.4.	Στατιστική επεξεργασία	48

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1.	Φυσικοχημικός έλεγχος	49
4.2.	Μικροβιολογική Ανάλυση	49

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

55

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1.	Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	56
6.2.	Ελληνική βιβλιογραφία	69
6.3.	Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	69



## Ευχαριστίες

Με αφορμή την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο τους καθηγητές όσο και το προσωπικό του εργαστηρίου του Πανεπιστημίου που φρόντισαν να μεταλαμπαδεύσουν χρήσιμες γνώσεις καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τα αδέρφια μου αλλά και το φιλικό μου περιβάλλον για την ηθική και ψυχολογική στήριξη όλο αυτό το διάστημα.

Για την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της εργασίας ευχαριστώ ιδιαίτερα το προσωπικό του εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Π.Θ. που ήταν δίπλα μου και μου προσέφεραν την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντά μου, Επίκουρο καθηγητή κ. Σολωμάκο Νίκο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ανάθεση του τόσο ιδιαίτερου και ενδιαφέροντος θέματος. Ευχαριστώ επίσης την κυρία Πεξαρά Ανδρεάνα και τον κύριο Γκόβαρη Αλέξανδρο για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

## Κατάσταση Διαγραμμάτων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
Διάγραμμα 1:	Παγκόσμιες εκφορτώσεις σε τόνους, μπακαλιάρου του είδους <i>Gadus morhua</i>	24
Διάγραμμα 2:	Μεταβολή των πληθυσμών της Ο.Μ.Χ. σε υγράλατο μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαρμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.	51
Διάγραμμα 3:	Μεταβολή των πληθυσμών των <i>Enterobacteriaceae</i> σε υγράλατο μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαρμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.	52
Διάγραμμα 4:	Μεταβολή των πληθυσμών του <i>V. parahaemolyticus</i> σε υγράλατο μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαρμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.	54

## Κατάσταση Πινάκων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1:	Διατροφικό περιεχόμενο για μια μερίδα ξαμυρισμένου μπακαλιάρου 100 g	15
Πίνακας 2:	Περιεκτικότητα νερού και άλατος (%), σε προϊόντα υγράλατου, αποξηραμένου και ξαμυρισμένου μπακαλιάρου του είδους <i>G. morhua</i>	21

# ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγή

Η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη διατροφή αλλά και το εισόδημα των ανθρώπων που ασχολούνται με αυτή. Η κατανάλωση ψαριών αποτελεί μέρος της πολιτιστικής παράδοσης πολλών κοινωνιών και για ορισμένους ανθρώπους είναι η κύρια πηγή πρόσληψης πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας και πολλών άλλων βασικών θρεπτικών συστατικών. Παγκοσμίως, το ποσοστό της ζωικής πρωτεΐνης που προσλαμβάνεται από την κατανάλωση ψαριών και αλιευτικών προϊόντων ανέρχεται στο 17 % (FAO, 2014).

Τα ψάρια, όπως και οι υπόλοιπες τροφές ζωικής προέλευσης, αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας και αμινοξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δόμηση των ιστών και την αποκατάσταση των φθορών τους. Ως προς την περιεκτικότητά τους σε λίπος, αυτή διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το είδος του ψαριού. Υπάρχουν ψάρια με χαμηλά λιπαρά, όπως ο μπακαλιάρος και η γλώσσα των οποίων το λίπος κυμαίνεται από 0.5-2%, και ψάρια πλούσια σε λιπαρά, όπως η πέστροφα, ο σολομός και το σκουμπρί με περιεκτικότητα λίπους 10-20%.

Τα ψάρια είναι πλούσια σε βιταμίνη Α, η οποία έχει άμεση σχέση με την όραση, καθώς συμβάλλει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ματιών μας. Άλλη βιταμίνη την οποία παρέχουν τα ψάρια είναι η βιταμίνη D, η οποία είναι υπεύθυνη για την αύξηση και τον εμπλουτισμό των οστών και των δοντιών αλλά και για την απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου (Halwart, 2013). Οι βιταμίνες Α και D βρίσκονται κυρίως στα λιπαρά ψάρια και στο ήπαρ των άλλων ψαριών. Ως προς τα ιχνοστοιχεία που παίρνουμε από τα ψάρια, αυτά είναι το ασβέστιο, το οποίο λαμβάνουμε κυρίως από τα μικρά ψάρια και τα κόκκαλά τους, όπως ο γαύρος και η μαρίδα, και ο φώσφορος (Thilsted, 2012). Τα ψάρια περιέχουν, επίσης, ιώδιο και σελήνιο.

Τέλος, τα ω-3 λιπαρά οξέα, τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα ψάρια είναι απαραίτητα για τον οργανισμό και έχουν πολλά και ευεργετικά οφέλη. Μια πρόσφατη διερεύνηση του FAO/WHO (2011) έδειξε ότι βοηθούν στη μείωση της

χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων, περιορίζουν τον κίνδυνο για καρδιακές παθήσεις και εγκεφαλικά, ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, παρεμποδίζουν την αθηροσκλήρωση και τη θρόμβωση, βελτιώνουν την πνευματική απόδοση και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της γήρανσης του νευρικού συστήματος. Το λίπος των ψαριών θεωρείται ωφέλιμο γιατί ακριβώς παρέχει στον οργανισμό αυτά τα στοιχεία, τα οποία, ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει και είναι απαραίτητο να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής.

Με την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, η ζήτηση για τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα αναμένεται να κορυφωθεί τα επόμενα χρόνια εάν η κατά κεφαλήν κατανάλωση παραμείνει στο σημερινό παγκόσμιο μέσο επίπεδο των 19 kg / έτος ή αν αυτή αυξηθεί (FAO, 2014).

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα οφέλη που προκύπτουν από την κατανάλωση ψαριών έχει αντίστοιχα και αυξανόμενη ανησυχία για τους πιθανούς φυσικούς αλλά και χημικούς κινδύνους αυτών, όπως είναι η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών και η βιοσυσσώρευση τοξικών ιχθυοστοιχείων αντίστοιχα. Η κατανάλωση ψαριών, όπως και για οποιαδήποτε άλλο τρόφιμο, μπορεί να οδηγήσει σε κατάποση βλαπτικών παραγόντων. Τα επίπεδα μερικών μολυσματικών παραγόντων, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι υψηλότερα από τα μέγιστα επιτρεπόμενα επίπεδα στα ψάρια.

Ο μπακαλιάρος είναι άπαχο ψάρι, με ιδιαίτερη γεύση, οσμή, και υψηλή εμπορική αξία (Pereira de Abreu et al, 2011). Η σάρκα του είναι λευκή, και παραδοσιακά ο άνθρωπος το έχει χρησιμοποιήσει για την τροφή του. Στις Μεσογειακές χώρες, καταναλώνεται κυρίως ως αλατισμένος (Martínez-Alvarez & Gomez-Guillen, 2013).

Μεταξύ των τροφιμογενών παθογόνων που έχουν μεγάλη σημασία για την ασφάλεια των αλιευμάτων είναι το *Vibrio parahaemolyticus*. Συσσωρεύεται κυρίως σε στρείδια, και άλλα δίθυρα μαλάκια, και μπορεί να φθάσει σε επίπεδα που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο, εάν οι θερμοκρασίες μετά την αλίευση δεν ελέγχονται επαρκώς (Fernandez-Piquer et al, 2011). Ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια, είναι αλόφιλο, μη σπορογόνο, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο, της οικογένειας *Vibrionaceae*, και απαντάται συνήθως σε υδάτινα οικοσυστήματα αλλά και εκβολές ποταμών (Lhafi & Khune, 2007). Έχει αναγνωριστεί ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενών λοιμώξεων, μετά από την κατανάλωση ψαριών και θαλασσινών,

κυρίως στην Ασία (Nair et al, 2007). Η συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού ποικίλλει στις διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο. Η κατανομή του στα υδάτινα οικοσυστήματα σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία του νερού. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *V. parahaemolyticus* ανιχνεύεται σπάνια, μέχρι η θερμοκρασία του νερού να ανέλθει σε θερμοκρασία μεγαλύτερη ή ίση των 15° C (Su and Liu, 2007).

Τα τελευταία χρόνια προκύπτουν ανησυχίες για τον αντίκτυπο των ανθρωπογενών μεταβολών τόσο στους χερσαίους όσο και στους υδάτινους οικοτόπους, σε συνδυασμό με την παγκόσμια αλλαγή του κλίματος. Οι μελέτες συνεχώς εξελίσσονται και χρησιμοποιούνται αναπτυγμένα μοντέλα για την πρόβλεψη των κλιματικών παραγόντων, ώστε να αποφευχθούν ορισμένες ασθένειες που προκαλούνται από την έμμεση κατανάλωση τροφιμογενών παθογόνων ένα εκ των οποίων είναι το *V. parahaemolyticus* (Colwell, 1996). Η απομόνωση πανδημικών στελεχών του *V. parahaemolyticus* από τα αλιεύματα αλλά και τα κρούσματα που εμφανίζονται στον Ευρωπαϊκό χάρτη, πιθανότατα λόγω της μεταβολής των κλιματικών συνθηκών και της αύξησης της θερμοκρασίας των υδάτων των θαλασσών στον πλανήτη μας, εγείρει την ανησυχία του επιστημονικού κόσμου.

### **Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συμπεριφοράς του *V. parahaemolyticus* σε φιλέτα υγρόγαλου μπακαλιάρου κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες (5°C, 10 °C και 20 °C) που προσομοιάζουν τις ιδανικές και μη ορθές θερμοκρασιακές συνθήκες.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

## 1.1. Γενικά

Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) είναι ένα από τα πιο σημαντικά και εμπορικά είδη ψαριών τόσο για τη Βόρεια Ευρώπη όσο και για τις Ανατολικές ακτές της Βόρειας Αμερικής. Η αλίευση του είδους χρονολογείται από πολλούς αιώνες πριν, όπου αποτελούσε παράδοση καθώς και πηγή εισοδήματος για πολλές παράκτιες κοινότητες. Ο πληθυσμός του μπακαλιάρου του Ατλαντικού ποικίλει και είναι χωρισμένος σε διάφορα αποθέματα με διαφορετικό μέγεθος πληθυσμού ο οποίος σχετίζεται και με την συχνότητα και την ένταση της αλίευσης του στα διάφορα γεωγραφικά πλάτη, όπου απαντάται. Οι περιοχές όπου αλιεύεται κυρίως είναι η βορειοανατολική Αρκτική και η Ισλανδία. Τα αποθέματα μπακαλιάρου στη Βόρεια Αμερική είχαν μειωθεί σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, ενώ στις μέρες η αλίευση του είδους είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με τα επίπεδα του παρελθόντος. Παρόμοια είναι και η κατάσταση για τα περισσότερα από τα ευρωπαϊκά αποθέματα. Οι συνολικές εκφορτώσεις μπακαλιάρου παγκοσμίως για το έτος 2008 ανήλθαν στους 765 000 τόνους, εκ των οποίων περίπου το 73 % προήλθαν από τη Νορβηγία, την Ισλανδία και Ρωσία ([http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gadus\\_morhua/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gadus_morhua/en)). Ο μπακαλιάρος εκτιμάται ιδιαίτερα λόγω της υψηλής του διατροφικής αξίας και πωλείται ως νωπός, κατεψυγμένος ή επεξεργασμένος ως φρέσκα ή αλατισμένα φιλέτα. Ο μπακαλιάρος από τις υδατοκαλλιέργειες είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στην παγκόσμια αγορά και συχνά λαμβάνει υψηλότερες τιμές από τα άγρια αποθέματα (Kjesbu, 2006).

Η καλλιέργεια του μπακαλιάρου του Ατλαντικού έχει επίσης μια μακρά ιστορία. Στην δεκαετία του 1880 ο Νορβηγός καπετάνιος O.M. Dannevig ξεκίνησε πειράματα για εντατική εκτροφή μπακαλιάρου. Σκοπός του ήταν να αυξήσει τα παράκτια αποθέματα απελευθερώνοντας προνύμφες μπακαλιάρου με τον λεκιθικό τους σάκο (Dahle et al., 2006). Παρόμοια πειράματα είχαν διεξαχθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και στον Καναδά, κατά την περίοδο 1884-1971 απελευθερώνοντας δισεκατομμύρια προνυμφών μπακαλιάρου κυκλοφόρησαν. Ο Νορβηγός Dannevig παρήγαγε επίσης, μερικές χιλιάδες ιχθύδια μπακαλιάρου, τα οποία τρέφονταν αποκλειστικά με φυσικό ζωοπλαγκτόν σε πρότυπους ιχθυοκλωβούς εντός του θαλασσινού νερού. Τα

πειράματα αυτά αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη των σύγχρονων υδατοκαλλιέργειών μπακαλιάρου (Dahle et al., 2006).

Γύρω στο 1980 η χρήση ιχθυοκλωβών θαλασσινού νερού για την παραγωγή γόνου μπακαλιάρου ξεκίνησε και πάλι από Νορβηγούς επιστήμονες και το 1983, ο πρώτος ήταν σε θέση να παράγει ένα σημαντικό ποσό (75.000) ιχθυδίων μπακαλιάρου (Jobling & Pedersen, 1995). Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα από τα θαλάσσια είδη, η παραγωγή ιχθυδίων έχει τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Η δυνατότητα παραγωγής ιχθυδίων, προκάλεσε το ενδιαφέρον ορισμένων επενδυτών ξεκινώντας έτσι τις πρώτες εμπορικές υδατοκαλλιέργειες μπακαλιάρου κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, χωρίς όμως σημαντικά οικονομικά οφέλη, το οποίο οδήγησε στο κλείσιμο όλων των επιχειρήσεων μετά από λίγα χρόνια (Kjesbu et al., 2006). Αυτές οι πρώτες εμπορικές δοκιμές για την καλλιέργεια του είδους βασίστηκαν στην παραγωγή ιχθυδίων που προέρχονταν εκτατικού τύπου συστήματα. Τέτοια συστήματα δίνουν υψηλής ποιότητας ιχθύδια, αλλά η παραγωγική τους ικανότητα είναι περιορισμένη. Το 2000 αναπτύχθηκε ένα νέο «κύμα» ενδιαφέροντος για την καλλιέργεια μπακαλιάρου, και αυτή τη φορά δεν αφορούσε μόνο τη Νορβηγία, αλλά και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, τον Καναδά, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ισλανδία και άλλες χώρες (Rosenlund & Halldorsson, 2007).

Προς το παρόν η τεχνολογία της παραγωγής ιχθυδίων αναπτύχθηκε περαιτέρω στα μεγάλα εκκολαπτήρια, τα οποία έχουν βασιστεί στα ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα παραγωγής ιχθυδίων που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες λαβρακιού και τσιπούρας (Brown et al., 2003). Σύμφωνα με τις νέες εξελίξεις για την επίτευξη παραγωγής αυτών όλο το χρόνο, καθώς και τη μείωση του προβλήματος της πρόωρης σεξουαλικής ωρίμανσης των γεννητόρων, η βιολογική βάση για την υδατοκαλλιέργεια μπακαλιάρου έχει επιτευχθεί (Taranger et al., 2006). Οι επενδύσεις στις υδατοκαλλιέργειες μπακαλιάρου, τόσο για τα εκκολαπτήρια και όσο για τις μονάδες εκτροφής έχει αρχίσει να επιταχύνετε. Μέσα σε λίγα χρόνια η ετήσια ικανότητα παραγωγής, έφτασε τα 60 εκατομμύρια ιχθύδια και περίπου τις 400 μονάδες εκτροφής μόνο στη Νορβηγία (Kjesbu et al., 2006). Τα παραπάνω νούμερα αντιστοιχούν σε ετήσια παραγωγική ικανότητα της τάξης των 180.000 τόνων. Ωστόσο, λόγω της οικονομικής κρίση και ορισμένων πολύ δύσκολων και απρόβλεπτων βιολογικών προβλημάτων που προέκυψαν και δεν αναμενόταν έχει τις

περισσότερες από αυτές τις επιχειρήσεις να κλείσουν. Σήμερα η υδατοκαλλιέργεια μπακαλιάρου είναι σταθερή.

## 1.2. Βιολογία του μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*)

Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού ανήκει στα βενθοπελαγικά ψάρια, με εξαίρεση ορισμένες περιπτώσεις, όπως είναι η περίοδος της ωοτοκίας και η εύρεση τροφής. Στις περιπτώσεις αυτές λόγω της αλλαγής του περιβάλλοντος θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως πελαγικό είδος (<http://www.fao.org/fishery/species/2218/en>). Τα ενήλικα ψάρια βρίσκονται συνήθως σε βαθύτερα και πιο κρύα νερά. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, δημιουργούν ομάδες και κολυμπούν περίπου 30 – 80 μέτρα πάνω από τον πυθμένα, αναζητώντας την τροφή τους ατομικά πλέον τη νύχτα (Cohen, 1990; Uzar & Plikshs, 2000). Η παρουσία του μπακαλιάρου σε μια περιοχή επηρεάζεται συνήθως, από τη διαθεσιμότητα της τροφής και όχι τόσο από τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν σε αυτή. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα ψάρια βρίσκονται σε ψυχρότερα νερά στις περισσότερες περιοχές (0 °C – 5 °C). Είναι παμφάγο είδος και τρέφεται κυρίως με ασπόνδυλα και ψάρια καθώς και ιχθύδια μπακαλιάρου (Cohen, 1990). Ενδημεί σε σχεδόν σε κάθε αλατότητα από σχεδόν φρέσκο νερό έως και σε πλήρες ωκεάνιο νερό, καθώς και σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, από περίπου θερμοκρασίες κατάψυξης έως και τους 20 ° C.

Παρά το γεγονός ότι ορισμένες ομάδες του νεαρών ατόμων βακαλάου είναι σχετικά στάσιμες, μερικές φορές μεμονωμένα άτομα ή ομάδες μπορεί να εκτελέσουν εκπληκτικά μεγάλες αποστάσεις μεταναστεύοντας. Μερικά άτομα μεταναστεύουν από τα μητρικά ύδατα και δεν επιστρέφουν ποτέ, ενώ οι διανυθείσες αποστάσεις των ατόμων που μεταναστεύουν μπορεί να είναι της τάξης των 5 χιλιομέτρων ανά ημέρα (<http://www.fao.org/fishery/species/2218/en>). Η ταχύτητα των ψαριών που κινούνται από τα ανατολικά προς τα δυτικά της Γροιλανδίας έχουν υπολογιστεί στα 25,7 χιλιόμετρα / ημέρα για σχεδόν ένα μήνα. Οι μπακαλιάρους της Γροιλανδίας έχει παρατηρηθεί να εκτελούν μεταναστεύσεις πάνω από 1000 χλμ, οι μπακαλιάρους των βορειοανατολικών, 800 – 900 χλμ, ενώ οι μπακαλιάρους της Βόρειας Θάλασσας και της Θάλασσας της Ιρλανδίας πραγματοποιούν μεταναστεύσεις μικρότερου μεγέθους. Στη θάλασσα της Βαλτικής, υπάρχει μια τάση να μεταναστεύουν προς την λεκάνη του Bornholm η οποία αποτελεί ιδανικό μέρος αναπαραγωγής και διατροφής. Ο Πολικός μπακαλιάρους περνάει το μεγαλύτερο μέρος του έτους στη Θάλασσα του

Μπάρεντς, αλλά μεταναστεύει εποχιακά στις Νορβηγικές ακτές για την ωοτοκία. Στον δυτικό Ατλαντικό, στον Κόλπο του Maine, ο μπακαλιάρος κινείται σε νοτιότερο μέρος κατά την περίοδο του καλοκαιριού και έως νωρίς το φθινόπωρο, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας των υδάτων του πολικού ρεύματος κατά μήκος της ανατολικής ακτής του Λαμπραντόρ, όπου αφήνουν επιστρέφει αργότερα το φθινόπωρο για να περάσει το χειμώνα και την άνοιξη στα βαθιά νερά.

Η δηλωθείσα περίοδος πρώτης γεννητικής ωρίμανσης για τον μπακαλιάρο του Ατλαντικού είναι στα 2 χρόνια στην ανατολική (Oslofjord) και στα 4 χρόνια στη δυτική του κατανομή (Olsen et al., 2005).

Παρά το γεγονός ότι το είδος αυτό έχει ξεχωριστά φύλα, έχουν αναφερθεί δείγματα ερμαφροδιτισμού. Η αναλογία φύλου είναι σχεδόν 1:1, με ελαφρώς περισσότερα θηλυκά (McEnoy & J. MacEnoy, 1992). Αποτελεί ένα από τα πιο γόνιμα είδη ψαριών στον κόσμο, με μέσο όρο παραγωγής 1.000.000 αυγά ανά θηλυκό. Ένα θηλυκό άτομο 5 kg μπορεί να παράγει περίπου 2,5 εκατομμύρια αυγά, ένα θηλυκό 10 kg μπορεί να παράγει τα διπλάσια, δηλαδή έως και 5.000.000 αυγά και ένα θηλυκό άτομο 15 kg μπορεί να παράγει έως και 7.500.000 αυγά. Η μέγιστη παραγωγή που έχει καταγραφεί είναι τα 9.000.000 αυγά ενός ψαριού με βάρος 34 kg. Τα αυγά και οι προνύμφες τους πρώτους 2,5 μήνες είναι πελαγικά και στη συνέχεια οι μεταπρονύμφες καθιζάνουν στον πυθμένα (Fahay & Markle, 1984).

Αν και η περίοδος αναπαραγωγής ποικίλλει μεταξύ των υποπληθυσμών του Βορείου Ατλαντικού, οι περισσότεροι μπακαλιάροι στις ανατολικές και δυτικές περιοχές του ωκεανού αναπαράγονται από τον Δεκέμβριο έως τον Ιούνιο, στις Νορβηγικές ακτές, από τον Φεβρουάριο έως τον Απρίλιο, στη Βαλτική Θάλασσα, από τον Απρίλιο έως τον Ιούλιο, στη Βόρεια Θάλασσα, από τον Δεκέμβριο έως τον Μάιο, στον Κόλπο του Maine, από το Νοέμβριο έως τον Απρίλιο, στην περιοχή του Newfoundland, από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο, στη Δυτική Γροιλανδία, από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο και τέλος στο νοτιοδυτικό Κόλπο του Αγίου Λαυρεντίου, από τον Μάιο έως τον Σεπτέμβριο. Συνήθως η αναπαραγωγή του μπακαλιάρου γίνεται στον πυθμένα ή κοντά σε αυτόν. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι οι μπακαλιάροι εγκαταλείπουν τον πυθμένα όταν οι θερμοκρασιακές συνθήκες για αναπαραγωγή είναι ακατάλληλες και σχηματίζουν κοπάδια πηγαίνοντας πελαγικά για την αναπαραγωγή.

Το μέγιστο θερμοκρασιακό εύρος για να λάβει χώρα η ωοτοκία είναι από λίγο κάτω από 0 °C έως και περίπου 12 °C, με τα περισσότερα ωοτοκία λαμβάνει χώρα πάνω από την κάτω μισό αυτής της περιοχής (ICES, 2005). Οι μπακαλιάροι που ενδημούν στον Κόλπο του Maine ωοτοκούν σε ψυχρότερα νερά από ότι οι υπόλοιποι μπακαλιάροι. Η κατανομή των αποθεμάτων αναπαραγωγής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε οξυγόνο στο νερό του πυθμένα αλλά και ολόκληρης της υδάτινης στήλης, οι μπακαλιάροι που ζουν στον Κόλπο του Maine, καθώς και στα νορβηγικά ύδατα επιλέγουν να παραμείνουν στις περιοχές και για την περίοδο της αναπαραγωγής.

