



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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση αιθέριου ελαίου θυμαριού στη συντήρηση και στην  
ασφάλεια μαρινάτου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*)».**

**ΝΤΙΝΟΣ ΧΡΙΣΤΟΣ**

**ΒΟΛΟΣ 2016**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

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

*Στην οικογένεια μου και την Έλενα.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της τύχης των παθογόνων μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteridis* κατά την αποθήκευση μαριναρισμένου γαύρου, με ή χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου θυμαριού. Ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) προμηθεύτηκε από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Μετά από διεξοδικό πλύσιμο, αποκεφαλίστηκε, εκσπλαχνίστηκε και αφαιρέθηκε τόσο η ουρά, όσο και το κεντρικό οστό. Ακολούθως φιλετοποιήθηκε και εν συνεχεία προστέθηκε διάλυμα 6% οξικού οξέως και 2% NaCl για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της οξίνισης (μαριναρίσματος).

Το οξυνισμένο προϊόν τοποθετήθηκε σε πλαστικά δοχεία σε μερίδες των 100g, προστέθηκε αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.4 % v/w ψαριού, εμβολιάστηκε με *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteridis*, με επίπεδο πληθυσμού περίπου  $10^6$  cfu/g και εν συνεχεία καλύφθηκαν με 100 ml ηλιελαίου. Τέλος, τα δοχεία αυτά αποθηκεύθηκαν στους 4 °C για 31 ημέρες. Απαριθμήθηκαν τα *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteridis* σε τριβλία Baird-Parker, CFC, VRBGA, Palcam και XLD αντίστοιχα, καθώς και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS, ζύμες-μύκητες σε RBC, εντεροβακτήρια σε VRBGA και η ολική μικροβιακή χλωρίδα σε TSA.

Κατά την αποθήκευση του γάουρου με ή χωρίς την παρουσία θυμαριού, ο πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων αρχικά ήταν 3 log cfu/g και από την 7<sup>η</sup> ημέρα κάτω από το όριο του 1 log cfu/g, των οξυγαλακτικών δεν βρέθηκε ποτέ πάνω από το όριο του 1 log cfu/g, ενώ των εντεροβακτηρίων αρχικά ήταν της τάξης των 4 και 3 log cfu/g αντίστοιχα και από τη 14<sup>η</sup> μέρα και μετά, παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης του 1 log cfu/g. Ο ολικός πληθυσμός ο οποίος μετρήθηκε με TSA άρχισε από 2 log cfu/g, αυξήθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα σε 5 και 4,3 log cfu/g αντίστοιχα, έως ότου την 31<sup>η</sup> ημέρα βρεθεί κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g. Στα δείγματα χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου θυμαριού, ο πληθυσμός και των 5 παθογόνων μικροοργανισμών βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g την 28<sup>η</sup> ημέρα. Αντιθέτως, στα δείγματα με παρουσία θυμαριού, ο πληθυσμός της *Salmonella Enteritidis* βρέθηκε κάτω από το όριο των 2 log cfu/g την 17<sup>η</sup> ημέρα, αυτός των *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* και *Yersinia enterocolitica* την 21<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στον πληθυσμό του *Staphylococcus aureus* την 28<sup>η</sup> ημέρα.

**Λέξεις κλειδιά:** μαρινάρισμα, οξίνιση, γάουρος, αιθέρια έλαια, θυμάρι, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
1.1. Γενικά .....	1
1.2. Ο γαύρος – <i>Engraulis encrasicolus</i> , Linnaeus, 1758 .....	1
1.3. Συστηματική κατάταξη γαύρου ( <i>engraulis encrasicolus</i> ) .....	3
1.4. Αλλοίωση αλιευμάτων .....	3
1.5. Μικροβιακή αλλοίωση .....	4
1.6. Παθογόνοι μικροοργανισμοί .....	4
1.7. Συντήρηση του γαύρου .....	8
1.7.1. Ψύξη σε πάγο .....	8
1.7.2. Αλάτιση .....	9
1.7.3. Οξίνιση (μαρινάρισμα) .....	10
1.8. Αιθέρια έλαια .....	11
1.9. Σκοπός της εργασίας .....	12
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	14
2.1. Πειραματική διαδικασία .....	14
2.2. Μικροβιολογικά υλικά .....	14
2.2.1. Tryptone Soy Broth (TSB) .....	15
2.2.2. Tryptone Soy Agar (TSA) .....	16
2.2.3. Red Bile Glucose Agar (VRBGA) .....	17
2.2.4. Mann Rogosa Sharpe Agar (MRS) .....	18
2.2.5. Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) .....	20
2.2.6. Baird Parker .....	21
2.2.7. Palcam Agar .....	23
2.2.8. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) .....	24
2.2.9. Certimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC) .....	26
2.3. Προετοιμασία ιχθύων και μαρινάρισμα .....	27