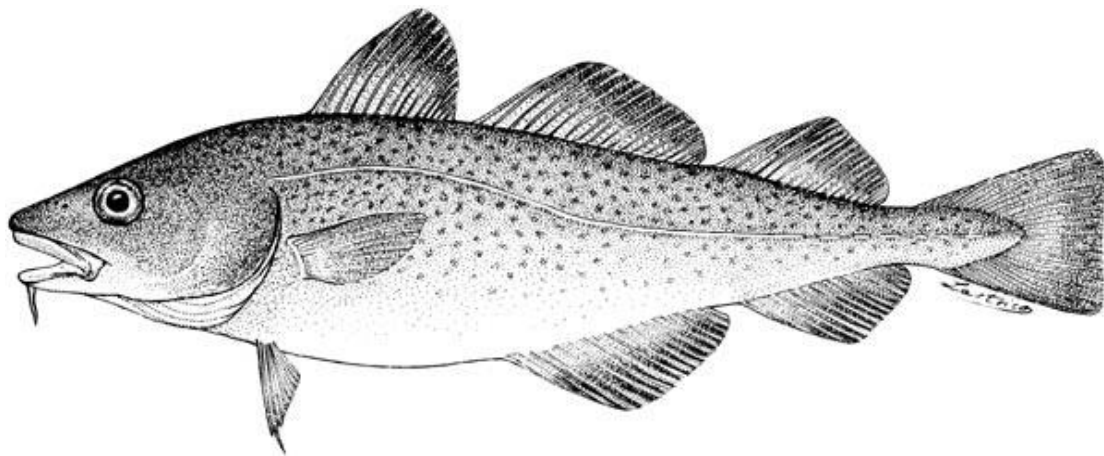
Η κυριότερη περιοχή αναπαραγωγής στον ανατολικό Ατλαντικό είναι η Βόρεια Θάλασσα, όπου γίνεται σε βάθη μικρότερα των 50 μέτρων και ποτέ μεγαλύτερα από τα 200 m. Ειδικά στη λεκάνη Bornholm της Δανίας, η πυκνότητα των αυγών βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα από τα τέλη Απριλίου έως και το τέλος του Μάιου (Dutil & Brandner, 2003). Η πιο παραγωγική περιοχή για την αναπαραγωγή του είδους στον δυτικό Ατλαντικό είναι το ανατολικό ήμισυ της όχθης του «George» και η περιοχή νότια του Μεγάλης όχθης στο Newfoundland. Η δεύτερη μεγαλύτερη περιοχή είναι το νοτιοδυτικό τμήμα του Κόλπου του Maine, μεταξύ Nantucket Shoals και τον κόλπο του Fundy. Ο μπακαλιάρος γεννά μια φορά το χρόνο (ICES, 2005).

Ο ρυθμός ανάπτυξης του μπακαλιάρου είναι αρκετά υψηλός, με τα θηλυκά ψάρια να αναπτύσσονται ελαφρώς ταχύτερα από ότι τα αρσενικά. Παρατηρούνται επίσης διαφοροποιήσεις από τη μία περιοχή στην άλλη: για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι τα ψάρια από τη Μάγχη και τη Βόρεια Θάλασσα αυξάνονται με ταχύτερους ρυθμούς από ό, τι εκείνα που ζουν σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη. Τα ψάρια ηλικίας 3 ετών κατά μέσο όρο φτάνουν τα 56 cm (αρσενικά) και τα 59 cm (θηλυκά), στην ηλικία των 5 ετών φτάνουν κατά μέσο όρο τα 81 cm (αρσενικά) και τα 85 cm (θηλυκά) (Oterra et al., 2007). Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού, του είδους *Gadus morhua* ζει έως 20 χρόνια (ICES, 2005).

Ο μπακαλιάρος είναι ένα αδηφάγο και παμφάγο είδος. Οι προνύμφες και οι μεταpronύμφες τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτό, τα νεαρά κυρίως σε ασπόνδυλα και τα μεγαλύτερα ψάρια με ασπόνδυλα και άλλα ψάρια, συμπεριλαμβανομένων των ιχθυδίων τους. Τα μικρά καρκινοειδή είναι συμμετέχουν στην διατροφή των νεαρών χαριών σε ποσοστό της τάξης του 90 % και αποτελούν άριστη τροφή μεγάλης διατροφικής αξίας μέχρι τα μικρά να φτάσουν τα 25 cm μήκος. Εν συνεχεία

αντικαθίστανται σταδιακά από δεκάποδα μεσαίου και μεγάλου μεγέθους. Τα ψάρια έχουν σημαντικότερο ρόλο από τα μαλακόστρακα στη διατροφή των ενήλικων ατόμων (Davie et al., 2007). Οι υπόλοιπες συστηματικές ομάδες παίζουν μικρότερο ρόλο ως οργανισμοί για τη διατροφή τους καθώς συμμετέχουν σε αυτή σε ποσοστά της τάξης του 10 %. Οι οργανισμοί αυτοί είναι οι πολύχαιτοι, τα εχινόδερμα και άλλοι βενθικοί οργανισμοί και περιστασιακά φύκια (Irish moss - *Chondrus crispus*) και άλλοι οργανισμοί (Davie et al., 2007). Ενώ τα ποσοστά κατανάλωσης βενθικών οργανισμών δεν δείχνουν σχεδόν καμία αλλαγή κατά τη διάρκεια του έτους, η κατανάλωση ψαριών ποικίλλει εποχιακά. Οι μπακαλιάρου που ζουν σε βαθύτερα νερά δείχνουν προτίμηση για τη ρέγγα όλο το καλοκαίρι και το φθινόπωρο με μια κορύφωση τον Ιούνιο και τον Ιούλιο, αλλά το χειμώνα και κατά τη διάρκεια της περιόδου της ωοτοκίας, οι μπακαλιάρου τρέφονται μεικτά τόσο με ψάρια όσο και άλλους βενθικούς οργανισμούς στις παράκτιες περιοχές. Φαίνεται ότι τρέφονται την αυγή και το σούρουπο, αλλά τα μικρά ψάρια με μέγεθος έως και 20 cm τρέφονται συνεχώς.

#### 1.2.1. Συστηματική κατάταξη



**Εικόνα 1:** Γραφική απεικόνιση του Μπακαλιάρου του Ατλαντικού του είδους *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758) (Πηγή: FAO).

Η συστηματική κατάταξη του μπακαλιάρου του Ατλαντικού παρουσιάζεται αναλυτικά στο Διάγραμμα που ακολουθεί με πληροφορίες που αντλήθηκαν από το Ολοκληρωμένο σύστημα πληροφοριών συστηματικής κατάταξης - Integrated Taxonomic Information System (ITIS).

<b>Βασίλειο</b>	<i>Animalia</i>
<b>Υποβασίλειο</b>	<i>Bilateria</i>
<b>Φύλο</b>	<i>Chordota</i>
<b>Υποφύλο</b>	<i>Vertebrata</i>
<b>Υπερκλάση</b>	<i>Osteichthyes</i>
<b>Κλάση</b>	<i>Actinopterygii</i>
<b>Υποκλάση</b>	<i>Neopterygii</i>
<b>Υπερτάξη</b>	<i>Paracanthopterygii</i>
<b>Τάξη</b>	<i>Gadiformes</i>
<b>Οικογένεια</b>	<i>Gadidae</i>
<b>Υποοικογένεια</b>	<i>Gadidae</i>
<b>Γένος</b>	<i>Gadus</i>
<b>Είδος</b>	<i>Gadus morhua</i> Linnaeus, 1758

**Διάγραμμα 1:** Συστηματική κατάταξη του μπακαλιάρου του Ατλαντικού (ITIS).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι εκτός από τις βασικές κατηγορίες ταξινομικής κατάταξης των ειδών είναι γενικά αποδεκτές 16 κατηγορίες: Βασίλειο, Φύλο, Υποφύλο, Υπερκλάση, Κλάση, Υπερτάξη, τάξη, Υποτάξη, Υπεροικογένεια (-oidea), Γένος, Υπογένος, Είδος, Υποείδος. Σε ορισμένες από αυτές οι καταλήξεις των ονομάτων είναι προκαθορισμένες και δίνονται μέσα σε παρένθεση (Βουλτσιάδου, 1998). Στο βασίλειο *Animalia*, Φύλο των χορδωτών, και κλάση των Ακτινοπτερυγίων (*Actinopterygii*), ανήκει η τάξη των Γαδόμορφων (*Gadiformes* cods), η οποία περιλαμβάνει έντεκα οικογένειες (*Bregmacerotidae*, *Euclichthyidae*, *Gadidae*, *Lotidae*, *Macrouridae*, *Melanonidae*, *Merlucciidae*, *Moridae*, *Muraenolepididae*, *Phycidae*, *Steindachneriidae*). Ανάμεσά τους και η οικογένεια *Gadidae* στην οποία ανήκουν τα είδη μπακαλιάρου. Αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης τάξης, αναφέρονται στα πτερύγια της πυέλου, τα οποία παρεμβάλλονται κάτω ή μπροστά από τα θωρακικά όταν είναι παρόντα, βοηθώντας στον έλεγχο της κατεύθυνσης. Τα περισσότερα ψάρια έχουν μακρά ραχιαία πτερύγια, κυκλοειδή λέπια και σπανίως εμφανίζουν μικροσκοπικές προεξοχές στην άκρη. Το κρανιακό οστό “premaxilla” σχηματίζεται σε ολόκληρη την άνω γνάθο με προέκταση σε ορισμένα. Όπως και σε πολλά οστεώδη ψάρια στη ραχιαία περιοχή βρίσκεται ένας σάκος -

κύστη που γεμίζει αέρα διατηρώντας και ελέγχοντας την πλευστότητα, χωρίς να υπάρχει ο σωλήνας – αγωγός που να τον ενώνει με το πεπτικό σύστημα. Οι οικογένειες της εν λόγω τάξης απαντώνται σε θαλασσινά, υφάλμυρα και γλυκά νερά (<http://www.fishbase.org/Summary/OrdersSummary.php?Order=Gadiformes>). Στην οικογένεια *Gadidae* ανήκουν οι μπακαλιάροι (cods και haddocks). Υπάρχουν 13 γένη της οικογένειας (*Gadus*, *Gadiculus*, *Merlangius*, *Eleginus*, *Trisopterus*, *Raniceps*, *Pollachius*, *Boreogadus*, *Melanogrammus*, *Micromesistius*, *Microgadus*, *Theragra*, *Arctogadus*). Απαντώνται στον Ατλαντικό, Ειρηνικό Ωκεανό και στην περιοχή της Αρκτικής. Χαρακτηρίζονται από τρία ραχιαία πτερύγια, το πρώτο πίσω από το κεφάλι και δεν έχουν αγκάθια. Υπάρχουν δόντια στο οστό της ύνιδας. Το μέγιστο μήκος για τον μπακαλιάρο, και συγκεκριμένα για τον μπακαλιάρο Ατλαντικού είναι μέχρι και 2 m. Τα είδη της οικογένειας *Gadidae* βρίσκονται σε περιοχές γύρω από τον Αρκτικό Ωκεανό, στο Βόρειο Πόλο, και σε εύκρατα νερά. Τα περισσότερα είναι βενθοπελαγικά, και τρέφονται με ψάρια και ασπόνδυλα. Επιπλέον, είναι γνωστή η μετανάστευσή τους σε μακρινές αποστάσεις για ωοτοκία, αναζήτηση τροφής κ.α. (<http://www.fishbase.org>).

#### 1.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού έχει σώμα ατρακτοειδές, στρογγυλεμένο στην κοιλιά. Ουραίο πτερύγιο ευθύ. Έχει μεγάλο στόμα με μικρά κοφτερά δόντια, και παρατηρείται ένα λεπτό όργανο κοντά στο στόμα που μοιάζει με μουστάκι, παρόμοιο με αυτό που διαθέτουν συνήθως τα γατόψαρα και αμβλύ ρύγχος. Έχει τρία διαφορετικά ραχιαία πτερύγια, τα δύο εκ των οποίων είναι στρογγυλεμένα και σχεδόν τετράγωνη ουρά. Παρουσιάζει μαλακές ραχιαίες και εδρικές ακτίνες από 44 – 55 και από 33 – 45 αντίστοιχα. Οι σπόνδυλοι είναι 51 – 55 και η πλευρική του γραμμή είναι λευκή και εκτείνεται από το βραγχιοκάλυμμα, πάνω από το θωρακικό πτερύγιο και καταλήγει στη βάση του ουραίου πτερυγίου. Παρατηρείται μία προεξοχή της άνω γνάθου και το μήκος του πριν τη ραχιαία περιοχή είναι λιγότερο από το 1/3 του συνολικού του μήκους. Το χρώμα του ποικίλλει από καφετί έως πρασινωπό στη ράχη του και στην άνω πλευρά γίνεται πιο χλωμό και ασημί κοιλιακά. Το χρώμα ποικίλει και μπορεί να μεταβάλλεται κάθε φορά ανάλογα με το υπόβαθρο του οικοτόπου και την αλλαγή του φυσικού του περιβάλλοντος. Φέρει επάνω του πολλά μικρά στίγματα.



Το μέσο βάρος του είναι 5 – 12 kg, αλλά έχουν καταγραφεί ψάρια που αλιεύτηκαν και έφταναν σε βάρος τα 100 kg ([www.fishwatch.gov](http://www.fishwatch.gov) ; Ryan, 1979).

### 1.2.3. Βιότοπος

Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού, *G. morhua* ανήκει στα βενθοπελαγικά ψάρια. Το βάθος στο οποίο ζει κυμαίνεται από 150 έως 200 m χωρίς ωστόσο να ξεπερνάει ποτέ το μέγιστο εύρος βάθους των 600 m (FAO-FIGIS, 2001). Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού βρίσκεται σε εύκρατα κλίματα που χαρακτηρίζονται από ρηγά νερά κοντά στην ακτή και βαθύτερα ύδατα κοντά στην υφαλοκρηπίδα. Τα μικρά ψάρια προτιμούν τα ρηγά νερά τα οποία δεν ξεπερνούν σε βάθος τα 30 m, καθώς επίσης και πιο πολύπλοκες περιοχές όπως θαλάσσια λιβάδια με πέτρες ή και ογκόλιθους, για προστασία από τους θηρευτές. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα ψάρια βρίσκονται σε ψυχρότερα νερά στις περισσότερες περιοχές (0 °C – 5 °C). Η παρουσία του μπακαλιάρου σε μια περιοχή επηρεάζεται συνήθως, από τη διαθεσιμότητα της τροφής και όχι τόσο από τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν σε αυτή. Κατά τη διάρκεια της ημέρας κολυμπούν σε βάθος 30 – 80 m πάνω από τον πυθμένα και διασπείρονται τη νύχτα για την αναζήτηση της λείας τους. Εξαιτίας αλλαγών της θερμοκρασίας των υδάτων, μεταναστεύουν για τοποθεσίες ωοτοκίας, διαχείμαση, και αναζήτηση τροφής χωρίς να ξεπερνούν τα 200 km ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) ; Uzars & Plikshs, 2000).

### 1.2.4. Τροφή

Η διατροφή του μπακαλιάρου του Ατλαντικού μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευκαιριακή, επειδή τρέφονται με οτιδήποτε μπορούν να συλλάβουν. Ο μπακαλιάρος είναι ένα αδηφάγο και παμφάγο είδος. Σε όλα τα στάδια της ζωής τους, ωστόσο, τρώνε κυρίως άλλους οργανισμούς. Οι προνύμφες και οι μεταπρονύμφες τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτό. Τα νεαρά τρέφονται κυρίως με γαρίδες και άλλα μικρά καρκινοειδή. Τα μεγαλύτερα ψάρια καταναλώνουν καλαμάρια, μύδια, κυδώνια, εχινόδερμα, εύθραυστους αστερίες, αγγούρια της θάλασσας και πολύχαιτους, και εμφανίζουν επίσης κανιβαλισμό τρώγοντας τα ίδια τους τα ιχθύδια. Η επιλογή των θηραμάτων που περιλαμβάνονται στη διατροφή τους φαίνεται να παίζει ένα ρόλο στον προσδιορισμό του χρώματος του δέρματος τους. Εκείνοι που τρέφονται με οστρακόδερμα τείνουν να εμφανίζουν πιο καστανό χρώμα, ενώ μια μπλε-πράσινη

χρωστική ουσία μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας διατροφής που αποτελείται κυρίως από ψάρια (COSEWIC, 2003; Riede, 2004).

#### 1.2.5. Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγική περίοδος του *G. morhua*, λαμβάνει χώρα μόνο μια φορά το χρόνο και διαρκεί 1 – 2 μήνες. Τα αρσενικά και τα θηλυκά που είναι έτοιμα για αναπαραγωγή συγκεντρώνονται σε ομάδες, στη συνέχεια απελευθερώνουν τα αυγά με μέσο όρο τις 8,3 παρτίδες αυγών καθώς τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους σταδιακά σε παρτίδες (Hutchings et al., 1999). Τα θηλυκά απελευθερώνουν τους γαμέτες εν συνεχεία τα αυγά απελευθερώνονται και τα γονιμοποιούν τα αρσενικά. Τα αρσενικά παρουσιάζουν επιθετική συμπεριφορά προς τα θηλυκά (Bekkevold et al., 2002).

Τα αρσενικά του είδους διακρίνονται ιεραρχικά με βάση το μέγεθός τους. Οι μεγαλύτεροι αρσενικοί μπακαλιάροι είναι πολύ πιο αποτελεσματικοί στο ζευγάρωμα και παράγουν μεγαλύτερο ποσοστό απογόνων. Ωστόσο, λόγω του μεγάλου ανταγωνισμού των αρσενικών κατά τη διάρκεια του ραντίσματος των αυγών με το σπέρμα τους, παρατηρήθηκε σε πρόσφατη μελέτη των Bekkevold et al. (2002), ότι το 75 % των αναπαραχθέντων αυγών είχαν σπέρμα από πολλά αρσενικά. Ως αποτέλεσμα του υψηλού ανταγωνισμού και της απρόβλεπτης πατρότητας, τα αρσενικά έχουν αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές ζευγαρώματος ή εκσπερματώνει σε περισσότερες παρτίδες. Η επιτυχία της ωοτοκίας εξαρτάται επίσης από τη σχέση μεγέθους του αρσενικού με το θηλυκό. Συγκεκριμένα, τα αρσενικά που είναι σημαντικά μικρότερα από τα θηλυκά έχει αποδειχθεί ότι έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας σε σχέση με τα αρσενικά που είναι μεγαλύτερα από τα θηλυκά.

#### 1.2.6. Γεωγραφική Εξάπλωση

Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού βρίσκεται σε εύκρατα κλίματα που χαρακτηρίζονται από ρηχά νερά κοντά στην ακτή και βαθύτερα ύδατα κοντά στην υφαλοκρηπίδα. Ο οικότοπός του εκτείνεται από τη Γροιλανδία έως τη Βόρεια Καρολίνα, στα ανοικτά των ακτών της Ισλανδίας και κατά μήκος των ακτών της Ευρώπης από το Βισκαϊκό Κόλπο έως τις εκβολές της Θάλασσας του Μπάρεντς, η οποία αποτελεί την πιο σημαντική περιοχή για την διατροφή τους (Naberhaus et al., 2012). Το απόθεμα της βορειοανατολικής Αρκτικής ή πολικο-νορβηγικό απόθεμα, απαρτίζεται από τον μεγαλύτερο πληθυσμό μπακαλιάρου του Ατλαντικού αυτή τη στιγμή στον κόσμο. Το

απόθεμα αυτό μερικές φορές αναφέρεται ως «skrei», μια Νορβηγική ονομασία που σημαίνει κάτι σαν «ο Περιπλανώμενος», διαφοροποιώντας τους έτσι από τους μπακαλιάρους των ακτών που δεν μεταναστεύουν (Wildscreen, 2004).



**Εικόνα 2:** Χάρτης Παγκόσμιας γεωγραφικής εξάπλωσης του Μπακαλιάρου του Ατλαντικού του είδους *Gadus morhua* (Πηγή: FAO).

### 1.3. Ο μπακαλιάρος στη διατροφή του ανθρώπου

Οι καταναλωτές προτιμούν έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα διατροφής, γεγονός που καθιστά την εμπορευματοποίηση του υγράλατου ή βαρέως αλατισμένου μπακαλιάρου δύσκολη, επειδή είναι απαραίτητη η διαδικασία του ξαρμυρίσματος πριν την κατανάλωση του (Barat et al., 2006). Ο παστός ή αλίπαστος μπακαλιάρος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των λαών της Μεσογείου, αλλά πρέπει να ξαρμυριστεί πριν το μαγείρεμα. Η διαδικασία του ξαρμυρίσματος διεξάγεται συνήθως στην κουζίνα του καταναλωτή και διαρκεί περίπου 24 ώρες (Barat et al., 2004a). Οι αλλαγές στον τρόπο ζωής των ανθρώπων και οι αυξημένοι ρυθμοί της καθημερινότητας είναι ο κύριος λόγος για τη μείωση της κατανάλωσης παστού μπακαλιάρου. Παρόλα αυτά πρόκειται για ψάρι αγαπητό με πολλές ιδιότητες και καταναλώνεται ευραίως λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας.

Ο μπακαλιάρος είναι ένα νόστιμο και θρεπτικό ψάρι. Αποτελεί πλούσια πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας και αμινοξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δόμηση των ιστών και την αποκατάσταση των φθορών τους.

Η περιεκτικότητά του σε λίπος διαφοροποιείται σημαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα ψάρια ανήκει στην κατηγορία των ψαριών με χαμηλά λιπαρά, τα γνωστά σε όλους μας «καλά» λιπαρά, δηλαδή, τα ω-3. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι βοηθούν στη μείωση της χοληστερίνης, των τριγλυκεριδίων και προστατεύουν τις αρτηρίες μειώνοντας την πίεση (Davidson et al., 2007; Harris, 1997; Sanders et al., 1997). Επίσης, είναι πηγή πολλών βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Είναι πλούσιος σε βιταμίνη Α, η οποία έχει άμεση σχέση με την όραση. Άλλη μια σημαντική βιταμίνη είναι η βιταμίνη D, η οποία είναι υπεύθυνη για την αύξηση και τον εμπλουτισμό των οστών και των δοντιών αλλά και για την απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου. Ακόμη, οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, είναι σημαντικές για την υγεία των νευρικών ιστών.

Στην Ελλάδα, ο βακαλάος εισάγεται από τις βόρειες χώρες και διατίθεται ως κατεψυγμένο προϊόν ή σε μορφή καθαρισμένου φιλέτου χωρίς κόκκαλο, έτοιμο για μαγείρεμα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το διατροφικό περιεχόμενο για 100 g ξαρμυρισμένου μπακαλιάρου.

**Πίνακας 1.** Διατροφικό περιεχόμενο για μια μερίδα ξαρμυρισμένου μπακαλιάρου 100 g προσαρμόστηκε από (<http://nutritiondata.self.com/>).

Διατροφικό περιεχόμενο	
Μέγεθος 100 g	
<b>Θερμίδες</b>	82
<b>Ολικό λίπος</b>	1 g
<b>Κορεσμένα λίπη</b>	0,2 g
<b>Μονοακόρεστα λίπη</b>	0,1 g
<b>Πολυακόρεστα λίπη</b>	0,4 g
<b>ω-6</b>	0,05 g
<b>ω-3 μακράς αλύσου</b>	0,32 g
<b>Βιταμίνη B12</b>	0,5 µg
<b>Ασβέστιο</b>	33 mg
<b>Σίδηρο</b>	0,33 mg
<b>Φώσφορο</b>	33 mg
<b>Μαγνήσιο</b>	11 mg
<b>Κάλιο</b>	28 mg

<b>Νιασίνη</b>	1mg
<b>Ενέργεια</b>	76 Kcal

#### 1.4. Μέθοδοι επεξεργασίας μπακαλιάρου

Η ξήρανση και η αλάτιση του μπακαλιάρου έχουν αποτελέσει ιστορικά τις βασικότερες μεθόδους επεξεργασίας του για το σκοπό της αποθήκευσης και της σταθεροποίησης του προϊόντος για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο διάστημα. Ωστόσο λόγω της ανάπτυξης της τεχνολογίας έχουν χάσει την σημασία τους λόγω της ευρείας χρήσης της ψύξης και της κατάψυξης. Στις μέρες μας γνήσιος μπακαλιάρος του Ατλαντικού μπορεί να βρεθεί σε πολλές μορφές όπως είναι: μπακαλιάρος υγράλατος ανοικτός, μπακαλιάρος υγράλατος φιλέτο με δέρμα, μπακαλιάρος υγράλατος φιλέτο χωρίς δέρμα, μπακαλιάρος ξαρμυρισμένος ανοικτός, μπακαλιάρος ξαρμυρισμένος φιλέτο με δέρμα, μπακαλιάρος ξαρμυρισμένος φιλέτο χωρίς δέρμα, καπνιστός κ.α.

Παρόλα αυτά ο μπακαλιάρος έχει εκτιμηθεί ιδιαίτερα ως αλατισμένο προϊόν λόγω της πολύ καλής διατήρησης, της γεύσης, της οσμής του και των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών (Bjorkevoll et al., 2003; Heredia et al., 2007).

##### 1.4.1. Αλάτιση μπακαλιάρου

Η αλάτιση αποτελεί μία από τις παλαιότερες μεθόδους διατήρησης των ψαριών και ιδιαίτερα του μπακαλιάρου (Martinez Alvarez et al., 2005a), λόγω της μείωσης της ενεργότητας του νερού. Η ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ) στους μυς του μπακαλιάρου είναι ιδιαίτερα μειωμένη, ώστε να αναστέλλεται η βακτηριακή ανάπτυξη και οι ενζυμικές αλλοιώσεις. Ως αλάτιση θεωρούμε την επεξεργασία εκείνη κατά την οποία χρησιμοποιείται αποκλειστικά και μόνο αλάτι, σε ξηρή και υγρή μορφή. Η συντήρηση των ψαριών με την μέθοδο αυτή αποβλέπει στον εμποτισμό της σάρκας του ψαριού με μαγειρικό αλάτι. Η αλάτιση των ψαριών μπορεί να γίνει ή με ξηρό αλάτι, οπότε τα ψάρια αναμιγνύονται με ανάλογη ποσότητα αλατιού ή με υγρά διάλυση αναλόγου πυκνότητας οπότε εμβαπτίζονται τα ψάρια μέσα σ' αυτή. Η τιμή της ενεργότητας νερού στα φιλέτα βαριά αλατισμένου μπακαλιάρου κυμαίνεται γενικά από 0,70 – 0,75 (Lupin et al., 1981; Gomez & Fernandez-Salguero, 1993).

Στη ξηρή αλάτιση λόγω ωσμωτικών φαινομένων εξέρχεται μικρή ποσότητα νερού και έτσι δημιουργείται ποσότητα σαλαμούρας. Το αλάτι πού είναι γνωστό και σαν

μαγειρικό αλάτι είναι ουσία ή όποια αποτελείται από χλωριούχο νάτριο και από άλλες προσμίξεις. Το αλάτι στη φύση απαντάται σε δύο μορφές είτε ως θαλάσσιο είτε ως ορυκτό. Η ποιότητα του αλατιού που χρησιμοποιείται για την συντήρηση των ψαριών καθορίζεται από τις ξένες ουσίες που υπάρχουν σε αυτό, όπως το θεικό μαγνήσιο, θεικό νάτριο, θεικό ασβέστιο, ίχνη βρώμιου, ιωδίου κ.ά (Mackie, 1993). Οι ουσίες αυτές επηρεάζουν την γεύση και την ταχύτητα διεισδύσεως του αλατιού μέσα στους ιστούς (Barat et al., 2006). Το μαγειρικό αλάτι που χρησιμοποιείται στην Τεχνολογία των ψαριών θα πρέπει να είναι λευκό, απαλλαγμένο από ξένες προσμίξεις και να περιέχει όχι περισσότερα από 11 θεικά άλατα και 1% χλωριούχο μαγνήσιο. Αν τα ανωτέρω στοιχεία βρίσκονται σε μεγαλύτερα ποσοστά, τότε το αλάτι είναι πικρό και επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος. Στη συνέχεια θα δούμε τις μεθόδους αλατίσεως για συντήρηση των ψαριών που διακρίνονται κυρίως στην ξηρή και την υγρή αλάτιση.

Στη ξηρή αλάτιση, το αλάτι επιπάσσετε στην επιφάνεια των ψαριών ή τοποθετείται κατά στοιβάδες δηλαδή ένα στρώμα άλατος και ένα στρώμα ψαριών. Στην υγρή αλάτιση, τα ψάρια εμβαπτίζονται μέσα σε άλμη (Barat et al., 2003). Πολλές φορές την ξηρή αλάτιση ακολουθεί η υγρή ή μπορεί η επεξεργασία να γίνει με συνδυασμό των δύο μεθόδων (Di Luccia et al., 2005). Κατά την ξηρή αλάτιση, σχηματίζεται μια μικρή ποσότητα σαλαμούρας, η οποία βοηθά την είσοδο του άλατος στο εσωτερικό του ψαριού. Περισσότερο αποτελεσματική πρέπει να θεωρείται η ξηρή αλάτιση, διότι το αλάτι απορροφά υγρασία ή από την ατμόσφαιρα ή από τους ιστούς λόγω ωσμωτικών φαινομένων. Έτσι τα ψάρια βρίσκονται συνεχώς σε επαφή με την κορεσμένη διάλυση του χλωριούχου νατρίου. Μειονέκτημα όμως αυτής της αλατίσεως είναι ότι το εσωτερικό των ψαριών παραμένει ανάλατο και ως εκ τούτου αυτά εκτίθενται σε βακτηριακές δραστηριότητες (Thorarinsdottir et al., 2004).

Αντίθετα, σε περίπτωση υγρής αλατίσεως τα ψάρια βρίσκονται συνεχώς σε συνθήκες μειωμένης τάσεως οξυγόνου και έτσι προστατεύονται καλύτερα από τις οξειδώσεις και αλλοιώσεις. Για την αλάτιση χρησιμοποιείται το χονδρό αλάτι αντί του λειοτριβημένου. Το χονδρό αλάτι διαλύεται σταδιακά και διεισδύει αργά στη σάρκα του ψαριού, ενώ το λειοτριβημένο διαλύεται γρήγορα και διαποτίζει τους επιφανειακούς ιστούς, των οποίων μεταβάλλει την φυσικοχημική σύσταση και την υφή λόγω θρομβώσεως των πρωτεϊνών τους (Barat et al., 2004a). Στην υγρή αλάτιση πρέπει να λαμβάνεται πάντοτε υπόψη ότι η περιεκτικότητα της άλμης σε χλωριούχο

νάτριο μειώνεται, λόγω διεισδύσεως αυτού μέσα στους ιστούς του ψαριού. Γι' αυτό πρέπει να προστίθεται νέα ποσότητα χλωριούχου νατρίου μέσα στο διάλυμα. Η αλάτιση των ψαριών περιλαμβάνει 4 στάδια και διέπεται από κάποιες βασικές αρχές:

#### 1.4.1.1. Προετοιμασία

Το πρώτο στάδιο είναι η προετοιμασία των ψαριών. Τα ψάρια πρέπει να είναι νωπά, πρόσφατα αλιευμένα, διότι όταν έχει αρχίσει η διαδικασία της αποσύνθεσης, το προϊόν θα είναι κατώτερης ποιότητας. Οι μπακαλιάροι συνήθως, όταν αλιεύονται υφίστανται αφαίμαξη και εκσπλαγχισμό επί του σκάφους, πλένονται και αποθηκεύονται άμεσα υπό ψύξη. Στη συνέχεια, στην μονάδα επεξεργασίας το ψάρι αποκεφαλίζεται, κόβεται και φιλετάρεται. Ο μπακαλιάρος κόβεται κατά μήκος της κοιλιακής του περιοχής και στο ύψος της σπονδυλικής στήλης η οποία αφαιρείται (Di Luccia and others 2005). Αμέσως μετά την κοπή, τα ψάρια πλένονται με τρεχούμενο καθαρό νερό ή καθαρό θαλασσινό νερό για να απομακρυνθεί το αίμα και η περιτοναϊκή μεμβράνη από τα τοιχώματα της κοιλιάς πριν αλάτισμα (Codex Alimentarius 2003).

#### 1.4.1.2. Αλάτιση

Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η αλάτιση των ψαριών. Τα ψάρια τοποθετούνται μέσα σε άλμη ή επιπάσσονται με ξηρό αλάτι. Η αλάτιση είναι μια διαδικασία κατά την οποία γίνεται μεταφορά νερού και άλατος στη σάρκα και από την σάρκα του μπακαλιάρου (Barat et al., 2004a) και συγκεκριμένα ο μυϊκός ιστός χάνει νερό και προσλαμβάνει άλας (Thorarinsdottir et al., 2001; Andres et al., 2002; Martinez-Alvarez & Gomez-Guillen, 2006). Συγκεκριμένα η αλάτιση του μπακαλιάρου μπορεί να γίνει και με τις δύο μεθόδους, ξηρή ή υγρή. Κατά την ξηρή αλάτιση οι μπακαλιάροι κόπτονται σε φύλλα, αλατίζονται και τοποθετούνται μέσα σε βαρέλια ή εκτίθενται στον ελεύθερο αέρα. Παραμένουν έτσι περίπου 2 εβδομάδες. Σε συνέχεια στοιβάζονται με την προσθήκη νέας ποσότητας αλατιού (Barat et al., 2003). Η υγρή αλάτιση γίνεται σε ελαφρά άλμη και η συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία. Η διάρκεια συντηρήσεως είναι πολύ μικρή και γι' αυτό οι μπακαλιάροι ξηραίνονται. Σύμφωνα με τους van Klaveren & Legendre (1965), Bogason (1987) και Akse et al. (1993), το τελικό προϊόν, δηλαδή ο αλατισμένος μπακαλιάρος περιέχει 55 % έως 58 % νερό, 18 % έως 21 % περίπου αλάτι, συγκριτικά με την πρώτη ύλη όπου το νερό

ήταν 80 % και το αλάτι μόλις 0,3 % περιεκτικότητα. Η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να μειωθεί ακόμη περισσότερο μέσω τη διαδικασίας της ξήρανσης. Η ελαφρά αλάτιση γίνεται με άλμη (16 %). Η μέση αλάτιση διά λευκού άλατος και σε συνέχεια με άλμη 20 %, η όποια διαλύει το ξηρό αλάτι και η ισχυρά αλάτιση με ξηρό αλάτι σε διαδοχικά στρώματα ψαριών και αλατιού και κορεσμένη άλμη (Oliveira et al., 2012).

#### 1.4.1.3. Αποθήκευση

Περνώντας στο τρίτο στάδιο τα ψάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε δοχεία ή βαρέλια. Είναι απαραίτητο να γίνεται ακριβής έλεγχος της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της σταθερότητας των ποιοτικών παραμέτρων, διότι υπάρχει ακόμη ο κίνδυνος ανάπτυξης αλόφιλων βακτηρίων και μικροοργανισμών που παραμένουν ενεργοί παρά την υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και τη συντήρηση των προϊόντων υπό απλή ψύξη (Pedro et al., 2004). Τα ψάρια τοποθετούνται με την κοιλιά προς τα επάνω και σε στρώματα εναλλασσόμενα άλατος και ψαριών. Το κεφάλι του ενός είναι στραμμένο προς την ούρα του άλλου. Η συντήρηση των αλατισθέντων ψαριών γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ιδίως όταν η αλάτιση είναι ελαφρά ή σε συνηθισμένη θερμοκρασία όταν η σαλαμούρα είναι μεγαλύτερης πυκνότητας (Lauritzsen et al., 2004a). Μετά από μερικές ημέρες παρατηρείται συμπίεση και ελάττωση του όγκου των ψαριών που οφείλεται στην αποβολή του νερού και στις ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα (Aas et al., 2010).

#### 1.4.1.4. Ωρίμανση

Τέλος θα πρέπει να λάβει χώρα η ωρίμανση των ψαριών. Τα αλατισμένα και ωριμασμένα πλέον προϊόντα έχουν περιεκτικότητα σε νερό 550 g – 600 g ανά κιλό (περίπου 55 % w/w) και περιεκτικότητα σε αλάτι 200 g – 250 g ανά κιλό (κάπου 20 % w/w) (Borgstrom 1968; Zaitsev et al., 1969; Bjørkevoll et al., 2003). Η διαδικασία αρχίζει λίγο χρόνο μετά την αλάτιση και γίνεται σε θερμοκρασίες διάφορες, ανάλογα με την ποσότητα του άλατος. Έτσι όταν η αλάτιση γίνεται εν ψυχρώ, ή ωρίμανση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 2 °C – 3 °C. Όταν η περιεκτικότητα σε αλάτι είναι 20 % η ωρίμανση γίνεται σε 16 °C και όταν η περιεκτικότητα είναι 20 % – 25 % τότε η ωρίμανση γίνεται σε συνηθισμένη θερμοκρασία. Η ωρίμανση οφείλεται στην αϋτόλυση των ιστών από τα ένζυμα (Borgstrom 1968). Οι αλβουμίνες λύνονται και στη λύση αυτών συμβάλλουν και τα βακτηριακά πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσεις, τριμεθυλαιαμινοξυδάση των αλοφίλων βακτηρίων). Κατά την ωρίμανση,



αναπτύσσονται πολλά αλόφιλα βακτήρια, τα όποια επιτείνουν την λύση, όταν η πυκνότητα του άλατος είναι χαμηλή (12 %). Ο χρόνος πού απαιτείται για την ωρίμανση ποικίλλει ανάλογα με το είδος, από 4-8 εβδομάδες. Τα ψάρια αποκτούν χρώμα, γεύση και το τυπικό άρωμα του αλίπαστου (Bjørkevoll et al., 2003). Τα αλατισμένα ψάρια έχουν σάρκα συμπαγή, χρώμα ανοικτό και την επιφάνεια του σώματος σχετικά αφυδατωμένη. Η σάρκα έχει το φυσικό χρώμα και μυρωδιά ευχάριστη και όχι ταγγή. Γεύση αλμυρή.

Σε ορισμένες περιοχές, η διαδικασία της αλάτισης εξακολουθεί να βασίζεται στον παραδοσιακό σχεδιασμό με τα βασικά στάδια όπως είχαν αναφερθεί μερικές δεκαετίες νωρίτερα από τους Beatty & Fougere (1957), van Klaveren & Legendre (1965). Αυτά τα στάδια περιλαμβάνουν, τον εκπλαγισμό των ψαριών, το φιλετάρισμα, την προετοιμασία, το αλάτισμα, και τη συσκευασία τους (Rodrigues et al., 2005).

#### 1.4.2. Ξήρανση μπακαλιάρου

Η επεξεργασία της ξήρανσης περιλαμβάνει κατά σειρά την αλάτιση, το πλύσιμο, την προξήρανση (water-horsing), την ξήρανση, την ταξινόμηση και τη συσκευασία (Martinez-Alvarez & Gomez-Guillen, 2005). Συγκεκριμένα για το μπακαλιάρο, η περίοδος αλάτισης διαρκεί περισσότερο, διότι περιλαμβάνεται και η αφυδάτωσή του μέσα σε μια σήραγγα με θερμό αέρα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σ' αυτό το στάδιο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα κινδύνου, μόλυνσης του ψαριού με μικροοργανισμούς από το περιβάλλον. Σύμφωνα με τους Barat et al. (2007), η σύνθεση του μπακαλιάρου αλλά και η σχέση νερού και άλατος αλλάζει ανάλογα με τον χρόνο αποθήκευσης του.

Κατά την ξήρανση του μπακαλιάρου η θερμοκρασία είναι γύρω στους 20 °C και η σχετική υγρασία χαμηλότερη από 70%. Σύμφωνα με τον Jason & Peters (1973) η ξήρανση του μπακαλιάρου εμφανίζεται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο παρατηρείται και ελέγχεται από τη σταθερή απώλεια νερού, εξαρτώμενο από τη συναγωγή του αέρα και τη μεταφορά θερμότητας. Τέλος, το δεύτερο και το τρίτο στάδιο το οποίο ελέγχεται από τον φθίνοντα ρυθμό απώλειας νερού και τη διάχυση του νερού μέσα στο ψάρι. Ο συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος στο δεύτερο από το τρίτο στάδιο και εξαρτάται από το περιεχόμενο λίπους του ψαριού. Στον αποξηραμένο μπακαλιάρο δημιουργείται ένας σχηματισμός αδιαπέραστου στρώματος

άλατος – πρωτεΐνης στην επιφάνεια του ψαριού. Έχει παρατηρηθεί ότι εκτός από την απώλεια νερού κατά τη διαδικασία της ξήρανσης συμβαίνει και μια μικρή απώλεια άλατος της τάξης του 2 % – 4 % από την επιφάνειά του μπακαλιάρου (Barat et al., 2007). Μετά το τέλος της διαδικασίας της ξήρανσης παρατηρούνται στα φιλέτα μπακαλιάρου ορισμένες αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Η σάρκα τους κιτρινίζει ελαφρά, σκληραίνει με την ξήρανση λόγω μετουσίωσης και μείωσης της ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και επιπλέον, η σκληρότητα εξαρτάται και από τη μέθοδο αλάτισης. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της ξήρανσής του είναι η ενεργότητα νερού, η οποία είναι χαμηλότερή από 0.75 (Gomez & Fernandez-Salguero, 1993). Η τιμή αυτή δεν είναι καθόλου ευνοϊκή για την ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών, ωστόσο, ορισμένα αλοανθεκτικά επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε ιδανικότερες συνθήκες. Όπως αναφέρουν οι Linton & Wood (1945), οι βέλτιστες συνθήκες ξήρανσης για τον αλατισμένο μπακαλιάρο είναι η ταχύτητα αέρα με τιμή 1 – 1.25 m / s, η σχετική υγρασία 45 %– 55 %, και η θερμοκρασία στους 26 °C (Oliveira et al, 2012). Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές περιεκτικότητας νερού και άλατος όπως προέκυψαν από μελέτες, σε προϊόντα υγράλατου, ξαρμυρισμένου και αφαλατωμένου μπακαλιάρου του είδους *G. morhua*.

**Πίνακας 2.** Περιεκτικότητα νερού και άλατος (%), σε προϊόντα υγράλατου, αποξηραμένου και ξαρμυρισμένου μπακαλιάρου του είδους *G. morhua* προσαρμόστηκε από (Oliveira et al., 2012).

<b>Gadus morhua</b>	<b>Υγράλατος</b>	<b>Αποξηραμένος</b>	<b>Ξαρμυρισμένος</b>
<b>Περιεκτικότητα</b>			
<b>ύδατος/ υγρασία (%)</b>	51 – 58	≤ 46	79,2 – 81,6
	56,8	≤ 47	76,2
	52,8 – 57,9	47,4	83,6 – 84,2
	57,6 – 58,7	47,2 – 48	80,1 – 82,7
	56 – 60	43	73
	53,3	48,1	75,4
<b>Περιεκτικότητα</b>			
<b>άλατος (% NaCl)</b>	16 – 20	16 – 20	0,8 – 0,9
	18,5	20,6	1 – 1,2
	18,4 – 20	23,3 – 26,1	2,4 – 3,9

20,2 – 20,6	20	2,2
20 – 21,8		1,3 – 1,7
23 – 25		2,3 – 2,9

### 1.4.3. Κάπνιση μπακαλιάρου

Η κάπνιση των τροφίμων, ιδίως κατά το παρελθόν, αποτελούσε μέθοδο συντηρήσεως των τροφίμων. Η συντηρητική δράση οφείλεται στα συστατικά του καπνού, τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Σήμερα, η κάπνιση δεν αποτελεί κυρία μέθοδο συντηρήσεως των τροφίμων, αλλά μέθοδο για την επίτευξη της πολύ αρεστής γεύσεως - οσμής του καπνιστού στα τρόφιμα. Συνήθως η κάπνιση ακολουθεί την αλάτιση ή το curing. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και πριν την κάπνιση υπάρχει κάποια απώλεια πρωτεϊνών. Η βιολογική αξία των πρωτεϊνών ψαριών και κρέατος μειώνεται μερικές φορές κατά 50% κατά τη θέρμανση και ξήρανση. Ειδικότερα η κάπνιση χρησιμοποιείται για τις παρακάτω δράσεις:

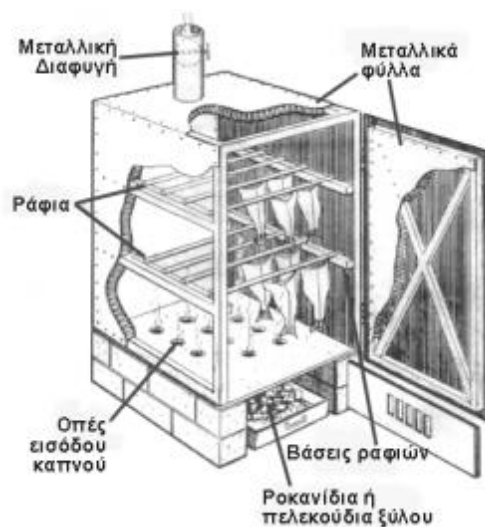
- Αναπτύσσει άρωμα και γεύση - οσμή
- Συντηρεί (δρα συντηρητικά)
- Συμβάλει στην ανάπτυξη νέων προϊόντων
- Συμβάλει στην ανάπτυξη και διαμόρφωση του χρώματος
- Προστατεύει από την οξειδωση.

Η κάπνιση εφαρμόζεται σχεδόν σε όλα τα είδη τροφίμων (AFDO, 1991). Έτσι, εφαρμόζεται στο βοδινό, αρνιά, χοιρινό, πουλερικά, κυνήγι, ψάρια και άλλα θαλασσινά, τυριά κ.α.

Η κάπνιση είναι η διεργασία εκθέσεως των τροφίμων σε καπνό ξύλου. Εξαρτωμένου από το προϊόν, μερικά προϊόντα υπόκεινται θερμική επεξεργασία και συγχρόνως καπνίζονται, ενώ άλλα καπνίζονται χωρίς θέρμανση. Ο καπνός παράγεται με καύση ροκανιδιών ξύλου (Maga, 1988). Επίσης υπάρχουν και παρασκευάσματα υγρού καπνού. Κατά την κάπνιση, λιποδιαλυτά και υδατοδιαλυτά μόρια, ατμός και άλλα σωματίδια τα οποία απελευθερώνονται από την καύση του ξύλου, επικάθονται ή εισέρχονται μέσα στη σάρκα του ψαριού (Sink, 1979). Το ψάρι απορροφά τις γευστικές-οσμηρές ενώσεις του καπνού, ενώ ταυτοχρόνως ο καπνός ξηραίνει το

τρόφιμο, απομακρύνει υγρασία και συμπυκνώνει τις γευστικές-οσμώδεις ουσίες του. Υπάρχουν δύο διεργασίες κάπνισης που είναι η θερμή κάπνιση και η ψυχρή.