2.4. Εμβολιασμός με παθογόνους .....	27
2.5. Προσθήκη αιθέριου ελαίου .....	29
2.6. Μέθοδοι απαρίθμησης μικροβιακού πληθυσμού .....	29
2.7. Μέτρηση pH .....	31
2.8. Υπολογισμός ρυθμού θανάτωσης .....	32
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>33</b>
3.1. Μικροβιακή ανάπτυξη .....	33
3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα .....	33
3.1.2. Enterobacteriaceae .....	33
3.1.3. Οξυγαλακτικά .....	34
3.1.4. Ζύμες και μύκητες .....	34
3.1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
3.1.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	37
3.1.7. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	39
3.1.8. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	41
3.1.9. <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	42
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>46</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>50</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>51</b>
6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία .....	51
6.2. Ελληνική βιβλιογραφία .....	56
6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία .....	56

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Γενικά**

Τόσο τα ψάρια του γλυκού όσο και τα ψάρια του αλμυρού νερού, περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών και αζωτούχων ενώσεων. Η περιεκτικότητά τους σε λίπος ποικίλλει ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του ψαριού, ενώ η αντίστοιχη σε υδατάνθρακες παρουσιάζει πολύ χαμηλά επίπεδα (Μποζιάρης 2009).

Για τον άνθρωπο η τροφή με ψάρια ή γενικά με αλιεύματα έχει μέγιστη σημασία, καθώς τα συγκεκριμένα είδη είναι πλούσια σε βιταμίνες, ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα- τα οποία αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η χημική σύσταση των ιχθύων, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό (περίπου 75%) και το σχετικά υψηλό pH (κατά μέσο όρο 6,3%), τα καθιστούν πολύ σημαντικό υπόστρωμα ανάπτυξης μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Οι βασικότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στη μικροβιολογική αλλοίωση τους είναι η περιβαλλοντική επιμόλυνση, η θερμοκρασία αποθήκευσής τους, το pH και ορισμένες μικροβιακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη σάρκα τους (Gram & Huss 1996).

### **1.2. Ο γαύρος - *Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758**

Γαύρος ή γάβρος είναι είδος ψαριού γνωστό ήδη από την αρχαιότητα. Είναι γνωστό και με το όνομα αντζούγια ή και χαψί (από τη τούρκικη ονομασία του). Το επίσημο

όνομά του είναι "εγγραυλίσ η εγκρασίχολος" (*Engraulis encrasicolus*) και ανήκει στην οικογένεια Εγγραυλίδες (Engraulidae).

Το μήκος του φθάνει μέχρι τα 20 εκατοστά. Η ράχη και τα πλευρά του είναι πρασινογάλαζα, ενώ η κοιλιά του είναι λευκή προς το ασημί και γυαλιστερή. Το σώμα του είναι στενόμακρο, το ρύγχος του μακρύ και το πάνω σαγόνι του εξέχει μακρύτερο. Το στόμα του φθάνει μέχρι πίσω από τα μάτια, φέρει μικρά και μυτερά δόντια. Φέρει επίσης, ραχιαίο πτερύγιο, ένα θωρακικό χαμηλά, το κοιλιακό αντικρυστά του ραχιαίου, ένα μικρό τριγωνικό εδρικό καθώς και διχλωτή ουρά (Ανανιάδη 1961).