Κατά τη θερμή κάπνιση γενικώς χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες 65 °C με 121 °C. Στην περίπτωση των ψαριών χρησιμοποιούνται θερμοκρασίας 65 °C – 90 °C και χρόνοι 30 – 40 min. Τα καπνιστήρια αποτελούνται από ένα μεταλλικό θάλαμο ή κύλινδρο με ένα θερμαντικό σώμα στη βάση (Εικόνα 1). Το τρόφιμο στηρίζεται σε εσχάρες ή γάντζους, ενώ για τη διαμόρφωση της κατάλληλης γεύσεως-οσμής στη βάση καίγονται ροκανίδια σκληρού ξύλου, όπως Mesquite, αγριοκαρυδιάς ή μηλιάς.



**Εικόνα 3:** Καπνιστήριο ψαριών (Πηγή: <http://www.foodtech.gr/>).

Η ψυχρή κάπνιση είναι μια σχετικά μακρά διεργασία κατά την οποία το τρόφιμο δεν θερμαίνεται αλλά μάλλον ξηραίνεται. Παραδοσιακά τα αλατισμένα κρέατα καπνίζονται επί ημέρες ή εβδομάδες σε θερμοκρασίες μεταξύ 32 °C με 55 °C. Η υψηλότερα περιεκτικότητα άλατος μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη ευρώτων και βακτηρίων (Daun, 1979). Στην περίπτωση του καπνιστού μπακαλιάρου, εφόσον έχει γίνει η εκδορά τα κατάλληλα προετοιμασθέντα φιλέτα τοποθετούνται σε άλμη 70 – 80% επί 4 – 10 λεπτά, ξηραίνονται, επαλείφονται με ελαιόλαδο και καπνίζονται στους 30 °C περίπου (Oliveira et al, 2012). Αν τα ψάρια έχουν βάρος μεγαλύτερο από 500 g, τόσο η αλάτιση, όσο και η κάπνιση, διαρκούν περισσότερο.

### **1.5. Η σημερινή κατάσταση στα αποθέματα μπακαλιάρου**

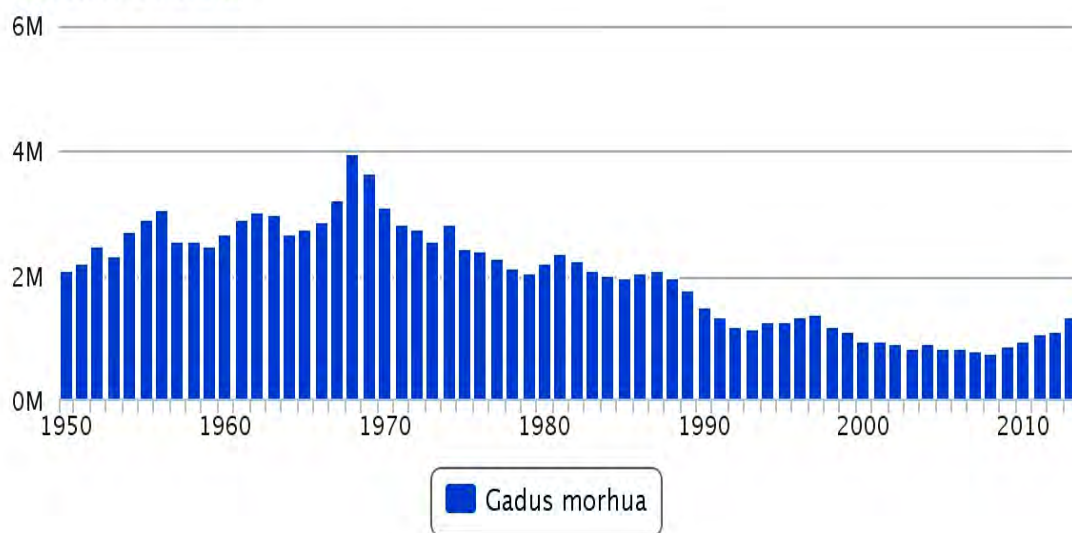
Ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα και εμπορικότερα είδη ψαριών και για το λόγο αυτό του έχει αποδοθεί και η ονομασία «βόειο κρέας της θάλασσας». Η εκμετάλλευση του ξεκίνησε στην Ευρώπη με το που

έμαθε ο άνθρωπος να αλιεύει στις Ευρωπαϊκές θάλασσες. Το κρέας του έχει υψηλή οικονομική και διατροφική αξία και με την επεξεργασία του ως αλατισμένο ή καταψυγμένο μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους. Αλιεύεται κυρίως με τράτες βυθού καθ όλη τη διάρκεια του χρόνου αλλά μπορεί να αλιευθεί και με άλλα εργαλεία σε διάφορες περιοχές όπως με απλάδια στην περιοχή του Newfoundland, γρι – γρι, παραγάδια και άλλα (Cook et al., 2015).

Όλα τα αποθέματα του βορειοανατολικού Ατλαντικού, με εξαίρεση τα αποθέματα της Βαλτικής θάλασσας έχουν υποστεί παρατεταμένες περιόδους έντονης αλίευσης από τη δεκαετία του 1970 έως και τα μέσα του 2000 (ICES, 2000). Ορισμένες απλοποιημένες εκτιμήσεις των Myers & Worm (2005) για τα ποσοστά βιομάζας μπακαλιάρου σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα σε συνολικά 21 αποθέματα έδειξαν ότι στην περιοχή του Βόρειου Ατλαντικού παραμένουν μόλις το 0,1 % έως 1 % των αρχικών αποθεμάτων. Ωστόσο, στα μέσα της δεκαετίας του 2000 και στις αρχές της δεκαετίας του 2010, συγκεκριμένα αποθέματα στον ανατολικό Ατλαντικό παρουσίασαν ανάκαμψη.

### Global Capture Production for species (tonnes)

Source: FAO FishStat



**Διάγραμμα 1:** Παγκόσμιες εκφορτώσεις σε τόνους, μπακαλιάρου του είδους *Gadus morhua* (Πηγή: FAO Fishstat).

Οι παγκόσμιες εκφορτώσεις δηλώνονται από τις ακόλουθες περιοχές αλίευσης του FAO: Βορειοανατολικό Ατλαντικό, Βορειοδυτικό Ατλαντικό, Αρκτική Θάλασσα. Η γενική τάση στις δηλωθείσες εκφορτώσεις παρουσιάζει μια συνεχή αύξηση από το

1950 φτάνοντας στο μέγιστο επίπεδο το 1970 στους 3.939.642 τόνους. Εν συνεχεία παρατηρούμε μια συνεχή μείωση των παγκόσμιων δηλωθέντων εκφορτώσεων με ελάχιστες εκφορτώσεις το 2008 που κυμάνθηκαν στους 769.317 τόνους, μια μείωση της τάξης του 63%. Από το 2008, οι εκφορτώσεις έχουν αυξηθεί ελαφρώς, σε 1.049.666 τόνους, η πλειοψηφία των οποίων (96%) προέρχονται από την ζώνη αλιείας του Βορειοανατολικού Ατλαντικού. Κατά τα τελευταία 30 χρόνια (1981-2011), οι εκφορτώσεις έχουν μειωθεί κατά 51%, ενώ τα τελευταία 20 χρόνια ο αριθμός των παγκόσμιων εκφορτώσεων μειώθηκε κατά 46% (FishStat).

Όλα τα αποθέματα του είδους αυτού είναι επί του παρόντος υπό σχεδίων διαχείρισης του πληθυσμού τους, με καθορισμένο σύνολο ετήσιων επιτρεπόμενων συλλήψεων, χρονικές και χωρικές απαγορεύσεις αλίευσης, προστατευόμενες περιοχές, καθώς και διάφορες απαγορεύσεις χρήσης συγκεκριμένων αλιευτικών εργαλείων. Τα περιοριστικά μέτρα για την ανάκαμψη των αποθεμάτων του οδήγησαν τελικά στη βελτίωση ορισμένων αποθεμάτων μπακαλιάρου στον Ανατολικό Ατλαντικό, ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι, παρά τα αυστηρά μέτρα διαχείρισης, ορισμένα αποθέματα μπακαλιάρου στο Ανατολικό Ατλαντικό παραμένουν σε κακή κατάσταση (Fernandes & Cook, 2013).

Το είδος *Gadus morhua* έχει αξιολογηθεί ως ευπαθές στην αξιολόγηση της HELCOM 2013 (IUCN, 2015). Η εκτίμηση αυτή προέκυψε από τον συνδυασμό των εκτιμήσεων για τους διάφορους του είδους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

### 2.1. Εισαγωγή

Το γένος *Vibrio* (δονάκιο) περιλαμβάνει περισσότερα από 50 είδη, όπως *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. carchariae*, *V. albensis*, *V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. rarus*, *V. proteolyticus*, *V. penaeicida*, *V. orientalis*, *V. nereis*, *V. natrigens*, *V. mediterranei*, *V. inusitatus*, *V. ichthyenteri*, *V. harveyi*, *V. haliotocoli*, *V. gazogenes*, *V. fischeri*, *V. ezurae*, *V. diazotrophicus*, *V. comitans*, *V. campbellii*, *V. azureus*, *V. aestuarianus*, *V. costicola*, *V. aerogenes*, *V. anguillarum* κ.α. (Ramamurthy & Nair 2014; Park et al., 2004; Sakata et al., 2011). Μεταξύ αυτών, το *Vibrio cholerae*, το *Vibrio parahaemolyticus*, και το *Vibrio vulnificus* είναι τα τρία κυριότερα είδη *Vibrio*, που εμπλέκονται στην πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων (Solomakos et al., 2012).

Το 1950 εμφανίστηκε το πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα που προκλήθηκε από το *V. parahaemolyticus*, στην Οσάκα της Ιαπωνίας, όπου 272 άτομα εμφάνισαν οξεία γαστρεντερίτιδα και 20 από αυτά έχασαν τη ζωή τους (Fujino et al., 1953; Daniels et al., 2000). Από τότε έως και σήμερα έχουν αναφερθεί 802 εστίες τροφιμογενών εξάρσεων με περισσότερους από 17.000 ασθενείς σε 13 παράκτιες περιοχές της Κίνας (Wang et al., 2011a). Παρόμοιες περιπτώσεις τροφιμογενών εξάρσεων έχουν αναφερθεί σε πολλές πόλεις της Ασίας, της Ευρώπης και της Αμερικής (Martinez-Urtaza et al., 2005; Su and Liu, 2007; Chao et al., 2009).

### 2.2. Χαρακτηριστικά του *V. parahaemolyticus*

Το *V. parahaemolyticus* είναι μη σπορογόνο Gram αρνητικό βακτηρίδιο, αλόφιλο και ενδημεί στο θαλάσσιο περιβάλλον σε όλο τον κόσμο (Joseph et al., 1982). Ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae* και είναι ένα από τα 30 γνωστά είδη του γένους *Vibrio*. Το *V. parahaemolyticus* είναι προαιρετικά αναερόβιο, οξειδάση θετικό, ζυμώνει τη γλυκόζη χωρίς παραγωγή αερίου και αποκαρβοξυλιώνει την ορνιθίνη και τη λυσίνη. Τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες απομονώνεται από διάφορα αλιεύματα όπως διάφορα οστρακοειδή, σαρδέλα, μπακαλιάρο κλπ (Johnson et al., 2012; Kameko & Colwell, 1973). Το *V. parahaemolyticus* είναι ένα παθογόνο και έχει αναγνωριστεί ως ο κυριότερος παράγοντας πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων από αλιεύματα στις ΗΠΑ αλλά και παγκοσμίως (Bisha, 2012; Daniels et al., 2000; Nair et al., 2007).

Επίσης, ως αλόφιλο βακτήριο, μπορεί να αναπτύσσεται σε μέσα με ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 % NaCl και μέγιστη συγκέντρωση έως και 10,5 % NaCl, ενώ για την καλύτερη ανάπτυξη απαιτεί συγκεντρώσεις 1 % – 3 %. (Naughton, 2007; Solomakos et al., 2012).

Η συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού ποικίλλει στις διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο. Η κατανομή του στα υδάτινα οικοσυστήματα σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία του νερού. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *V. parahaemolyticus* ανιχνεύεται σπάνια, μέχρι η θερμοκρασία του νερού να ανέλθει σε θερμοκρασία μεγαλύτερη ή ίση των 15° C (Su and Liu, 2007).

### **2.3. Ανάπτυξη**

Το εύρος θερμοκρασίας στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί το *V. parahaemolyticus* είναι από 5 °C – 43 °C, με ιδανική θερμοκρασία τους 37 °C (Levin, 2006). Η ανάπτυξή του σε άριστες συνθήκες μπορεί να είναι ταχεία με χρόνος διπλασιασμού 9 – 10 λεπτά. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Kaufman et al. (2003), βρέθηκε ότι μέσα σε χρονική διάρκεια 24 ωρών και θερμοκρασία 26 °C που προσομοιάζει την τυπική θερμοκρασία στον Κόλπο του Μεξικό, ο μικροοργανισμός στα μύδια αυξήθηκε 13 έως 26 φορές.

Το εύρος του pH στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί το *V. parahaemolyticus* μπορεί κυμαίνεται από την περιοχή του ουδέτερου έως αλκαλικό. Τα ιδανικά όρια pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι 7,8 – 8,6 ενώ οι ακραίες τιμές ανάπτυξης είναι 4,8 – 11,0. Για το λόγο αυτόν, τα καλλιεργητικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως εμπλουτιστικά και εκλεκτικά, έχουν τιμή pH μεταξύ 8 – 8,8 (Ramamurthy & Nair 2014). Πρέπει να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη του βακτηριδίου αναστέλλεται με την παρουσία 0,1 % οξικού οξέος σε pH 5,1 (Lake et al., 2003).

Επίσης, μπορεί και αναπτύσσεται με την παρουσία ή απουσία οξυγόνου, όμως ιδανική ανάπτυξη έχει σε αερόβιες συνθήκες περιβάλλοντος. Ως αλόφιλο βακτήριο, μπορεί να αναπτύσσεται σε μέσα με ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 % NaCl και μέγιστη συγκέντρωση έως και 10,5 % NaCl, ενώ για την καλύτερη ανάπτυξη απαιτεί συγκεντρώσεις 1 % – 3%. (Naughton, 2007; Solomakos et al, 2012). Ο συντελεστής ενεργού ύδατος  $a_w$  επηρεάζει και αυτός την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και το



δυνατό εύρος ανάπτυξης είναι 0,940 έως 0,996, με βέλτιστη τιμή 0,980 (Lake et al., 2003).

## 2.4. Επιβίωση

### 2.4.1. Ψύξη

Η αντοχή των μικροοργανισμών στην ψύξη εξαρτάται από τον τύπο του μικροοργανισμού, το είδος του στελέχους και τη φάση της κυτταρικής ανάπτυξης. Γενικά, επιβιώνουν καλύτερα σε υπό το μηδέν θερμοκρασιακές συνθήκες μικρόβια που αναπτύσσονται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή κάτω των 20 °C, συγκριτικά με μικρόβια που πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (Jay, 1996). Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Muntada – Carriga et al., (1995) σε πληθυσμούς μυδιών για την παρατήρηση της επιβίωσης του *V. parahaemolyticus* σε θερμοκρασίες ψύξης στους 4 °C και 0 °C συμπέραναν, ότι η μείωση του μικροοργανισμού και στις 2 θερμοκρασίες ήταν λογαριθμική. Διαπιστώθηκε ότι, το αρχικό μικροβιακό φορτίο επηρέαζε την χρονική διάρκεια επιβίωσης του μικροοργανισμού, καθώς για μεγάλο αρχικό μικροβιακό φορτίο παρατηρήθηκε μεγαλύτερη διάρκεια επιβίωσης.

### 2.4.2. Κατάψυξη

Η κατάψυξη των τροφίμων αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο τρόπο συντήρησής τους. Η κατάψυξη αναστέλλει την ανάπτυξη, περιορίζει αλλά δεν καταστρέφει τους μικροοργανισμούς. Το *V. parahaemolyticus* βρέθηκε από τους Vasudevan et al., (2002) ότι μπορεί να επιβιώσει σε συνθήκες κατάψυξης στους – 18 °C για 7 εβδομάδες σε φιλέτα ψαριού, παρουσιάζοντας 10 έως και 1000 φορές μείωση του πληθυσμού του. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στους 4 °C – 8 °C με μόνη διαφορά ότι η μείωση του πληθυσμού ήταν λιγότερο έντονη. Μελέτες με *V. parahaemolyticus* έδειξαν ότι, όταν το μικροβιακό φορτίο υπερβαίνει το 10<sup>7</sup> CFU/mL, ανιχνεύονται μικροοργανισμοί σε αστακούς που έχουν καταψυχθεί στους - 24 °C για 18 εβδομάδες, αλλά όχι σε αστακούς όπου το αρχικό μικροβιακό τους φορτίο ήταν μικρότερο από 10<sup>5</sup>. Σύμφωνα με τους Dimitraki & Velonaki, (2007) το *V. parahaemolyticus*, είναι μετρίως ευαίσθητο στην κατάψυξη και μπορεί να επιβιώσει στα κατεψυγμένα θαλασσινά για μεγάλες περιόδους.

#### 2.4.3. Θερμική επεξεργασία

Η θερμική επεξεργασία θεωρείται αποτελεσματική για την εξάλειψη και καταστροφή των κυττάρων όλων των *Vibrio spp* και εγκρίθηκε ως διαδικασία εξυγίανσης από το Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC), το 2003 (Drake et al., 2007). Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Andrews et al. (2000), διαπιστώθηκε μείωση του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια, από 5 log cfu/g σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (<3 MPN/g), σε μόλις 5 min, σε νερό θερμοκρασίας 55 °C (εσωτερική θερμοκρασία 50 °C). Σε παρόμοια μελέτη του ίδιου συγγραφέα (2003), διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος O3 : K6 είναι περισσότερο θερμοάντοχο σε σχέση με στέλεχος που ενδημεί σε θαλάσσια ύδατα. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι, στη θερμοκρασία των 52 °C, η τιμή D για το πρώτο βρέθηκε 1,3 – 1,6 min, ενώ για το τελευταίο 1,0 – 1,2 min.

#### 2.4.4. Ακτινοβόληση

Η διαδικασία της ακτινοβόλησης εφαρμόζεται στα τρόφιμα αλλά και στα αλιεύματα για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης τους καθώς και για την εξυγίανση τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Το *V. parahaemolyticus*, είναι αρκετά ευαίσθητο στην ακτινοβολία με τιμή D 0.022 kGy για νωπά αλιεύματα στους 24 °C. Η προτεινόμενη δόση ακτινοβόλησης για την εξυγίανση γαρίδων από το *V. parahaemolyticus* είναι 3 kGy, ενώ στο 1 kGy επιτυγχάνεται μείωση της τάξης των 5-6 log<sup>10</sup> σε στρείδια (Jakabal et al., 2003).

#### 2.4.5. Υψηλή Υδροστατική – Πίεση (ΥΥΠ)

Η υψηλή υδροστατική πίεση, αποτελεί μια διαδικασία μη θερμικής εξυγίανσης των τροφίμων καθώς η άσκηση πίεσης της τάξης των 100 MPa αυξάνει τη θερμοκρασία του τροφίμου μόλις 2 °C. Επίσης, ο όγκος του τροφίμου μπορεί να μειωθεί έως και 25 %. Η επίδραση της στους μικροοργανισμούς έχει ως αποτέλεσμα την βλάβη της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αδρανοποίηση ενζύμων (επιβράδυνση ρυθμού πολλαπλασιασμού), μείωση της τιμής του pH (ανακατανομή

ηλεκτρικών φορτίων), αναδιάταξη των μορίων του νερού με μείωση του όγκου των μικροοργανισμών κατά 25 % και τελικά αποσυμπίεση κατά 10 %.

Γενικά, όλα τα *Vibrio* spp, είναι ευαίσθητα στη δράση της ΥΥΠ (Drake et al., 2007). Η προτεινόμενη διαδικασία προβλέπει επίπεδα μεγαλύτερα από 350 MPa για χρονικό διάστημα 120 s, σε θερμοκρασίες 1 – 35 °C, ή μεγαλύτερα από 300 MPa σε θερμοκρασία > 40 °C για τον ίδιο χρόνο, ώστε να επιτευχθεί μείωση κατά 5 log του *V. parahaemolyticus* (Ramamurthy & Nair 2014). Η άσκηση πίεσης 345 MPa για 90 s έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μειώσει τους πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* σε οστρακοειδή που είχαν εμβολιαστεί με αυτό κατά περίπου  $6 \log^{10}$ , ενώ στην ίδια πίεση για 120 s μειώθηκε μόνο κατά  $5,3 \log^{10}$  (Calik et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ΥΥΠ είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την εξυγίανση των οστρακοειδών.

## 2.5. Μολυσματικοί παράγοντες

Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα στελέχη του *V. parahaemolyticus* που απομονώνονται από το περιβάλλον και κυρίως από το θαλάσσιο περιβάλλον δεν είναι παθογόνα (Nichibuchi & Kaper, 1995; FDA, 2005). Τα κλινικά στελέχη του *V. parahaemolyticus* διαφοροποιούνται από τα περιβαλλοντικά στελέχη από την ικανότητά τους να παράγουν απευθείας μια θερμοανθεκτική αιμολυσίνη (Thermostable Direct Hemolysin – TDH). Η τυπική αντίδραση παθογονικότητας του μικροοργανισμού, έχει περιγραφεί με το φαινόμενο Kanagawa (Kanagawa phenomenon – KP). Πρόκειται για την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλείται από συγκεκριμένες αιμολυσίνες του *V. parahaemolyticus* στο Wagatsuma agar. Στελέχη που στο υπόψη άγαρ, εμφανίζουν μία καθαρή μεγάλη άλω αιμόλυσης ύστερα από επώαση 18 – 24 ωρών, στους 37 °C, χαρακτηρίζονται ως KP+ και θεωρούνται λοιμογόνα (Levin, 2006). Έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται συνήθως με στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους με γαστρεντερίτιδα, αλλά σπάνια παρατηρήθηκε σε στελέχη *Vibrio* από περιβαλλοντικές απομονώσεις (Joseph et al., 1982).

Ως εκ τούτου, τα στελέχη με δυνατότητα παραγωγής αιμολυσίνης TDH, έχουν αναγνωριστεί ως ο σημαντικότερος λοιμογόνος παράγοντας του *V. parahaemolyticus* (Miyamoto et al., 1969; Takeda, 1983). Παρά τις επιδημιολογικές έρευνες που αποκάλυψαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου Kanagawa (KP) και την

παθογένεια του *V. parahaemolyticus*, έχουν απομονωθεί από ασθενείς, τα οποία στελέχη ήταν KP- (αρνητικά στελέχη) και δεν μπορούν να παράγουν απευθείας την TDH αιμολυσίνη, αλλά μια άλλη θερμοευαίσθητη αιμολυσίνη (TRH) (Honda et al., 1987, 1988). Επίσης, οι Jay et al. (2005), αναφέρουν ότι τα περισσότερα παθογόνα στελέχη που απομονώνονται είναι KP +, ενώ τα περισσότερα μη παθογόνα στελέχη, είναι KP –.

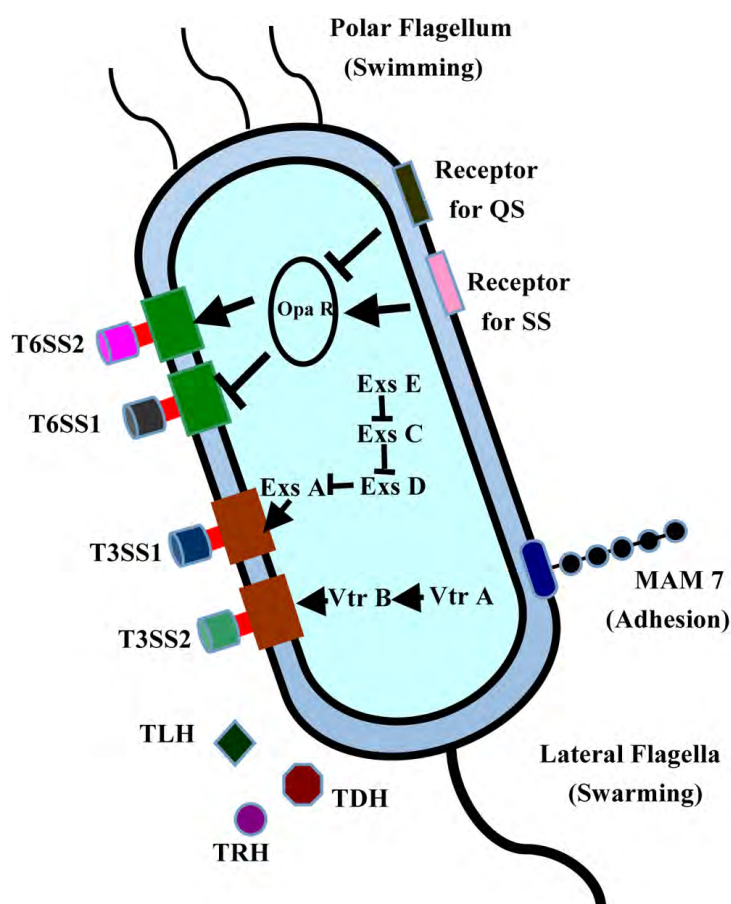
Οι Shirai et al. (1990) εξέτασαν 215 κλινικά στελέχη του *V. parahaemolyticus* που απομονώθηκαν από ασθενείς με διάρροια για την εύρεση γονιδίων που μπορούν να κωδικοποιούν TDH και την TRH αιμολυσίνη, διαπιστώνοντας ότι 52 στελέχη (24,3%) έφεραν μόνο το γονίδιο της TRH αιμολυσίνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η TRH αποτελεί επίσης, ένα λοιμογόνο παράγοντα του *V. parahaemolyticus*. Έτσι, το φαινόμενο Kanagawa φάνηκε να αποτελεί έναν πολύ καλό δείκτη των παθογόνων στελεχών που απομονώνονται από αλιεύματα αλλά και από δείγματα ασθενών (Ham & Orth, 2012). Προκειμένου να γίνει αποτελεσματικότερη η ανίχνευση των στελεχών του *V. parahaemolyticus*, τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν την TDH (*tdh*) και την TRH (*trh*) αιμολυσίνη κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν (Kaper et al., 1984; Nishibuchi and Kaper, 1995). Τα γονίδια αυτά αποτελούν πλέον τους κύριους δείκτες παθογονικότητας των στελεχών του *V. parahaemolyticus* (Jones et al, 2012).

Η θερμοευαίσθητη αιμολυσίνη (Thermolabile hemolysin – TLH) είναι μια άλλη αιμολυσίνη του *V. parahaemolyticus*, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *tlh*, και είναι δυνατόν να προκαλέσει τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Shinoda et al., 1991; McCarthy et al., 1999; Wang et al., 2013b). Η TLH αιμολυσίνη, εκφράζεται από όλα τα κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη του *V. parahaemolyticus*, και το γονίδιο αυξάνεται σημαντικά υπό συνθήκες εντερικής λοίμωξης (Bej et al., 1999). Εκτός αυτού, η TLH εξαρτάται από την παραγωγή λεκιθινάσης και μία γλυκεροφωσφορυλοχολίνης διεστεράσης, ενώ μπορεί να λύει επίσης τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Broberg et al., 2011). Έτσι λοιπόν μπορεί να ειπωθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως μολυσματικός παράγοντας στην διαδικασία της ανθρώπινης λοίμωξης.

Ο T3SS αποτελεί ένα οργανίδιο του κυττάρου, που εμπλέκεται στη διανομή πρωτεϊνών, καλούμενων τελεστών, απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Με αυτό το σύστημα, επιτρέπεται η μετατόπιση πρωτεϊνών – τελεστών από το κυτταρόπλασμά τους στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου – ξενιστή ή στην

κυτταροπλασματική μεμβράνη, χωρίς να απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 4).

Στα περισσότερα στελέχη *V. parahaemolyticus*, βρίσκονται 2 διαφορετικά τμήματα T3SSs. Το T3SS1 εμπλέκεται στην κυτταροτοξικότητα, τη θνησιμότητα των ποντικών και πιθανόν στην επαγωγή της αυτοφαγίας, ενώ το T3SS2, εμπλέκεται στην *in vitro* εντεροτοξικότητα και μπορεί να παίζει ρόλο στην περιβαλλοντική κατάσταση των στελεχών. Επίσης, όλα τα στελέχη που απομονώνονται διαθέτουν το T3SS1, ενώ έχουν περιγραφεί 2 συγγενείς γραμμές του T3SS2, τα οποία παρουσιάζουν συσχέτιση του γονιδίου *tdh* με το T3SS2α και του γονιδίου *trh* με το T3SS2β (Jones et al, 2012, Ham & Orth, 2012).



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της δομής και των μολυσματικών παραγόντων του *V. parahaemolyticus* (Wang et al., 2015).

Όπως και φαίνεται και στην εικόνα 4, το *V. parahaemolyticus* περιέχει δύο συστήματα τύπου T3SS και δύο τύπου T6SS και μπορεί να εκφράσει τις τοξίνες TLH, TRH και TDH όπως προαναφέρθηκε. Το MAM7 είναι το μέσο με το οποίο προσκολλάται αρχικά στα κύτταρα ξενιστές. Το βακτηρίδιο έχει δύο διαφορετικά μαστιγωτά συστήματα, τα οποία το εξυπηρετούν να προσαρμόζεται καλύτερα στα

μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Το μονό μαστίγιο είναι υπεύθυνο για την κολύμβηση του, ενώ τα πλευρικά μαστίγια είναι άμεσα συνδεδεμένα με το μετασχηματισμό των κυττάρων και τη δημιουργία βιομεμβράνης.

Ωστόσο, παρά την σύνδεση της παθογένειας του *V. parahaemolyticus* με την παρουσία των *tdh* και *trh* γονιδίων, είναι δυνατή η ύπαρξη νέων παραγόντων μολυσματικότητας του βακτηριδίου οι οποίοι δεν θα περιέχουν ούτε την TDH ούτε την TRH αιμολυσίνη (Kothary et al., 2000). Οι Lee et al., (2002), κατάφεραν να απομονώσουν από κλινικό δείγμα *V. parahaemolyticus* και να ταυτοποιήσουν ως νέο πιθανό μολυσματικό παράγοντα, μια θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη (πρωτεάση της σερίνης), που δεν φέρει στο γονίδιο της, την TDH ή TRH αιμολυσίνη. Η πρωτεάση είχε σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ωοθηκών των ποντικών. Ακόμη προκλήθηκε λύση ερυθροκυττάρων, αιμορραγία και τελικά θάνατος στους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε ενδοφλεβίως. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο και οι κλινικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους δεν έχουν ακόμη καθοριστεί (Su Yi-Cheng, 2007).

## 2.6. Παθογένεια

Το *V. parahaemolyticus*, μπορεί να προκαλέσει μία από τις κυριότερες μορφές οξείας γαστρεντερίτιδας που μπορεί να προκληθεί από την κατανάλωση ωμών ή ατελώς ψημένων θαλασσινών (Blake et al., 1980; Hiyoshi et al., 2010). Ο απαιτούμενος χρόνος επώασης είναι 4 – 74 ώρες, με συνηθέστερο τις 12 – 46 ώρες. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται μπορεί να είναι κοιλιακοί πόνοι, εκρηκτικά υδαρής διάρροια και μπορούν να διαρκέσουν από 1 έως 7 μέρες με μέση διάρκεια τις 2.5 μέρες. Το ποσοστό των ασθενών που χρήζει θεραπείας είναι της τάξης του 7 % των συνολικών περιπτώσεων και συχνά η ασθένεια είναι αυτοπεριοριζόμενη (Lake et al., 2003).

Αν και το εν λόγω βακτηρίδιο είναι ευρέως γνωστό για την πρόκληση γαστρεντερίτιδας, μπορεί επίσης να προκαλέσει μολύνσεις τραυμάτων και σηψαιμία (Daniels et al., 2000; Mertens et al., 1979; Ryan, 1976). Επίσης, εκτός από μόλυνση των πληγών ο Levin (2006), αναφέρει περιπτώσεις μόλυνσης των άκρων, των αυτιών και των οφθαλμών. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Su & Liu (2007), μετά τον τυφώνα Κατρίνα το 2005 στη Λουιζιάνα και τον Μισισιπή αναφέρθηκαν 2 θάνατοι από τις συνολικά 19 περιπτώσεις ανθρώπων που ασθένησαν από το *V. parahaemolyticus*.

Σηψαιμία μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις που το δονάκιο εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια μεταφέρεται σε όλον τον οργανισμό.

Τα στελέχη *V. parahaemolyticus*, που είναι θετικά στον παράγοντα ΚΡ, φαίνεται να ευθύνονται συνήθως για την εμφάνιση συμπτωμάτων. Επίσης, η Shiga-like τοξίνη είναι πιθανόν να ευθύνεται για ορισμένες περιπτώσεις. Όλος ο πληθυσμός του κόσμου μπορεί δυνητικά να επιμολυνθεί από τον μικροοργανισμό, ενώ σε περίπτωση επιμόλυνσης ανοσοκατεσταλμένου καταναλωτή υπάρχει σοβαρός κίνδυνος σηψαιμίας (CCFH, 2002). Η συστηματική ανοσολογική ενεργοποίηση του οργανισμού, οδηγεί στη φλεγμονή και στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, που με τη σειρά της οδηγεί σε ολιγαϊμικό σοκ, πολυσυστηματική ανεπάρκεια οργάνων και θάνατο. Υποκείμενα ιατρικά προβλήματα, όπως καρκίνος, σακχαρώδης διαβήτης, ηπατοπάθειες και καταστάσεις ανοσοκαταστολής, προδιαθέτουν και στην περίπτωση της σηψαιμίας (Broberg et al., 2011). Οι Tamura et al., (1993) ανέφεραν μια περίπτωση μακροπρόθεσμων επιπτώσεων όπου παρατηρήθηκε αντιδραστική αρθρίτιδα. Η άμεση διάγνωση και η κατάλληλη θεραπεία είναι ικανές να σώσουν τη ζωή του ασθενή. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν αναφέρονται πολυανθεκτικά στελέχη του μικροοργανισμού και ως εκ τούτου είναι ευαίσθητος στα συνηθέστερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται (Ramamurthy & Nair 2014; CCFH, 2002).

## **2.7. Κατανομή και Μέθοδοι Ανίχνευσης του *V. parahaemolyticus***

Είναι γνωστό ότι το *V. parahaemolyticus*, εμφανίζεται στο θαλάσσιο περιβάλλον και σε όλα τα είδη ψαριών, οστρακοειδών καρκινοειδών κ.α. Τα τρόφιμα θαλάσσιας προέλευσης ενδέχεται να φέρουν τον μικροοργανισμό σε ποσότητες  $10^3$  στελέχη ανά g ή και περισσότερα στελέχη σε πιο θερμές περιοχές. Στις ΗΠΑ ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από το 60 % έως και 100 % των δειγμάτων που ελέγχθηκαν από το 2002 έως και το 2003 (Lake et al., 2003). Η παρουσία του *V. parahaemolyticus*, στο θαλάσσιο περιβάλλον επηρεάζεται άμεσα από την θερμοκρασία των νερών και την εποχή. Ωστόσο, το 99 % των απομονώσεων που προέρχονται από το θαλασσινό νερό δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο καθώς είναι ΚΡ-. Σε άλλες μελέτες (Daniels et al., 2000; De paola et al., 1990; και Cook et al., 2002), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε δείγματα μυδιών που συλλέχθηκαν από θαλασσινό νερό υψηλής θερμοκρασίας κατά τους καλοκαιρινούς μήνες οι αριθμοί του *V. parahaemolyticus* ήταν πολύ αυξημένοι σε σχέση με τις άλλες εποχές. Ο άνθρωπος επίσης, μπορεί να λειτουργήσει

ως ασυμπτωματικός φορέας του μικροοργανισμού αποτελώντας έτσι δυνητική περιβαλλοντική πηγή μόλυνσης.

### 2.7.1. Μέθοδοι ανίχνευσης

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του βακτηρίου. Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία αλλά και ο πληθυσμός του μικροοργανισμού σε τρόφιμα αλλά και σε περιβαλλοντικά δείγματα, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα εργαστηριακών εξετάσεων.

Η πλειονότητα των υπό μελέτη δειγμάτων που εξετάζονται για την παρουσία του *V. parahaemolyticus* είναι θαλασσινά, ψάρια, οστρακοειδή κ.α., καθώς είναι ασυνήθιστο να εξετάζονται τακτικά άλλες κατηγορίες τροφίμων για τον εν λόγω μικροοργανισμό. Επειδή λοιπόν, τα *Vibrio spp* μπορούν να αναπτυχθούν πολύ γρήγορα στα θαλασσινά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τα δείγματα θα πρέπει να ψύχονται σε θερμοκρασίες κάτω από 10 °C άμεσα και στη συνέχεια, να αναλύονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα. Ωστόσο, λόγω πιθανής καταστροφής των κυττάρων από την ταχεία ψύξη, τα δείγματα δεν θα πρέπει να ψύχονται μέσω άμεσης επαφής με πάγο.

Από το προς εξέταση δείγμα θα πρέπει να ληφθεί μια ικανοποιητική ποσότητα η οποία στη συνέχεια θα ομοιογενοποιηθεί. Στη συνέχεια οι αραιώσεις του δείγματος θα πρέπει να παρασκευάζονται με έναν διαλύτη που περιέχει άλας, όπως είναι το αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικό (PBS).

#### 2.7.1.1. Κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης

Για την απομόνωση και την ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* έχει αναπτυχθεί μέθοδος σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο ISO 21782 – 1 (2007). Το πρώτο στάδιο στις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης εκμεταλλεύεται την αλόφιλη φύση του μικροοργανισμού και την ικανότητα του να αναπτύσσεται ταχέως σε σχετικά υψηλές τιμές pH. Διάφορα εκλεκτικά μέσα, περιέχουν χλωριούχο νάτριο και το pH τους είναι ρυθμισμένο περίπου στο 8,6 δημιουργώντας έτσι ιδανικό περιβάλλον ανάπτυξης για τον μικροοργανισμό. Τέτοιο μέσο είναι το αλκαλικό αλατούχο πεπτονόχο ύδωρ (ASPW), που χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό. Ο πρώτος εμπλουτισμός γίνεται για 6 ώρες, στους 41.5 °C για νωπά προϊόντα, ή στους 37 °C για κατεψυγμένα ή αλατισμένα προϊόντα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται δεύτερος εμπλουτισμός σε



ASPW στους 41.5 °C, για *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus* ή στους 37 °C, για άλλες είδους, για 18 ώρες (Bisha et al, 2012). Η καλλιέργεια από τον δεύτερο εμπλουτισμό θα προστεθεί στην επιφάνεια καλά στεγνωμένων τρυβλίων που περιέχουν TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose) agar και θα ακολουθήσει επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 24 ώρες. Στο TCBS agar, οι αποικίες του *V. parahaemolyticus* εμφανίζονται με μπλε-πράσινο χρώμα.

Μια από τις πιο κοινές μεθόδους ανίχνευσης του *V. parahaemolyticus* είναι η Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (Most Probable Number – MPN). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει περιγραφεί από τον US FDA (Food and Drug Administration Bacterial Analytical Manual). Η τεχνική που ακολουθείται για την απομόνωση και απαρίθμηση του *V. parahaemolyticus* από διάφορα θαλασσινά, περιγράφεται από συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Στη μέθοδο αυτή, τριπλή σειρά σωλήνων με Alkaline Peptone Water, ενοφθαλμίζεται με αναραίωτο ή/και επόμενες δεκαδικές αραιώσεις του ύποπτου τροφίμου και στη συνέχεια γίνεται σπορά σε εκλεκτικά στερεά υποστρώματα και ταυτοποίηση με κατάλληλη βιοχημική σειρά δοκιμών (Drake et al, 2007).

Και στις δύο παραπάνω μεθόδους, η ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορα κιτ βιοχημικών δοκιμών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των Enterobacteriaceae και άλλων Gram αρνητικών μικροοργανισμών, όπως πχ API 20E – API NE (Biomerieux), RapID NF Plus System (Remel Inc), Crystal Enteric/Non – Fermenter ID Kit (Becton Dickinson) κλπ. Επιπρόσθετα, αυτοματοποιημένα (VITEK 2 – Biomerieux) ή ημι – αυτοματοποιημένα συστήματα (Omnilog – Biolog), έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών (Su & Liu, 2007).

Πλεονέκτημα των κλασικών μεθόδων καλλιέργειας, αποτελεί το γεγονός ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα όμως, μερικές φορές ο διαχωρισμός των ειδών *Vibrio* είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί λόγω της ίδιας μορφολογίας των αποικιών τους.

#### 2.7.1.2. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης

Στην παγκόσμια αγορά υπάρχουν ελάχιστα διαθέσιμα εμπορικά κιτ γρήγορης διάγνωσης *V. parahaemolyticus* στα τρόφιμα. Αυτό ίσως να οφείλεται στην

επικράτηση ότι θεωρείται ως ένας μικροοργανισμός όχι ιδιαίτερα παθογόνος καθώς περιορίζεται στα τρόφιμα θαλάσσιας προέλευσης. Ωστόσο, η ανάπτυξη τεχνικών όπως η PCR που στοχεύουν στην ανίχνευση γονιδίων που παράγουν κυτταροτοξίνη και αιμολυσίνη έλυσε το πρόβλημα των περιορισμένων κιτ γρήγορης διάγνωσης και χρησιμοποιείται και στην περίπτωση του *V. parahaemolyticus*. Η πλειοψηφία των μοριακών μεθόδων βασίζονται στην τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) (Bisha et al, 2012). Η PCR είναι η πλέον 30 πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και τον ακριβή προσδιορισμό (ταυτοποίηση), των συγκεκριμένων γονιδίων που υπάρχουν στο δείγμα. Επιτρέπει τον γρήγορο και επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA που βρίσκονται στο δείγμα σε απειροελάχιστη ποσότητα. Έχει υψηλή ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια, ενώ το επίπεδο ειδικότητας εξαρτάται από την επιλογή του DNA στόχου που θα προσδεθεί με το ζεύγος εκκινητών. Ο πολλαπλασιασμός αλληλουχίας DNA περιοχών επιτυγχάνεται με το ένζυμο πολυμεράση και την επιλογή κατάλληλων εκκινητών (πρόσδεση με το DNA στόχο).

Για την ανίχνευση παθογόνων στελεχών *V. parahaemolyticus* η PCR στοχεύει στα *tdh* και *trh* γονίδια που κωδικοποιούν της TDH και TRH αιμολυσίνες αντίστοιχα. Στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Fabbro et al, (2010), χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση της παρουσίας *toxR* (Kim et al., 1999), *tlh*, *tdh* και *trh* γονιδίων (Bej et al., 1999) σε στελέχη *V. parahaemolyticus* που απομονώθηκαν με βιοχημικές μεθόδους και στη συνέχεια ανακαλλιεργήθηκαν για την ενίσχυση και ανάλυση της αλληλουχίας 16S rRNA. Όπως αναφέρεται από τους Fabbro et al., (2010), τα αποτελέσματα από τις βιοχημικές και κλασικές μεθόδους ήταν αβέβαια σχετικά με την ανίχνευση γονιδίων *toxR* και *tlh*. Τέλος, μόνο μετά τη χρήση μοριακών μεθόδων αναγνωρίστηκαν στελέχη *V. parahaemolyticus* θετικά ως προς την ύπαρξη *trh* γονιδίων.

Έτσι λοιπόν αναγνωρίζεται η δυσκολία αναγνώρισης παθογόνων μικροοργανισμών του περιβάλλοντος με τη χρήση κλασσικών μεθόδων και τονίζεται η αναγκαιότητα και η αποτελεσματικότητα των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης. Μειονέκτημα, ωστόσο, των μοριακών τεχνικών αποτελεί το γεγονός ότι αρχικά σχεδιάστηκαν μόνο για την ποιοτική ανίχνευση των μικροοργανισμών. Ωστόσο, ο συνδυασμός τους με άλλες μεθόδους, όπως πχ την μέθοδο του MPN, μπορεί να οδηγήσει και σε προσδιορισμό του πληθυσμού (Su & Liu, 2007).

### 2.7.1.3. Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης

Οι ανοσολογικές τεχνικές που στοχεύουν στην ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* ή των τοξινών του, βάση των αντιδράσεων με αντισώματα, μπορεί να θεωρούνται πολύ ειδικές τεχνικές ανίχνευσης όμως πλήθος αυτών έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *V. parahaemolyticus*. Η χρήση της μεθόδου ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) από τους Honda et al., (1985) πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση KP+ στελεχών *V. parahaemolyticus* καθώς και για την άμεση ανίχνευση της TDH αιμολυσίνης σε ανθρώπινα δείγματα. Τα δείγματα με τη χρήση της τεχνικής της άμεσης ELISA εξετάστηκαν λαμβάνοντας 0,15 ml από το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας σε μια μικροπλάκα από πολυστυρένιο χωρίς όμως να καταφέρουν να ανιχνεύσουν την TDH. Από την άλλη, η δοκιμή «σάντουιτς» ELISA έχοντας ως στόχο τη μέτρηση δισθενών και πολυσθενών αντιγόνων, έδειξε αποτελεσματική ανίχνευση της TDH σε ακατέργαστα μίγματα, και επιπλέον έδωσε θετικά αποτελέσματα δειγμάτων στα οποία είχε εφαρμοστεί η απομόνωση του *V. parahaemolyticus* με την παραδοσιακή μέθοδο στο Wagatsuma άγαρ. Πρόσφατα (2012), οι Sakata et al., αναφέρουν μια άλλη ταχεία τεχνική ELISA, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα κατά της TLH, για ανίχνευση του μικροοργανισμού σε νωπά αλιεύματα, καθώς επίσης, και η ανάπτυξη ανοσοενζυμικής μεθόδου με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της πολικής πρωτεΐνης του βακτηρίου, για την ανίχνευσή του σε περιβαλλοντικά δείγματα (Ramamurthy & Nair, 2014).