**Εικόνα 1:** *Engraulis encrasicolus*

Ζει σε ζεστές περιοχές, κατά κοπάδια και περισσότερο στον αφρό ειδικά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Το χειμώνα αντίθετα παραμένει στο βυθό σε βάθος 100-200 μέτρα. Τρέφεται με μικροσκοπικά μαλακόστρακα και το γόνιο άλλων ιχθύων. Αναπαράγεται από τον Απρίλη μέχρι το Νοέμβριο, με κορυφαίους μήνες ωοτοκίας του τους καλοκαιρινούς λόγω θερμότητας. Τα αυγά του είναι σχήματος οβάλ και επωάζονται σε χρονικό διάστημα 24-60 ωρών (Frimodt 1995).

Παγκοσμίως, το συγκεκριμένο είδος ζει στον Ατλαντικό ωκεανό, στη Μεσόγειο, στη Μαύρη Θάλασσα, στην Αζοφική θάλασσα, ενώ εντοπίστηκαν και κάποια αποθέματα εκτός κοπαδιών στη διώρυγα του Σουέζ (Whitehead *et al.* 1990). Τα είδη *Engraulis*



*encrasicolus* (γαύρος) και *Sardina pilchardus* (σαρδέλα), συνιστούν δύο από τα πιο σημαντικά είδη μικρών πελαγικών στις ελληνικές θάλασσες καθώς η παραγωγή τους ανέρχεται στο 30% των συνολικών εκφορτώσεων. Είναι βασικό αλιεύμα στο Β.Αιγαίο και αλιεύεται κυρίως από τα επιλεκτικά αλιευτικά εργαλεία γρι-γρι (Stergiou *et al.* 1997).



**Εικόνα 2:** Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Engraulis encrasicolus* (<http://www.fishbase.org>)

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

Βασίλειο: Animalia

Φύλλο: Chordata

Κλάση: Actinopterygii

Τάξη: Clupeiformes

Οικογένεια: Engraulidae

Γένος: *Engraulis*

Είδος: *Encrasicolus*

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

#### 1.4. Αλλοίωση αλιευμάτων

Ο όρος αλλοίωση αλιευμάτων αλλά και γενικά τροφίμων αναφέρεται στις αλλαγές που το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Η αλλοίωση των αλιευμάτων είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο όπου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα σχετικά με μικροβιολογική δραστηριότητα, χημικές αντιδράσεις υποβάθμισης αλλά και ενζυμική δραστηριότητα (Huis in 't Veld 1996).

Η ποιότητα των θαλασσινών εξαρτάται από τις ενδείξεις κάποιων χαρακτηριστικών ποιότητας, όπως οργανοληπτικά, φυσικοχημικά ή μικροβιολογικά. Σε ένα αλλοιωμένο αλίευμα μπορεί εύκολα κανείς να παρατηρήσει τα ακόλουθα (Gram and Huss 1996) :

- ανεπιθύμητες οσμές
- σχηματισμό 'γλίτσας'
- αλλαγές στο χρώμα και την εμφάνιση
- αλλαγές στην υφή

#### 1.5. Μικροβιακή αλλοίωση

Όλα τα ναυπά τρόφιμα περιέχουν ποικιλία μικροοργανισμών. Ωστόσο ένα τμήμα μόνο από αυτούς κατορθώνει τελικά να φθάσει σε μεγάλους αριθμούς που θα αλλοιώσουν τα τρόφιμα, και ονομάζονται 'ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (EAM). Παρατηρείται σχετικά μεγάλο εύρος ειδικών αλλοιωγόνων οργανισμών το οποίο κυρίως εξαρτάται από τη γεωγραφική προέλευση. Οι κυριότεροι οργανισμοί αλλοίωσης είναι οι *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, και *S. putrefaciens* (Gram & Huss 1996, Koutsoumanis 2000, Boziaris *et al.* 2011).