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Nishibuchi et al., (1985), συμπέραναν ότι η χρήση ανοσολογικής μεθόδου είχε καλύτερα αποτελέσματα από τις μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση της θερμοστατικής αιμολυσίνης. Όλα τα KP+ στελέχη παρήγαγαν αιμολυσίνη η οποία ήταν άμεσα ανιχνεύσιμη. Τα KP – στελέχη, ωστόσο ήταν αρνητικά στις ανοσολογικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν. Σαν συμπέρασμα από τους Rosec et al., (2012), εκτιμάται ότι το ιδανικό στην ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμό του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus*, θα ήταν ο συνδυασμός διαφόρων μεθόδων και προτείνεται η χρήση PCR τεχνικών για διερεύνηση θετικών δειγμάτων αλλά και επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών.

## 2.8. Επιδημιολογικά δεδομένα και σημασία για τη δημόσια υγεία

Το *V. parahaemolyticus* είναι ένα παθογόνο και έχει αναγνωριστεί ως ο κυριότερος παράγοντας πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων από αλιεύματα στις ΗΠΑ αλλά και παγκοσμίως (Bisha, 2012) και μπορεί να προκαλέσει μία από τις κυριότερες μορφές οξείας γαστρεντερίτιδας που μπορεί να προκληθεί από την κατανάλωση ωμών ή ατελώς ψημένων θαλασσινών (Blake et al., 1980; Hiyoshi et al., 2010). Η παγκοσμιοποίηση των στελεχών του *V. parahaemolyticus*, είναι αδιαμφισβήτητο γεγονός, καθώς από την πρώτη εμφάνιση του στη Ιαπωνία το 1950 και την αναγνώρισή του από τους Fujino et al., (1953), πλέον ανιχνεύεται, απομονώνεται και ταυτοποιείται από θαλασσινά τρόφιμα σε ολόκληρο τον κόσμο. Στη συνέχεια θα γίνει μια σύντομη περιγραφή, πρόσφατων αναφορών ασθένειας από το *V. parahaemolyticus*, σε όλο τον κόσμο.

Συγκεκριμένα, οι Chiou et al (2000), ανέφεραν ότι ποσοστό 63,76 % (542/850) των επιδημιών στην Ταϊβάν οφείλονταν στο *V. parahaemolyticus*, ενώ στις ΗΠΑ πρόσφατα στοιχεία (CDC, 2009) αναφέρουν ότι οι αντίστοιχες μολύνσεις έχουν αυξηθεί από το 2000 σε αντίθεση με το σχετικό κίνδυνο από άλλα τροφιμογενή που έχουν μειωθεί (Solomakos et al, 2012). Στη Νέα Ζηλανδία, όπως αναφέρουν οι Thornton et al. (2002), το ποσοστό των λοιμώξεων που οφείλονται στο *V. parahaemolyticus*, είναι 1,6/100.000 κατοίκους αλλά η εκτιμώμενη είναι πολύ μεγαλύτερη (15,3/100.000 κατοίκους) και είναι συγκρίσιμη με τα ποσοστά που έχουν καταγραφεί στη Φλόριντα για άτομα που καταναλώνουν ωμά στρείδια.

Αντίθετα, στην Ευρώπη τα ποσοστά τροφικών δηλητηριάσεων από *V. parahaemolyticus* είναι πολύ χαμηλότερα. Το 2012 μόλις 1 σοβαρή περίπτωση τροφοδηλητηρίασης αναφέρθηκε στην Ισπανία, με 51 κρούσματα, χωρίς καμία νοσηλεία σε νοσοκομείο ή θάνατο (EFSA, 2012). Τέλος, από το 2000 μέχρι σήμερα, μόλις 10 περιπτώσεις σχετικά με την εισαγωγή ή/και διακίνηση τροφίμων, αναφέρθηκαν από το Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης Τροφίμων Ζωοτροφών (RASFF). Όμως, τα τελευταία χρόνια, η απομόνωση πανδημικών στελεχών από τρόφιμα, αλλά και κρούσματα στον Ευρωπαϊκό χάρτη, πιθανότατα λόγω της μεταβολής των κλιματικών συνθηκών στον πλανήτη μας, εγείρει την ανησυχία του επιστημονικού κόσμου. Επιπρόσθετη ανησυχία, πρέπει να αποτελέσει το γεγονός ότι

ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός για τα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων (ΕΚ 2073/2005), δεν περιλαμβάνει την περίπτωση ανίχνευσης του υπόψη παθογόνου μικροοργανισμού στα ψάρια και τα συναφή προϊόντα.

Η συνεχώς αυξανόμενη δημοτικότητα της κατανάλωσης ωμών προϊόντων ψαριών, όπως σούσι, μπορεί να επηρεάσει την συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων από *V. parahaemolyticus*. Γενικά μέτρα υγιεινής που σχετίζονται με τη συλλογή και την επεξεργασία θαλασσινών, αλλά και οι χαμηλές θερμοκρασίες των θαλασσών, μπορούν να αποτρέψουν την αύξηση του *V. parahaemolyticus*. Τα μέτρα αυτά θα πρέπει να αποτελούν μέρος ενός ολοκληρωμένου σχεδίου διαχείρισης HACCP μέσω της τήρησης των Ορθών Πρακτικών Υγιεινής σε όλο το μήκος της αλυσίδας συγχομιδής, από την πρωτογενή παραγωγή έως και την τελική παράδοση στον καταναλωτή. Παράλληλα όμως την τήρηση των Ορθών Πρακτικών Υγιεινής και τη διαχείριση των κινδύνων η αποτελεσματικότητά τους θα είναι ασαφής χωρίς τη συνεχή έρευνα (Thornton et al., 2002).

Πριν από το 1994 η συχνότητα των λοιμώξεων από το *V. parahaemolyticus* στην Ιαπωνία ήταν ελάχιστες, ωστόσο από το 1996 έως το 1998 τα περιστατικά λοιμώξεων από τον μικροοργανισμό ξεπέρασαν τα αντίστοιχα της σαλμονέλας σύμφωνα με τα στοιχεία του IDSC (1999). Από τις 24.373 υποθέσεις που ξέσπασαν 1710 άτομα ασθένησαν. Ο αυξημένος αριθμός περιστατικών ωστόσο αποδόθηκε στην εμφάνιση του στελέχους O3:K6. Το ίδιο στέλεχος αποτέλεσε το κύριο αίτιο απότομης αύξησης των παραχωρηθέντων λοιμώξεων από το *V. parahaemolyticus* στην Καλκούτα της Ινδίας κατά το έτος 1996 (Okuda et al., 1997a). Στην επαρχία Khanh Hoa του Βιετνάμ από το 1997 έως το 1999 ανιχνεύθηκαν 48 περιπτώσεις λοίμωξης από *V. parahaemolyticus*, με συμπτώματα όπως: εμετό, υδαρή διάρροια και υδαρή διάρροια με αίμα χωρίς ωστόσο να υπάρξουν θύματα (Tuyet et al., 2002). Σε μια πόλη στο βόρειο τμήμα της Χιλής για πρώτη φορά στη χώρα, από το Νοέμβριο του 1997 έως και τον Απρίλιο του 1998, αναφέρθηκαν αρκετές περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας οι οποίες συνδέθηκαν με την κατανάλωση οστρακοειδών και συνεπώς λοίμωξης από το *V. parahaemolyticus* (Cordova et al., 2002). Η ύπαρξη του μικροοργανισμού στα οστρακοειδή εκείνη την περίοδο συνδέθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας των θαλασσών λόγω του δαινομένου «El Niño». Στη Γαλικία της βορειοδυτικής Ισπανίας τον Σεπτέμβριο του 1999, καταγράφηκαν 64 περιπτώσεις λοιμώξεων με κυριότερο κοινό σύμπτωμα τη διάρροια και λιγότερο συχνά κοιλιακούς πόνους, εμετό, ναυτία

και πονοκεφάλους (Lozano-Leon et al., 2003). Από αυτούς 9 άτομα χρειάστηκε να εισαχθούν στο νοσοκομείο και από τα κόπρανα όλων των ασθενών απομονώθηκε το *V. parahaemolyticus*. Επίσης, η πρόσφατη έκθεση (2014) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority – EFSA), που αφορά επιδημιολογικά δεδομένα τροφιμογενών επιδημιών του 2012, αναφέρει μία σοβαρή περίπτωση στην Ισπανία, με 51 κρούσματα, χωρίς νοσηλεία σε νοσοκομεία ή θανάτους. Στην Ταιβάν το *V. parahaemolyticus*, αποτελεί την κυριότερη αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων με ποσοστό 64 % και 542 περιπτώσεις από τις συνολικά 850 περιπτώσεις τροφιμογενών κρουσμάτων (Chiou et al., 2000).

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Παρασκευή δειγμάτων

Φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου (*Gadus morhua*) παραχωρήθηκαν από την εταιρεία Seaworld ΑΕ (Καρδίτσα). Η διαδικασία παραγωγής του υγράλατου μπακαλιάρου έχει ως εξής:

#### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

Προϊόν αλίευσης: Μπακαλιάροι (*Gadus morhua*) άνευ κεφαλής block σε γ/κ 27 kg. Η επεξεργασία και κατάψυξη των ψαριών γίνεται επί πλοίου, που φέρει την κατάλληλη γι' αυτό άδεια, αμέσως μετά την αλίευσή του με την τεχνική QF σε θερμοκρασίες  $\leq -40^{\circ}\text{C}$ .

#### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η Α' ύλη αποψύχεται, αφαιρείται ο σπόνδυλος και τα πλευρά, ακολουθεί καθαρισμός με ξύστρα της κοιλιακής κοιλότητας. Τοποθέτηση σε δεξαμενή κατά στρώσεις με αλάτι. Αφαίρεση νερού και του άλατος από την δεξαμενή και τοποθέτηση του προϊόντος σε παλέτες με στρώσεις άλατος και ωρίμανση. Κατά περίπτωση κοπή σε μερίδες. Η διαδικασία αναλυτικά φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής.

**Διάγραμμα ροής υγράλατου μπακαλιάρου**

1. ΠΑΡΑΛΑΒΗ Α' ΥΛΗΣ OPRPS
2. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΒΟΗΘΗΤΙΚΩΝ ΥΛΩΝ OPRPS
3. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΛΙΚΩΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ
4. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ Α' ΥΛΗΣ  $\theta \leq -19^{\circ}\text{C}$  CCP 1
5. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΟΗΘΗΤΙΚΩΝ ΥΛΩΝ
6. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ
7. ΑΠΟΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ  $\theta < 20^{\circ}\text{C}$
8. ΑΠΟΨΥΞΗ OPRPS
9. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΣΠΟΝΔΥΛΩΝ & ΠΛΕΥΡΩΝ OPRPS
10. ΚΑΘΑΡΙΣΜΑ ΜΕ ΞΥΣΤΡΟ ΤΗΣ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ OPRPS



11. ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΣΕ ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΚΑΤΑ ΣΤΡΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΛΑΤΙ & ΠΑΡΑΜΟΝΗ ΓΙΑ 15 μέρες  $\theta < 2^{\circ}\text{C}$
12. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΕΞΑΜΕΝΗ (ΑΝΑΠΟΔΟΓΥΡΙΣΜΑ ΔΕΞΑΜΕΝΗΣ)
13. ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ ΣΕ ΠΑΛΕΤΑ & ΩΡΙΜΑΝΣΗ  $\theta < 2^{\circ}\text{C}$ , (Για 1, 2, 3 εβδομάδες)
15. Α' ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ
17. ΖΥΓΙΣΗ - ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ  $\theta < 20^{\circ}\text{C}$
18. Β' ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ
19. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ  $\theta < 2^{\circ}\text{C}$
20. ΔΙΑΝΟΜΗ  $\theta < 2^{\circ}\text{C}$

Τα φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Π.Θ.

Κατόπιν, κόπηκαν υπό άσηπτες συνθήκες σε δείγματα βάρους  $50 \pm 5$  g το καθένα, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Oliveira et al. (2014).

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς του *V. parahaemolyticus* κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος στα δείγματα ενοφθαλμίστηκε το παθογόνο σε πληθυσμούς περίπου 4 log cfu/g σάρκας υγρού μπουκάλιου, σύμφωνα με τους Ekhtiarzadeh et al. (2012).

Κάθε ένα δείγμα τοποθετήθηκε σε γυάλινη φιάλη 600 ml με αναλογία μάζας φιλέτου / νερού 1:9 (Barat et al., 2004; Andres et al., 2005; Oliveira et al., 2015). Κάθε 12 ώρες το απεσταγμένο νερό των δοχείων αδειάζονταν και αναπληρώνονταν με νέο νερό.

Τέλος, όλα τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες που συντηρήθηκαν αντίστοιχα σε 3 θερμοκρασίες  $5 \pm 1^\circ$  C,  $10 \pm 1^\circ$  C και  $20 \pm 1^\circ$  C για 72 ώρες, προσομοιάζοντας ορθή και μη ορθή θερμοκρασία ξαρμυρίσματος.



**Εικόνα 5:** Ελαιώρημα του παθογόνου μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης.

### 3.2. Φυσικοχημικός έλεγχος

Από κάθε μια από τις 3 ομάδες δειγμάτων λαμβάνονταν δείγμα και πραγματοποιούνταν εξέταση την ώρα 0 και στη συνέχεια κάθε 12 ώρες και συγκεκριμένα τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60, και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αλάτι, του συντελεστή ενεργού νερού ( $a_w$ ) και του pH. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε αλάτι γινόταν σύμφωνα με τον AOAC 1995. Το pH των δειγμάτων προσδιοριζόταν με πεχάμετρο (pH meter WTW, type 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Germany).

### 3.3. Μικροβιολογική ανάλυση

Από κάθε μια από τις 3 ομάδες δειγμάτων λαμβάνονταν 2 δείγματα και πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές εξετάσεις την ώρα 0 και στη συνέχεια κάθε 12 ώρες και συγκεκριμένα τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60, και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των *Enterobacteriaceae* και του *V. parahaemolyticus*. Την ημέρα 0 πραγματοποιήθηκε επιπλέον μικροβιολογικός έλεγχος των φιλέτων υγράλατου μπακαλιάρου, ώστε να καθοριστεί η κατάσταση της πρώτης ύλης.

Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες ποσότητα 25 g σάρκας υγράλατου μπακαλιάρου από κάθε ένα από τα 2 δείγματα σε δοχείο στις διάφορες θερμοκρασίες, τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher (Seward, Medical, UK) και αραιώνονταν με 225 ml αραιωτικού Maximum Recovery Diluent (MRD – LAB M). Τα δείγματα ομογενοποιούνταν σε συσκευή stomacher (Seward, Medical, UK), για 2 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, μεταφέροντας 1 ml από την αρχική αραιώση σε 9 ml MRD. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω μικροβιολογικών παραμέτρων επιλέχθηκαν οι κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις, γινόταν δε ενοφθαλμισμός σε διπλά τρυβλία.

## **OMX**

Ο προσδιορισμός της OMX, εκτιμήθηκε με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA, LAB M), με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO 4833 : 2013.

Τα τρυβλία επωάζονταν στους  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  για  $72 \pm 3$  ώρες για την OMX και στους  $7^\circ \text{C}$  για 7 ημέρες για τα ψυχρόφιλα βακτήρια. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες που αναπτύσσονταν στο τρυβλίο, ανεξαρτήτως μεγέθους, χρώματος ή σχήματος.

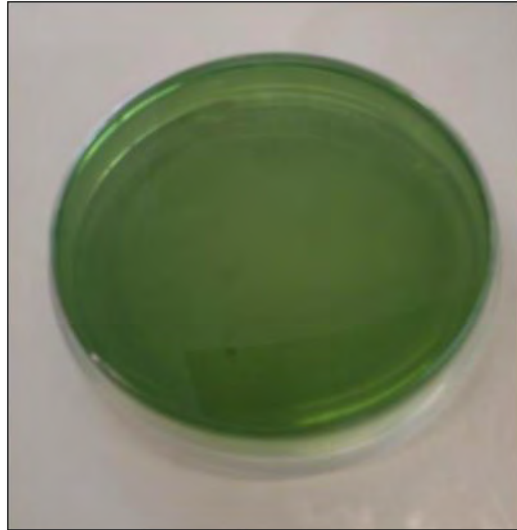
## **Enterobacteriaceae**

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae, εκτιμήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO 21528 – 2 : 2004. Ποσότητα 1 ml από την αρχική αραιώση αλλά και από επόμενες δεκαδικές αραιώσεις, μεταφέρθηκε με στείρο τρόπο σε κενά τρυβλία και ακολούθησε προσθήκη 15 – 20 ml θρεπτικού υλικού Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA – LAB M). Μετά την ομοιόμορφη διασπορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο και τη στερεοποίηση του υλικού, έγινε επιστιβάδευση ποσότητας 10 ml περίπου από το παραπάνω υλικό, για δημιουργία μικροαερόφιλων συνθηκών. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν στους  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  για 24 – 48 ώρες. Ως *Enterobacteriaceae* καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες ροζ – κόκκινου ή μωβ χρώματος με ή χωρίς άλω, ανεξαρτήτου μεγέθους.

## ***V. parahaemolyticus***

Τέλος, ο προσδιορισμός του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus*, πραγματοποιήθηκε στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS agar – LAB M), με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως και  $10^{-4}$ , μεταφέροντας 1 ml από την αρχική αραιώση σε 9 ml MRD. Από την αρχική και τις επόμενες δεκαδικές αραιώσεις, ποσότητα 0,1 ml θα προστέθηκε στην επιφάνεια καλά στεγνωμένων τρυβλίων που περιέχουν TCBS agar. Με στείρα κεκαμένη ράβδο, έγινε επιφανειακή εξάπλωση του ενοφθαλμίσματος στο υλικό. Ύστερα από επώαση 24 – 48 ωρών στους  $37^\circ \text{C}$ , καταμετρούνταν όλες οι σουκρόζη αρνητικές, πράσινου – κυανού χρώματος, λείες αποικίες.

Η παρασκευή όλων των θρεπτικών υλικών πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή τους και συντηρήθηκαν σε ψυγείο στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Εικόνα 6:** Τρυβλίο εκλεκτικού θρεπτικού υλικού Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS agar – LAB M)

#### **3.4. Στατιστική επεξεργασία**

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το τεστ του Bartlett. Στις περιπτώσεις που υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις των επιμέρους χειρισμών σε κάθε χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών του Duncan για τη διαπίστωση σημαντικών διαφορών μεταξύ τους.

Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Φυσικοχημικός έλεγχος

Ο φυσικοχημικός έλεγχος των αρχικών δειγμάτων (0 h) έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε αλάτι ήταν 19,5 %, το  $a_w$  0,75 και το pH 6,44. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από άλλους ερευνητές, όπου η περιεκτικότητα σε NaCl του υγράλατου μπακαλιάρου βρέθηκε να κυμαίνεται από 16 % έως 20 % και ο συντελεστής ενεργού νερού περίπου 0,73 έως 0,75 (Rodrigues et al. 2003, Oliveira et al. 2012).

Στο τέλος της διαδικασίας ξαμυρίσματος (72 h) και στις 3 θερμοκρασίες (5 °C, 10 °C και 20 °C) η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 1,9 %, το  $a_w$  0,975 και το pH 6,88. Η ενυδάτωση του υγράλατου μπακαλιάρου και η μείωση της περιεκτικότητας σε NaCl κατά τη διαδικασία του ξαμυρίσματος ήταν ταχύτερη στους 20 °C σε σχέση με τους 10 °C και με τους 5 °C. Έτσι, στις 24 ώρες η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl για τους 5 °C, 10 °C και 20 °C ήταν 6,4 %, 4,2 % και 2,7 %, αντίστοιχα. Ομοίως, οι Oliveira et al. (2012) σε παρόμοια μελέτη βρήκαν ότι μετά από διαδικασία ξαμυρίσματος υγράλατου μπακαλιάρου για 72 ώρες σε θερμοκρασίες 5 °C, 10 °C και 15 °C, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν περίπου 2 % και το ποσοστό υγρασίας από 82 % έως 82,6 %, ενώ ο ρυθμός ενυδάτωσης του προϊόντος και απομάκρυνσης του NaCl αυξανόταν ανάλογα με τη την αύξηση της θερμοκρασίας.

### 4.2. Μικροβιολογική ανάλυση

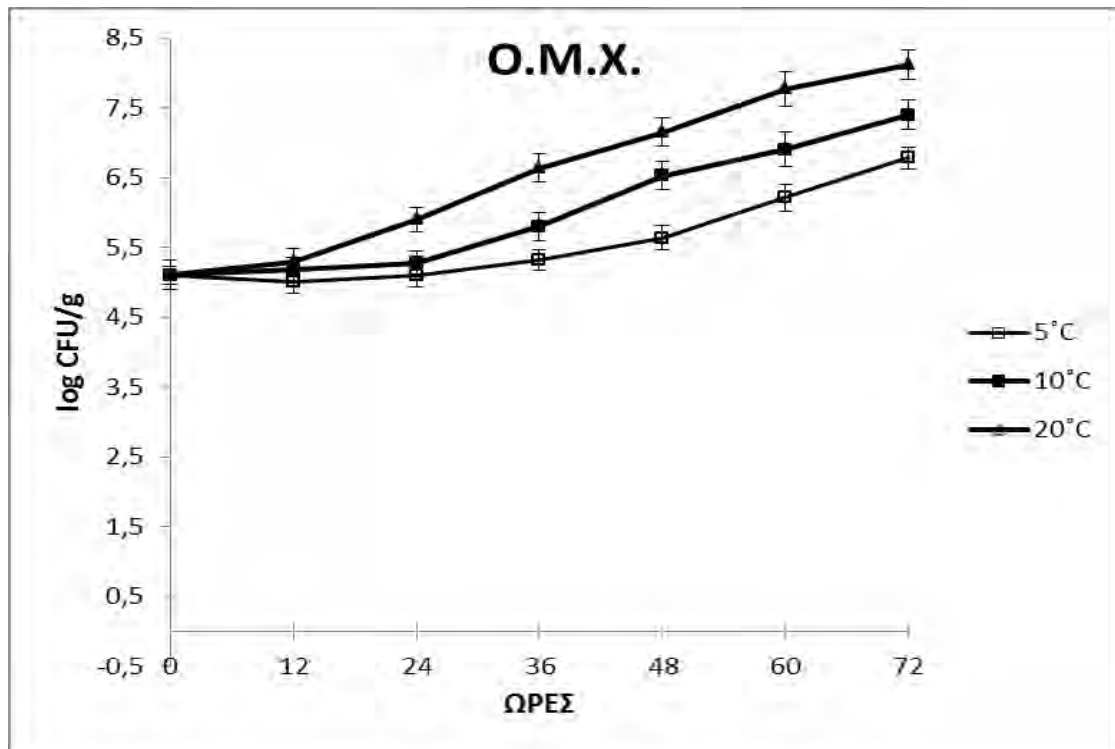
Οι πληθυσμοί για την OMX, των εντεροβακτηρίων και του *V. parahaemolyticus*, στις 3 διαφορετικές ομάδες δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου στους  $5 \pm 1$  °C,  $10 \pm 1$  °C και  $20 \pm 1$  °C παρουσιάζονται στα σχήματα 1 έως 3, αντίστοιχα.

O.M.X.

Οι αρχικοί πληθυσμοί για την OMX ήταν 5,1 log cfu/g και στη συνέχεια εμφάνισαν ανάπτυξη στους 5 °C φτάνοντας στους 6,7 log cfu/g στις 72 ώρες (Σχήμα 1). Ομοίως, στους 10 °C οι πληθυσμοί της O.M.X. αναπτύχθηκαν μετά τις 24 ώρες και έφτασαν

τους 7,4 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για την O.M.X. στα δείγματα που έγινε το ξαρμύρισμα στους 10 °C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ( $P<0.05$ ) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5 °C. Αντίστοιχα, για τα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 20 °C οι πληθυσμοί της O.M.X. παρουσίασαν αύξηση και έφτασαν τους 8,1 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ( $P<0.05$ ) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 °C. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 10 °C και στους 20 °C έδειξε ότι οι πληθυσμοί της O.M.X. ήταν μεγαλύτεροι από 7 log cfu/g που θεωρείται το ανώτερο όριο αποδοχής των αλιευμάτων την 72<sup>η</sup> και από την 60<sup>η</sup> ώρα, αντίστοιχα (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF 1986).

Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα εργασία αναφέρονται από τους Oliveira et al. (2014), οι οποίοι βρήκαν ότι σε δείγματα υγρού μπακαλιάρου που ξαρμυρίστηκε σε 3 θερμοκρασίες 5 °C, 10 °C και 15 °C για 72 ώρες οι πληθυσμοί της O.M.X. στους 10 °C και 15 °C, ξεκίνησαν να αναπτύσσονται την 36<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ώρα, αντίστοιχα. Αυτό αποδόθηκε στον αυξημένο ρυθμό ενυδάτωσης και μείωσης της περιεκτικότητας σε αλάτι σε σχέση με τους 5 °C. Πράγματι και στην παρούσα εργασία στις 36 ώρες στους 10 °C και στις 24 ώρες στους 20 °C, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 3,5 % και 2,6 %, αντίστοιχα. Ανάλογη ήταν η αύξηση του συντελεστή ενεργού νερού ο οποίος στις 36 ώρες στους 10 °C και στις 24 ώρες στους 20 °C είχε φτάσει περίπου το 0,97 που σε σχέση με το μειωμένο αλάτι δεν είναι ιδιαίτερα αποτρεπτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



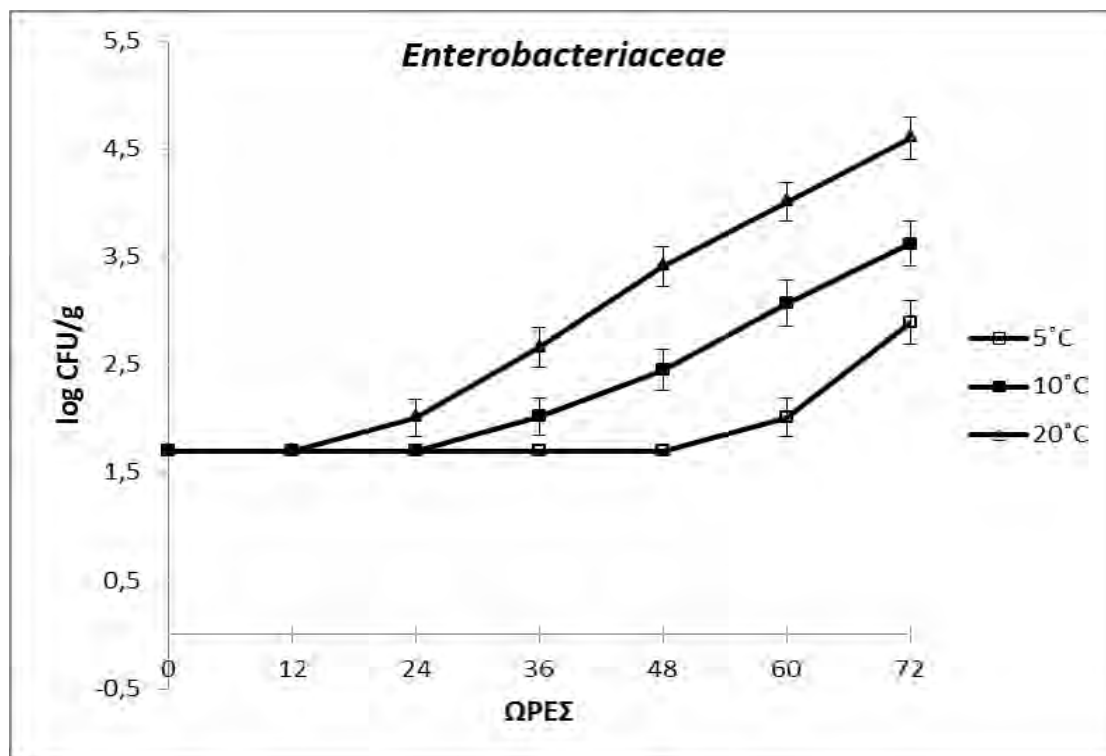
**Διάγραμμα 2:** Μεταβολή των πληθυσμών της O.M.X. σε υγράλατο μπακαλιάρο κατά τη διαδικασία ξαμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.

### Enterobacteriaceae

Οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων στα δείγματα στους 5 °C βρίσκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 2,89 log cfu/g την 72<sup>η</sup> ώρα (Σχήμα 2). Αντίστοιχα, στους 10 °C οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων παρέμειναν <2 log cfu/g μέχρι και τις 24 ώρες και στη συνέχεια παρουσίασαν αύξηση φτάνοντας τους 3,62 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για τα Enterobacteriaceae στα δείγματα που έγινε το ξαμύρισμα στους 10 °C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ( $P < 0.05$ ) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5 °C. Τέλος, για τα δείγματα που ξαμυρίστηκαν στους 20 °C οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων παρουσίασαν αύξηση από τις 24 ώρες και έφτασαν τους 4,6 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ( $P < 0.05$ ) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 °C.



Σε συμφωνία με την παρούσα εργασία, οι Oliveira et al. (2014) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων σε δείγματα υγρού μπακαλιάρου, που ξαυμυρίστηκε στους 5 °C, 10 °C και 15 °C για 72 ώρες, παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι την 36<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ώρα στους 10 °C και 15 °C, αντίστοιχα. Αυτό αποδόθηκε στη μειωμένη περιεκτικότητα σε αλάτι και την αυξημένη θερμοκρασία εκείνη τη χρονική στιγμή, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία.



**Διάγραμμα 3:** Μεταβολή των πληθυσμών των Enterobacteriaceae σε υγρό μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαυμυρίσματος στους 5 °C (○), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (▲) για 72 ώρες.

#### *Vibrio parahaemolyticus*

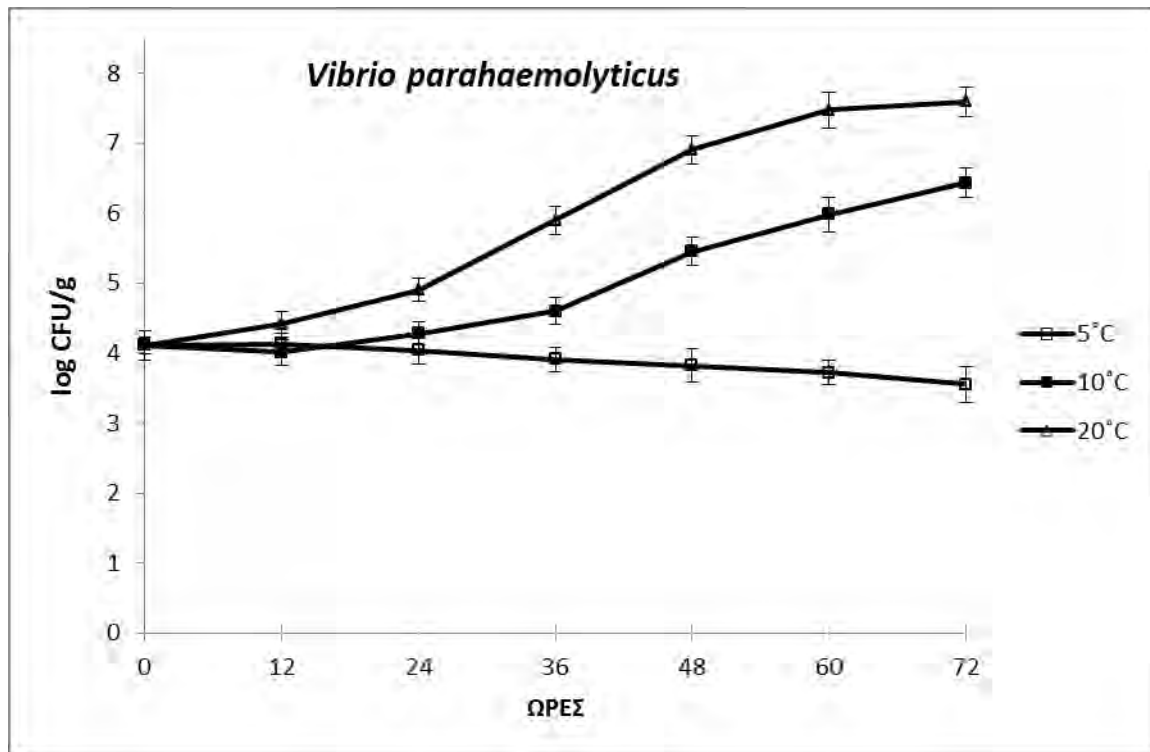
Οι αρχικοί πληθυσμοί για το *V. parahaemolyticus* ήταν 4,1 log cfu/g και στη συνέχεια παρουσίασαν μικρή μείωση στους 5 °C φτάνοντας στους 3,6 log cfu/g στις 72 ώρες (Σχήμα 3). Αυτή η παρατηρούμενη μείωση, οφείλεται πιθανότατα στο ότι το παθογόνο είναι ευαίσθητο στη δράση της χαμηλής θερμοκρασίας (Yano et al, 2006).

Παρομοίως, μικρή μείωση πληθυσμών του παραπάνω παθογόνου, έχει αναφερθεί από τους Xi et al (2012), όταν ενοφθαλμίστηκε σε στρείδια. Η μείωση που διαπίστωσαν οι ερευνητές ήταν 0,95 log MPN/g, μετά από 8 ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία 5 °C σε απιονισμένο νερό.

Στους 10 °C οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού αναπτύχθηκαν μετά τις 24 ώρες και έφτασαν τους 6,43 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για το *V. parahaemolyticus* στα δείγματα που έγινε το ξαρμύρισμα στους 10 °C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ( $P<0.05$ ) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5 °C.

Τέλος, για τα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 20 °C οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* παρουσίασαν αύξηση από τις 24 ώρες και έφτασαν τους 7,5 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ( $P<0.05$ ) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 °C.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη της συμπεριφοράς του *V. parahaemolyticus* κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος του υγρού μπακαλιάρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ξαρμύρισμα του τροφίμου σε θερμοκρασία 20 °C είχε ως αποτέλεσμα από τις 36 ώρες και μετά οι πληθυσμοί του παθογόνου να είναι ιδιαίτερα υψηλοί αποτελώντας κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Αντίθετα, στους 5 °C το ξαρμύρισμα του υγρού μπακαλιάρου αποτελεί μια διαδικασία που ολοκληρώνεται ιδανικά περίπου στις 48 ώρες (NaCl περίπου 3,5 %,  $a_w$  0,97 και υγρασία 82 %) με αυξημένη ασφάλεια για τον καταναλωτή.



**Διάγραμμα 4:** Μεταβολή των πληθυσμών του *V. parahaemolyticus* σε υγράλατο μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαμυρίσματος στους 5 °C (-□-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-Δ-) για 72 ώρες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο υγράλατος μπακαλιάρος είναι ένα ιδιαίτερα δημοφιλές τρόφιμο ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες (Oliveira et al. 2012). Το προϊόν είναι ιδιαίτερα σταθερό λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε αλάτι (19%) και του χαμηλού συντελεστή  $a_w$  (περίπου 0,75). Η διαδικασία του ξαρμυρίσματος είναι απαραίτητο στάδιο στην προετοιμασία του, αποτελεί όμως μια ιδιαίτερα χρονοβόρο διαδικασία που μπορεί να υπερβεί και τις 48 ώρες.

Δυστυχώς, η μη διάθεση, σε επίπεδο λιανικής πώλησης, στον καταναλωτή σαφών και ορθών οδηγιών για τη σωστή διαδικασία ξαρμυρίσματος σε συνδυασμό με τη διάχυτη πεποίθηση των καταναλωτών ότι ο υγράλατος μπακαλιάρος λόγω της πολύ υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι, αποτελεί ένα απόλυτα ασφαλές προϊόν, έχει ως αποτέλεσμα η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

Επίσης, το *V. parahaemolyticus* αποτελεί έναν παθογόνο μικροοργανισμό που μπορεί να επιβιώσει σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτος και προτείνεται να εξετάζεται σε επίπεδο πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος στα πλαίσια της ασφάλειας του συγκεκριμένου τροφίμου (Köse 2010). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το παθογόνο μπορεί να φτάσει σε υψηλούς πληθυσμούς, επικίνδυνους για τη δημόσια υγεία, όταν ο υγράλατος μπακαλιάρος ξαρμυρίζεται σε θερμοκρασίες 10 °C και 20 °C, αντίθετα με τους 5 °C. Συνεπώς, πρέπει ο υγράλατος μπακαλιάρος να εξετάζεται σε επίπεδο πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος για την παρουσία και τον πληθυσμό του *V. parahaemolyticus*. Τέλος, προτείνεται ότι σε επίπεδο λιανικής πώλησης πρέπει να γίνεται ενημέρωση του καταναλωτή για την ορθή διαδικασία ξαρμυρίσματος σε θερμοκρασία ψύξης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Aas GH, Skjerdal OT, Stoknes I, Bjørkevoll I. 2010. *Effects of packaging method on salt-cured cod yield and quality during storage*. **J Aquat Food Prod Technol** 19:149–61.
2. Abubakar I. 2010. *Tuberculosis and air travel: a systematic review and analysis of policy*. **Lancet Infect Dis**. 10(3):176-83.
3. AFDO, 1991. *Cured, Salted, and Smoked Fish Establishments Good Manufacturing Practices*. Association of Food and Drug Officials. York, PA.
4. Akse L, Gundersen B, Lauritzsen K, Ofstad R, Solberg T. 1993. *Salt fish. Report No. 1*. Tromsø, Norway: Norwegian Inst. of Fisheries and Aquaculture (Fiskeriforskning). p 1–61.
5. Andres A, Rodriguez-Barona S, Barat JM, Fito P. 2002. *Note: mass transfer kinetics during cod salting operation*. **Food Sci Technol Intl** 8:309–14.
6. Andres A, Rodriguez-Barona S, Barat JM and Fito P. 2005. *Salted cod manufacturing: Influence of salting procedure on process yield and product characteristics*. **J Food Eng**. 69:467–471.
7. Barat JM, Rodríguez-Barona S, Andres A, Fito P. 2003. *Cod salting manufacturing analysis*. **Food Res Intl**. 36:447–53.
8. Barat JM, Rodríguez-Barona S, Castelló M, Andrés A and Fito P. 2004. *Cod desalting process as affected by water management*. **J Food Eng**. 61:353–357.
9. Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Castello, M., Andrés, A., & Fito, P. 2004a. *Cod desalting process as affected by water management*. **Journal of Food Engineering**. 61(3), 353–357.
10. Barat, J. M., Gallart-Jornet, L., Andrés, A., Akse, L., Carlehög, M., & Skjerdal, O. T. 2006. *Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages*. **Journal of Food Engineering**. 73(1), 9-19.
11. Beatty SA, Fougère H. 1957. *The processing of dried salted fish*. *Bulletin No. 112*. Fisheries Research Board of Canada.
12. Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., and Kaysner, C. A. 1999. **Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio***

- parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36, 215–225.
13. **Bekkevold, D; Hansen, M. M; Loeschcke, V.** 2002. *Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (Gadus morhua, L.). Molecular Ecology.* 11 (1): 91–102.
  14. **Bisha B., Simonson J., Janes M., Bauman K., Goodridge L.** 2012. *A review of the current status of cultural and rapid detection of Vibrio parahaemolyticus. International Journal of Food Science and Technology;* 47: 885–899.
  15. **Bjørnevik M, Karlsen Ø, Johnston IA, Kiessling A.** 2003. *Effect of sustained exercise on white muscle structure and flesh quality in farmed cod (Gadus morhua L.). Aquaculture Res.* 34:55–64.
  16. **Bjørkevold I, Olsen RL, Skjerdal OT.** 2003. *Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus Psychrobacter in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (Gadus morhua). Intl J Food Microbiol.* 84: 175–87.
  17. **Blake, P. A., R. E. Weaver, and D. G. Hollis.** 1980. *Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios. Annu. Rev. Microbiol.*34:341-367.
  18. **Bogason SG.** 1987. *Salting of cod fillets. Fiskvinnslan.* 4:39–44.
  19. **Borgstrom G.** 1968. *Salting (curing) and smoking. Food technology.* New York: Macmillan Co. p 273–89.
  20. **Broberg C.A., Calder T.J., Orth K., (2011)** «*Vibrio parahaemolyticus cell biology and pathogenicity determinants*», **Microbes and Infection**, 13 : 992 - 1001.
  21. **Brown, J.A., Minkoff, G., & Puvanendran, V.** 2003. *Larviculture of Atlantic cod (Gadus morhua): progress, protocols and problems. Aquaculture.* 227:357-372.
  22. **Calik H, Morrissey MT, Reno PW, An H.** 2002. *Effect of high-pressure processing on Vibrio parahaemolyticus strains in pure cultures and Pacific oysters. Journal of Food Science.* 67: 1506-1510.
  23. **CDC.** 2001. *Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness- selected sites, United States, 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report.* 50: 241-246.
  24. **Chao, G., Jiao, X., Zhou, X., Yang, Z., Huang, J., Pan, Z., et al.** 2009. *Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing, and antibiotic*

- susceptibility of foodborne and clinical Vibrio parahaemolyticus isolates in Jiangsu, China. Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1021–1028.
25. **Chiou CS, Hsu SY, Chiou SI, Wang TK, Chao CS. 2000.** *Vibrio parahaemolyticus serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of foodborne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999, Journal of Clinical Microbiology*, 38 : 4621 – 4625.
  26. **Codex Alimentarius. 2003.** *Code of practice for fish and fishery products. CAC/RCP 52. Rome: FAO/WHO.* 134 p.
  27. **Cohen, D.M., T. Inada, T. Iwamoto and N. Scialabba, 1990.** *FAO species catalogue. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fish. Synop.* 125(10): pp. 442.
  28. **Colwell, R. R. 1996.** *Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. Science* .274:2027–2028.
  29. **Cook DW, Bowers JC, DePaola A. 2002b.** *Density of total and pathogenic (tdh+) Vibrio parahaemolyticus in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. Journal of Food Protection.* 65: 1873-1880.
  30. **Cook, R., Fernandes, P., Florin, A., Lorance, P. & Nedreaas, K. 2015.** *Gadus morhua. The IUCN Red List of Threatened Species 2015.*
  31. **Cordova J. L., J. Astorga, W. Silva, and C. Riquelme. 2002.** *Characterization by PCR of Vibrio parahaemolyticus isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. Biol Res.* 35: 443-440.
  32. **Dahle, G., Jørstad, K.E., Rusaas, H.E. & Otterå, H. 2006.** *Genetic characteristics of broodstock collected from four Norwegian coastal cod (Gadus morhua) populations. ICES Journal of Marine Science.* 63:209-215.
  33. **Daniels, N. A., L. MacKinnon, R. Bishop, S. Altekruse, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. H. Bean, P. M. Griffin, and L. Slutsker. 2000.** *Vibrio parahaemolyticus infections in the United States, 1973-1998. J. Infect. Dis.* 181:1661-1666.
  34. **Daniels, N. A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A. L., et al. 2000.** *Emergence of a new O3:K6 V. parahaemolyticus serotype in raw oysters. J. Am. Med. Assoc.* 284, 1541–1545.
  35. **Daniels, N. A., L. MacKinnon, R. Bishop, S. Altekruse, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. H. Bean, P. M. Griffin, and L.**

- Slutsker.** 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. **J. Infect. Dis.** 181:1661–1666.
36. **Davidson MH, Stein EA, Bays HE, Maki KC, Doyle RT, Shalwitz RA, Ballantyne CM, Ginsberg HN.** 2007. *Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to Simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: An 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* **Clin Ther.** 29(7): 1354–1367
37. **Davie, A., Porter, M.J., Bromage, N.R. & Migaud, H.** 2007. *The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Part II. Somatic growth.* **Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences.** 64: 98-112.
38. **Daun, H.** 1979. *Interaction of wood smoke components and foods.* **Food Technol** 33:66-70.
39. **Hilderbrand, K. S.** 1992. *Fish smoking procedures for forced convection smokehouses. Special Report 887.* **Oregon State University Extension Service, Corvallis, OR.**
40. **DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM.** 1990. *Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal waters and oysters.* **Environmental Microbiology;** 56: 2299-2302.
41. **Di Luccia A, Alviti G, Lamacchia C, Faccia M, Gambacorta G, Liuzzi V, Spagna Musso S.** 2005. *Effect of the hydration process on water-soluble proteins of preserved cod products.* **Food Chem.** 93:385–93.
42. **Dimitraki p., Velonakis E.** 2007. *The survival of pathogens in frozen food as a health risk.* **Archives of Hellenic Medicine.** 24 (5): 432 – 439.
43. **Drake S, De Paola A, Jaykus L.** 2007. *An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*.* **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** 6 : 120 – 144.
44. **Dutil, J. D. and Brander, K.** 2003. *Comparing productivity of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks and limits to growth production.* **Fisheries Oceanography** 12(4): 502-512.
45. **EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Center for Disease Prevention and Control).** 2013. *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic agents, and foodborne outbreaks in 2011.* **EFSA Journal.** 11(4) 3129.



46. **European Food Safety Authority** (2014) “*The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*”, **EFSA Journal**, 12:2, 3547.
47. **Fabbro C, Cataletto B, Del Negro P.** 2010. *Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea).* **FEMS Microbiol Lett.** 307(2):158-64. Epub 2010 Mar 30.
48. **Fahay, M.P. & D.F. Markle.** 1984. *Gadiformes: Development and relationships, in Moser, H.G. et. al. (eds) - Ontogeny and Systematics of Fishes - Special Publication No. 1. American Society of Ichthyologists and Herpetologists.* pp. 265-283, Allen Press Inc. Lawrence, USA
49. **FAO.** 2014. *Fish Trade and Human Nutrition, Fourteenth Session, Sub-committee on fish trade.* 4, pp. 2 – 6.
50. **Fernandez-Piquer J., Bowman P. J., Ross T., Tamplin L. M.** 2011. *Predictive Models for the Effect of Storage Temperature on Vibrio parahaemolyticus Viability and Counts of Total Viable Bacteria in Pacific Oysters.* **Environmental Microbiology.** p. 8687 – 8695.
51. **Fernandes, P.G., and Cook, R.M.** 2013. *Reversal of Fish Stock Decline in the Northeast Atlantic.* **Current Biology.**
52. **Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyoma, K. Fukai, T. Mukai, and T. Ueho.** 1953. *On the bacteriological examination of shirasu food poisoning.* *Med. J. Osaka Univ.* 4:299-304.
53. **Gomez R, Fernandez-Salguero J.** 1993. *Note: water activity of Spanish intermediate-moisture fish products.* **Rev Espanola De Ciencia Y Technol De Allimentos** 33:651–6.
54. **Halwart, M.** 2013. *Valuing aquatic biodiversity in agricultural landscapes.* In: *Fanzo, J., Hunter, D., Borelli, T., Mattei, F. eds. Diversifying food and diets: using agricultural biodiversity to improve nutrition and food security*, pp. 88–108.
55. **Ham H., Orth K.** 2012. *The Role of Type III Secretion System 2 in Vibrio parahaemolyticus Pathogenicity* **The Journal of Microbiology**, 50 (5) : 719 – 725.