## 1.6. Παθογόνοι μικροοργανισμοί

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

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

### *Aeromonas hydrophila*

Το *Aeromonas hydrophila* είναι Gram-αρνητικό, ραβδοφόρο βακτήριο, το οποίο συναντάται σε υψηλές θερμοκρασίες. Ανήκει στην οικογένεια Aeromonadaceae. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 35-37 °C, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι χαμηλότερη (22-25 °C) (Janda and Abbott 2010). Επίσης μπορεί να πολλαπλασιαστεί και σε αερόβιες και σε αναερόβιες συνθήκες, καθώς και σε θερμοκρασίες ψύξης (0-2 °C). Έχει πολλά βιοχημικά χαρακτηριστικά παρόμοια με κάποια γένη της οικογένειας Enterobacteriaceae, εξαιτίας των οποίων συχνά είναι δύσκολο να διαχωριστεί από αυτά (Shotts & Rimler 1973). Λόγω της δομής του, όταν εισέρχεται στον οργανισμό-ξενιστή, μολύνει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος το πρώτο διαθέσιμο όργανο. Παράγει την τοξίνη Aerolysin Cytotoxic Enterotoxin

(ACT), η οποία προκαλεί βλάβες στους ιστούς. Οι μολύνσεις από το συγκεκριμένο βακτήριο συμβαίνουν κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικών αλλαγών, αλλαγών στη θερμοκρασία, λόγω στρεσογόνων παραγόντων, και μέσω της κατανάλωσης τροφίμων τα οποία έχουν ήδη μολυνθεί από αυτό. Στον άνθρωπο προκαλεί διάφορες ασθένειες, όπως οξεία γαστρεντερίτιδα, σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και πνευμονικές λοιμώξεις. Στα ψάρια προκαλεί έλκη, σήψη της ουράς, αιμορραγική σηψαιμία, αιμορραγία στα βράγχια και κοιλιακό οίδημα (Bhowmik *et al.* 2009).

### **Listeria monocytogenes**

Η *L. monocytogenes* είναι Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Αναπτύσσεται στους 1-45 °C με ιδανική θερμοκρασία τους 30-37 °C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει σε διάφορες άλλες ακραίες συνθήκες, όπως σε υψηλή αλατότητα ή χαμηλό pH. Αναπτύσσεται σε pH 4,1-9,6, με άριστο το 6-7, και αλάτι έως 12% (Cormac 1999, Gandhi 2007). Η *L. monocytogenes* είναι πολύ διαδεδομένη στη φύση και απαντάται στα φυτά, στο έδαφος, στο νερό και στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων και υγιών ατόμων. Οι έρευνες που διεξήχθησαν έδωσαν θετικά αποτελέσματα στην ύπαρξη *L. monocytogenes* σε νωπά και κατεψυγμένα ψάρια. Ο ίδιος ο άνθρωπος μπορεί να είναι φορέας της *L. monocytogenes* σε ποσοστό 5-10% (Feldhusen 2000). Η *L. monocytogenes* είναι ένα κοινό παθογόνο βακτήριο, που εκτός από γαστρεντερίτιδα μπορεί σε ευαίσθητα άτομα να προκαλέσει αποβολή εμβρύων, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και δηλητηρίαση του αίματος. Παρόλο που τα κρούσματα λιστερίωσης δεν είναι αρκετά συχνά, το ποσοστό θνησιμότητας παραμένει αρκετά υψηλό και φτάνει το 34%. Η θεραπεία γίνεται με τη χρήση αντιβιοτικών, αν και στις σοβαρότερες περιπτώσεις δεν είναι αποτελεσματικά.