56. **Harris, William S.** 1997. *n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies.* **Am J Clin Nutr** **65** (5 Sup.): 1645S–1654S.
57. **Heredia A, Andrés A, Betoret N, Fito P.** 2007. *Application of the SAFES (systematic approach of food engineering systems) methodology to salting, drying and desalting of cod.* **J Food Eng.** 83:267–76.
58. **Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T.** 2010. *Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice.* **Infect. Immun.** 78:1772–1780.
59. **Honda, T., Yoh, M., Kongmuang, U., & Miwatani, T.** 1985. *Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*.* **Journal of clinical microbiology.** 22(3), 383-386.
60. **Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T., Miwatani, T.** 1987. *Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*.* **Lancet i**, 331–332.
61. **Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T.** 1988. *Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolates of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin.* **Infect. Immun.** 56, 961–965.
62. **Hutchings, Jeffrey A; Bishop, Todd D; McGregor-Shaw, Carolyn R.** 1999. *Spawning behaviour of Atlantic cod: evidence of mate competition and mate choice in a broadcast spawner".* **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 56 (1): 97–104.
63. **International Disease Surveillance Center (IDSC).** 1999. **Vibrio parahaemolyticus*, Japan 1996-1998, Infectious Agents Surveillance Report (IASR).* 20:1-2.
64. **ICES,** 2005. *Spawning and life history information for North Atlantic cod stocks.* **ICES Coop. Res. Rep.** 274. 152 p.
65. **ISO/TS 21872–1: 2007** *Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. — Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*.* **International Organization for Standardization (ISO)**
66. **Jakabal M, Gelli DS, Torre JCM, Rodas MAB, Franco BDGM, Destro MT, Landgraf M.** 2003. *Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella Enteritidis*,*

- Salmonella Infantis, and Vibrio parahaemolyticus in oysters (Crassostrea brasiliana)*. **Journal of Food Protection**. 66: 1025-1029.
67. **Jason AC, Peters GR.** 1973. *Analysis of bimodal diffusion of water in fish muscle*. **J Phys D: Appl Phys**. 6:512–21.
68. **Jay JM.** 1996. *Low-temperature food preservation and characteristics of psychotropic microorganisms*. **Modern food microbiology, 5<sup>th</sup> edition, Chapman & Hall, New York**, 328 – 346.
69. **Jay et al.** 2005, *Modern Food Microbiology* (Seventh Edition), **Food Science Text Series**, pp 109 – 120, 354 – 370, 657 – 661.
70. **Jobling, M. & Pedersen, T.** 1995. *Cultivation of the Atlantic Cod, Production of Aquatic Animals*. pp. 347-356.
71. **Johnson, C. N., J. C. Bowers, K. J. Griffitt, V. Molina, R. W. Clostio, S. Pei, E. Laws, R. N. Paranjpye, M. S. Strom, A. Chen, N. A. Hasan, A. Huq, N. F. Noriega III, D. J. Grimes, and R. R. Colwell.** 2012. *Ecology of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States)*. **Appl. Environ. Microbiol.** 78:7249– 7257.
72. **Jones J., Ludeke C., Bowers J., Fischer M., Parsons M., Bopp C., De Paola A.** 2012. *Biochemical, Serological, and Virulence Characterization of Clinical and Oyster Vibrio parahaemolyticus Isolates*. **Journal of Clinical Microbiology**, 50 (7): 2343 – 2352.
73. **Joseph, S. W., R. R. Colwell, and J. B. Kaper.** 1982. *Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios*. **Crit. Rev. Microbiol.** 10:77–124.
74. **Kaneko, T., and R. R. Colwell.** 1973. *Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay*. **J. Bacteriol.** 113:24–32.
75. **Kaper, J.B., Campen, R.K., Seidler, R.J., Baldini, M.M., Falkow, S.** 1984. *Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon associated hemolysin of Vibrio parahaemolyticus*. **Infect. Immun.** 45, 290–292.
76. **Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S & Nishibuchi M.** 1999. *Identification of Vibrio parahaemolyticus strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene*. **J Clin Microbiol.** 37: 1173–1177.
77. **Kjesbu, O.S., Taranger, G.L. & Trippel, E.A.** 2006. *Gadoid mariculture: development and future challenges: introduction*. **ICES Journal of Marine Science.** 63:187-191.

78. **Kothary, M.H., Burr, D.H., Tall, B.D., Hanes, D.E., Miliotis, M.D., 2000.** *Thermostable direct hemolysin, thermostable-related hemolysin, and urease are not required for pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus in animal models, (Abstracts of the 100th General Meeting of the American Society for Microbiology).* p. 68.
79. **Krantz, G. E., R. R. Colwell, and E. Lovelace. 1969.** *Vibrio parahaemolyticus from the blue crab Callinectes sapidus in Chesapeake. Bay. Science.* 164:1286–1287.
80. **Lake R., Hudson A., Cressey P. 2003.** *Risk profile: vibrio parahaemolyticus in seafood. Institute of Environmental Science & Research Limited.* 4 – 27.
81. **Lauritzen K, Akse L, Gundersen B, Olsen RL. 2004a.** *Effects of calcium, magnesium and pH during salt-curing of cod (Gadus morhua L.). J Sci Food Agric.* 84:683–92.
82. **Lee, C.Y., Cheng, M.F., Yu, M.S., Pan, M.J. 2002.** *Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from Vibrio parahaemolyticus. FEMS Microbiol. Lett.* 209, 31–37.
83. **Levin R.E. 2006.** *Vibrio parahaemolyticus, a Notably Lethal Human Pathogen Derived from Seafood : A review of its Pathogenicity, Characteristics, Subspecies Characterization, and Molecular Methods of Detection. Food Biotechnology* 20: 1, 93 – 128.
84. **Lhafi, S.K., Kuhne, M. 2007.** *Occurrence of Vibrio spp. in blue mussels (Mytilus edulis) from the German Wadden Sea. International Journal of Food Microbiology.* 116, 297–300.
85. **Linton EP, Wood AL. 1945.** *Drying of heavily-salted fish. J Fisheries Res Board Can* 6d:380–91.
86. **Lovell, S. J. and L. A. Drake. 2009.** *Tiny stowaways: analyzing the economic benefits of a U.S. Environmental Protection Agency permit regulating ballast water discharges. Environ.Manage.* 43(3):546-55.
87. **Lozano-Leon A., J. Torres, C.R. Osorio, and J. Martinez-Urtaza. 2003.** *Identification of tdh-positive Vibrio parahaemolyticus from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiology Letters.* 226:281-284.
88. **Lupin HM, Boeri RL, Moschiar SM. 1981.** *Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. J Food Technol.* 16:31–8.

89. **Mackie IM.** 1993. *The effects of freezing on flesh proteins.* **Food Rev Intl.** 9:575–610.
90. **Maga, J.A.** 1988. *Smoke In Food Processing.* **CRC Press, Incorporated, Boca Raton, FL.**
91. **Mangili A, Gendreau MA.** 2005. *Transmission of infectious diseases during commercial air travel.* **Lancet.** Mar 12-18;365(9463):989-96.
92. **Martinez-Alvarez O, Borderias AJ, Gomez-Guillen MC.** 2005a. *Sodium replacement in the cod (*Gadus morhua*) muscle salting process.* **Food Chem.** 93:125–33.
93. **Martinez-Alvarez O, Gomez-Guillen MC.** 2005. *The effect of brine composition and pH on the yield and nature of water-soluble proteins extractable from brined muscle of cod (*Gadus morhua*).* **Food Chem.** 92:71–7.
94. **Martinez-Alvarez O, Gomez-Guillen MC.** 2006. *Effect of brine-salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry-salting.* **Food Chem.** 94:123–9.
95. **Martínez-Alvarez, O., & Gomez-Guillen, C.** 2013. *Influence of mono- and divalent salts on water loss and properties of dry salted cod fillets.* **LWT-Food Science and Technology.** 53, 387:394.
96. **Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., et al.** 2005. *Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe.* **Emerg. Infect. Dis. J.** 11, 1319–1320.
97. **McCarthy,S.A., DePaola,A., Cook,D.W., Kaysner,C.A., Hill, W.E.** 1999. *Evaluation of alkaline phosphatase-and digoxi genin-labelled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gen eof *Vibrio parahaemolyticus*.* **Lett.Appl. Microbiol.** 28, 66–70.
98. **McEvoy, L.A. and J. McEvoy.** 1992. *Multiple spawning in several commercial fish species and its consequences for fisheries management, cultivation and experimentation.* **J. Fish Biol.** 41(Suppl. B):125-136.
99. **Mertens, A., J. Nagler, W. Hansen, and E. Gepts-Friedenreich.** 1979. *Halophilic, lactose-positive *Vibrio* in a case of fatal septicemia.* **J. Clin. Microbiol.** 9:233-235.
100. **Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S.** 1969. *In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity.* **J. Bacteriol.** 100, 1147–1149.

101. **Munoz-Guerrero H, Gutierrez MR, Vidal-Brotons D, Barat JM, Gras ML, Alcaina MI.** 2010. *Environmental management of the residual brine of cod desalting. Quantification of mass transfer phenomena and determination of some parameters on the residual brine important for its treatment by membrane technology.* **J Food Eng.** 99:424–9.
102. **Muntada-Carigga JM, Rodrigues-Jerez JJ, Lopez-Sabater EL, Mora Ventura M.** 1995. *Effect o chill and freezing on survival of Vibrio parahaemolyticus inoculated in homogenated of oyster meat.* **Lett Appl Microbial.** 2:225 – 227.
103. **Myers, R.A., and Worm, B.** 2005. *Extinction, survival or recovery of large predatory fishes.* *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 360(1453): 13-20.
104. **Nair, G. B., T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, and D. A. Sack.** 2007. *Global dissemination of Vibrio parahaemolyticus serotype O3:K6 and its serovariants.* **Clin. Microbiol. Rev.** 20:39–48.
105. **Narberhaus, I., J. Krause and U. Bernitt.** 2012. *Threatened biodiversity in the German North and Baltic seas.* **Naturschutz und Biologische Vielfalt, Heft 117.** Federal Agency for Nature Conservation. Bonn, Germany.
106. **Naughton, L. M., S. L. Blumerman, M. Carlberg, and E. F. Boyd.** 2009. *Osmoadaptation among Vibrio species and unique genomic features and physiological responses of Vibrio parahaemolyticus.* **Appl. Environ. Microbiol.** 75:2802–2810. 27.
107. **Neely, M. N., and E. R. Olson.** 1996. *Kinetics of expression of the Escherichia coli cad operon as a function of pH and lysine.* **J. Bacteriol.** 178:5522–5528.
108. **Nair GB., Ramamurthy T., Bhattacharya S., Dutta B., Takeda Y., Sack D.** 2007. *Global Dissemination of Vibrio parahaemolyticus Serotype O3:K6 and Its Serovariants.* **Clinical Microbiology Reviews.** 20 (1): 39, 38 – 48.
109. **Nichibuchi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y., Kaper, J.B.** 1985. *Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in Vibrio parahaemolyticus and other vibrio species by the DNA colony hybridization test.* **Infect. Immun.** 49 (3): 481-486.

110. **Nichibuchi, M., Kaper, J.B.** 1995. *Minireview. Thermostable direct hemolysin gene of Vibrio parahaemolyticus: a virulence gene acquired by a marine bacterium.* **Infect. Immun.** 63, 2093–2099.
111. **Okuda, J., M. Ishibashi, S. L. Abbott, J. M. Janda, and M. Nishibuchi.** 1997a. *Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of Vibrio parahaemolyticus isolated on the west coast of the United States.* **J.Clin.Microbiol.** 35:1965-1971.
112. **Oliveira H., Goncalves A., Nunes M., Vaz-Pirez P. and Costa R.** 2015. *Quality changes during cod (Gadus morhua) desalting at different temperatures.* **J Sci Food Agric.** 95: 2632–2640.
113. **Oliveira H., Pedro S., Nunes M., Costa R., Vaz-Pirez P.** 2012. *Processing of salted cod (Gadus spp.): A review,* **Institute of Food Technologists,** vol. (2012), p. 546 – 564.
114. **Olsen, E. M., Lilly, G. R., Heino, M., Morgan, M. J., Bratney, J. and Dieckmann, U.** 2005. *Assessing changes in age and size at maturation in collapsing populations of Atlantic cod (Gadus morhua ).* **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 62(4): 811-823.
115. **Otterå, H., Carlehög, M., Karlsen, Ø., Akse, L., Borthen, J. & Eilertsen, G.** 2007. *Effect of diet and season on quality of farmed Atlantic cod (Gadus morhua L.).* **LWT - Food Science & Technology.** 40:1623-1629.
116. **Park K.S., Ono T., Rokuda M., Jang M.H., Okada K., Lida T., Honda T.** 2004. *Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of Vibrio parahaemolyticus.* **Infection and Immunity.** p. 6659 – 6665.
117. **Pedro S, Albuquerque MM, Nunes ML, Bernardo MF.** 2004. *Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (Gadus morhua) and desalted products at low and high temperatures.* **J Aquat Food Prod Technol.** 13:39–48.
118. **Pereira de Abreu D., Maroto J., Rodriquez K., Cruz J.** 2011. *Antioxidants from burley husks impregnated in films of low – density polyethylene and their effect over lipid deterioration of frozen cod (Gadus morhua).* **J Sci Food Agric,** 92: 427 – 432.
119. **Ramamurthy T & Nair GB.** 2014. *Vibrio parahaemolyticus in Encyclopedia of Food Safety.* **Ed. Motarjemi Y.** pp. 554 – 563.

120. **Rodrigues MJ, Ho P, Lopez-Caballero ME, Bandarra NM, Nunes ML.** 2005. *Chemical, microbiological, and sensory quality of cod products salted in different brines.* **J Food Sci.** 70:M1–6.
121. **Rosec JP, Causse V., Cruz B., Rauzier J., Carnat L.** 2012. *The international standard ISO/TS 21872–1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood : ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR.* **International Journal of Food Microbiology**, 157 : 189 – 194
122. **Rosenlund, G. & Halldórsson, Ó.** 2007. *Cod juvenile production: research and commercial developments.* **Aquaculture.** 268:188-194.
123. **Ryan, W. J.** 1976. *Marine vibrios associated with superficial septic lesions.* **J. Clin. Pathol.** 29:1014-1015.
124. **Sakata J., Kawatsu K., Kawahara R., Kanki M., Iwasaki T., Kumeda Y., Kodama H.** 2012. *Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant thermolabile hemolysin and its application to screen for *Vibrio parahaemolyticus* contamination in raw seafood.* **Food Control.** 23: 171–176.
125. **Sanders, T.A.B.; Oakley, F.R.; Miller, G.J.; Mitropoulos, K.A.; Crook, D.; Oliver, M.F.** 1997. *Influence of n–6 versus n–3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors». Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 17 (12): 3449–3460.
126. **Shinoda, S.,Matsuoka, H.,Tsuchie, T.,Miyoshi, S.,Yamamoto, S.,Taniguchi, H., et al.** 1991. *Purification and characterization of alecithin-dependent haemolysin from *Escherichiacoli* trans for med by a *Vibrio parahaemolyticus* gene.* **J. Gen.Microbiol.** 137, 2705–2711.
127. **Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., Nishibuchi, M.** 1990. *Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis.* **Infect. Immun.** 58, 3568–3573.
128. **Sink, J. D.** 1979. *Effects of smoke processing on muscle food product characteristics.* **Food Technol.** 33:72-83.



129. **Solomakos N., Pexara A., Govaris A.** 2012. *Vibrio parahaemolyticus in seafood – associated outbreaks.* **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 63 (1): 54 – 62.
130. **Su Yi-Cheng, Liu C.** 2007. *Vibrio parahaemolyticus: A concern of seafood safety.* **Food Microbiology**. 24: 549–558.
131. **Takeda, Y.** 1983. *Thermostable direct hemolysin of Vibrio parahaemolyticus.* **Pharm. Ther.** 19, 123–146.
132. **Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H, Hirose S.** 1993. *Reactive arthritis due to Vibrio parahaemolyticus.* **Journal of Rheumatology**. 20: 1062-1063.
133. **Taranger, G.L., Aardal, L., Hansen, T. & Kjesbu, O.S.** 2006. *Continuous light delays sexual maturation and increases growth of Atlantic cod (Gadus morhua L.) in sea cages.* **ICES Journal of Marine Science**. 63:365-375.
134. **Thilsted, S.H.** 2012. *The potential of nutrient-rich small fish species in aquaculture to improve human nutrition and health.* In: Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Bartley, D.M., De Silva, S.S., Halwart, M., Hishamunda, N., Mohan, C.V. & Sorgeloos, P. *Farming the waters for people and food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture. 2010.* Phuket, Thailand. pp. 57–73. Rome, FAO and Bangkok, NACA. 896 pp.
135. **Thorarinsdottir KA, Arason S, Bogason SG, Kristbergsson K.** 2001. *Effects of phosphate on yield, quality, and water-holding capacity in the processing of salted cod (Gadus morhua).* **J Food Sci.** 66:821–6.
136. **Thorarinsdottir KA, Arason S, Bogason SG, Kristbergsson K.** 2004. *The effects of various salt concentrations during brine curing of cod (Gadus morhua).* **Intl J Food Sci Technol.** 39:79–89.
137. **Thornton V, Hazell W, Simmons G.** 2002. *Acute gastroenteritis associated with seafood privately imported from the Pacific Islands.* **New Zealand Medical Journal.** 155: 234-236.
138. **Tuyet, D. T., V. D. Thiem, L. Seidlein, A. Chowdhury, E. Park, D. G. Canh, B. T. Chien, T. V. Tung, A. Naficy, M. R. Rao, M. Ali, H. Lee, T. H. Sy, M. Nichibuchi, J. Clemens, and D. D. Trach.** 2002. *Clinical, epidemiological, and socioeconomic analysis of an outbreak of Vibrio parahaemolyticus in Khanh Hoa Province.* **Vitenam. J. Infect. Dis.** 186:1615-1620.

139. **Uzars, D. and M. Plikshs.** 2000. *Cod (Gadus morhua L.) cannibalism in the Central Baltic: interannual variability and influence of recruit abundance and distribution.* **ICES J. Mar. Sci.** 57:324-329.
140. **van Klaveren FW, Legendre R.** 1965. *Salted cod.* In: **Borgström G, editor.** **Fish as food.** Vol. 3. London: Academic Press. p 133–63.
141. **Vasudevan P, Marek P, Daigle S, Hoagland T, Venkitanarayanan KS.** 2002. *Effect of chilling on survival of Vibrio parahaemolyticus on fish fillets.* **Journal of Food Safety.** 22: 209-217.
142. **Wang, R. Z., Huang, J. D., Zhang, W., Lin, G. M., Lian, J.W., Jiang, L. B., et al.** 2011a. *Detection and identification of Vibrio parahaemolyticus by multiplex PCR and DNA-DNA hybridization on a microarray.* **J. Genet. Genomics.** 38, 129–135.
143. **Wang, R.Z., Xiang, S.S., Feng, Y.J., Srinivas, S., Zhang, Y.F., Lin, M.S., et al.** 2013b. *Engineering production of functional scFv antibody in E. coli by co-expressing the molecule.* **Chapter one Skp. Front. Cell Infect. Microbiol.** 3:72.
144. **Wang R, Zhong Y, Gu X, Yuan J, Saeed AF and Wang S.** 2015. *The pathogenesis, detection, and prevention of Vibrio parahaemolyticus.* **Front. Microbiol.** 6:144.
145. **Zaitsev V, Kizeveter I, Lagunov L, Makarov T, Minder L, Podsevalov V.** 1969. *Fish curing and processing.* **Moscow: MIR Publishers.** p 198–327.

## 6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

1. **Βουλτσιάδου Ε.** 1998. *Γενικές αρχές της συστηματικής Ζωολογίας.* **Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.**
2. **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα L.338/1.

## 6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

1. CCFH. 2002. Codex Committee on Food Hygiene. Discussion paper on risk management strategies for Vibrio spp. in seafood. CX/FH 03/5-Add.3. Πρόσβαση (15/01/2016). Διαθέσιμο: [http://www.codexalimentarius.net/ccfh35/fh03\\_01e.htm](http://www.codexalimentarius.net/ccfh35/fh03_01e.htm)
2. Cultured Aquatic Species Information Programme. Gadus morhua. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Håkon Otterå. In: FAO

- Fisheries and Aquaculture Department. Πρόσβαση (12/12/2015) Διαθέσιμο:  
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gadus\\_morhua/en#tcNA014C](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gadus_morhua/en#tcNA014C)
3. FAO-FIGIS. 2001. A world overview of species of interest to fisheries. Chapter: Gadus morhua. Πρόσβαση (19/11/2015). Διαθέσιμο, from [www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2218](http://www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2218). 4p. FIGIS Species Fact Sheets. Species Identification and Data Programme-SIDP, FAO-FIGIS
  4. FAO. 2011. The state of world fisheries and aquaculture 2010, Rome, FAO. 218 pp. Πρόσβαση (19/11/2015). Διαθέσιμο: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>.
  5. FAO/WHO 2011. Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. Rome, FAO. 50p. Πρόσβαση (16/01/2015). Διαθέσιμο: [www.fao.org/docrep/014/ba0136e/ba0136e00.pdf](http://www.fao.org/docrep/014/ba0136e/ba0136e00.pdf)
  6. Fisheries Global Information System (FAO-FIGIS) –Gadus morhua In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Πρόσβαση (12/12/2015). Διαθέσιμο: <http://www.fao.org/fishery/figis/en>
  7. Wildscreen, U.K. Charity, 2004. "ArKive: Gadus Morhua". Πρόσβαση (25/10/2015). Διαθέσιμο: [http://www.arkive.org/species/ARK/fish/Gadus\\_morhua/more\\_info.html](http://www.arkive.org/species/ARK/fish/Gadus_morhua/more_info.html).
  8. Riede, K. 2004. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt: Federal Agency for Nature Conservation, Πρόσβαση (19/11/2015). Διαθέσιμο: <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=69>.
  9. NOAA Fisheries - National Marine Fisheries Service. Πρόσβαση (19/11/2015). Διαθέσιμο: [http://www.fishwatch.gov/seafood\\_profiles/species/cod/species\\_pages/atlantic\\_cod.htm](http://www.fishwatch.gov/seafood_profiles/species/cod/species_pages/atlantic_cod.htm)
  10. Integrated Taxonomic Information System, Πρόσβαση (11/10/2015). Διαθέσιμο: <http://www.itis.gov>.
  11. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (COSEWIC). Assessment and Update Report on Gadus Morhua (Atlantic Cod). xi + 76pp. Ottawa: COSEWIC. 2003. Πρόσβαση (29/20/2015). Διαθέσιμο [http://www.sararegistry.gc.ca/virtual\\_sara/files/cosewic/sr\\_atlantic\\_cod\\_e.pdf](http://www.sararegistry.gc.ca/virtual_sara/files/cosewic/sr_atlantic_cod_e.pdf).
  12. IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Πρόσβαση (16/12/2015). Διαθέσιμο: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
  13. Πρόσβαση (19/12/2015). Διαθέσιμο: <http://nutritiondata.self.com/>

14. Πρόσβαση,(27/11/2015). Διαθέσιμο: <http://www.foodtech.gr/pdfs/kapntrofimwn.pdf>
15. Πρόσβαση (09/01/2015). Διαθέσιμο: <http://www.cdc.gov/vibrio/vibriop.html>