### **Staphylococcus aureus**

Ο *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος) είναι ένας Gram-θετικός, προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Προτιμά τη θερμοκρασία των 35-37°C, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί από 6-7°C έως τους 47°C. Η παρουσία μικρού πληθυσμού *S. aureus* δεν είναι ασυνήθιστη στα τρόφιμα. Μάλιστα, στα πουλερικά και στα ωμά κρέατα είναι πολύ συνήθης, καθώς αποτελεί μέρος της μικροχλωρίδας του δέρματος των ζώων. Μόλυνση εκτός από το δέρμα, μπορούν να προκαλέσουν οι χειριστές τροφίμων όταν ο άνθρωπος είναι φορέας του μικροοργανισμού αυτού. Ο μικροοργανισμός μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε  $a_w$  0,83 και να παράξει τοξίνη σε  $a_w$  0,86. Για να προκληθούν όμως κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης πρέπει ο *S. aureus* να πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό μεγαλύτερο από  $10^6$  κύτταρα/g. Ο λόγος είναι ότι τότε παράγεται αρκετή ποσότητα θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης, η οποία προκαλεί συμπτώματα ναυτίας και εμετούς. Σε βέλτιστες συνθήκες μπορεί να σχηματιστεί τοξίνη σε 4-6h. Η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από τον *S. aureus*, η σταφυλοκοκκική τοξίνωση, χαρακτηρίζεται από μικρή περίοδο επώασης, συνήθως 2-4 h. Τα κυρίαρχα συμπτώματα είναι ναυτία, εμετός, έντονοι πόνοι στο στομάχι και διάρροια. Η πλήρης ανάρρωση έρχεται μετά από 1-2 ημέρες (Μποζιάρης 2009).

### **Salmonella Enteritidis**

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια του γένους είναι προαιρετικά αναερόβια, Gram-αρνητικά. Αναπτύσσονται από τους 6-46 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C, σε pH 3,8-9,0 με βέλτιστη τιμή pH 6,6-8,2 και σε ενεργότητα νερού  $a_w$  0,94-0,99. Βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και μέσω των απεκκρίσεων μολύνουν το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα. Είναι παθογόνο για τον άνθρωπο βακτήριο διότι προκαλεί εντερικές διαταραχές, γαστρεντερίτιδα και πυρετό. Τα νωπά κόκκινα και λευκά κρέατα είναι

από τις πιο συνηθισμένες πηγές σαλμονέλας αλλά και τα αλιεύματα (Μποζιάρης 2009). Τα πουλερικά αποτελούν την αιτία των περισσότερων κρουσμάτων σαλμονέλλας. Έχουν τη δυνατότητα εισβολής στο σύστημα αναπαραγωγής των πουλερικών, με αποτέλεσμα να μεταδίδονται στα αυγά των μολυσμένων πτηνών. Μέσω του εντερικού συστήματος είναι εφικτή η μετάδοση τους στα κόπρανα και από εκεί, μολύνοντας τρόφιμα, κ.α., μεταφέρονται στον άνθρωπο. Στον άνθρωπο προκαλούν λοιμώξεις των εντέρων και αποτελούν σοβαρό πρόβλημα στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες των τροφικών δηλητηριάσεων (Roberts 1996).

### **Yersinia enterocolitica**

Το γένος *Yersinia enterocolitica* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι Gram-αρνητικά, ραβδοειδούς σχήματισμού και προαιρετικά αναερόβια. Αποτελείται από 11 είδη, 3 εκ των οποίων είναι ανθρώπινα παθογόνα (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*). Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 4 °C μέχρι 40 °C (με βέλτιστη θερμοκρασία 28-30 °C). Η βέλτιστη τιμή του pH κυμαίνεται μεταξύ 7,2-7,6 , ωστόσο έχει ανεκτικότητα και σε ακραίες τιμές (από 5 έως 9,6) (Perry & Fetherston 1997). Η μόλυνση μπορεί να προκληθεί είτε μέσω του αίματος, είτε μέσω της διατροφής (μολυσμένα λαχανικά, γάλα, και τα παράγοντα προϊόντα με βάση το κρέας). Τα συγκεκριμένα βακτήρια αδρανοποιούνται τάχιστα από οξειδωτικούς παράγοντες. Προκαλεί μία ποικιλία λοιμώξεων στον άνθρωπο, όπως εντεροκολίτιδα, γαστρεντερίτιδα και σηψαιμία και σχετίζεται με τη νόσο του Crohn, μία φλεγμονώδη πάθηση του εντέρου (Malekzadeh *et al.* 2009).

## **1.7 Συντήρηση του γαύρου**

### **1.7.1 Ψύξη σε πάγο**

Η ψύξη των ιχθύων με πάγο είναι η πιο απλή και χρησιμοποιούμενη μέθοδος σήμερα. Τα τεμάχια του πάγου διαμέτρου 2-3 cm τοποθετούνται μαζί με τα ψάρια σε κιβώτια (τελάρα). Ο πάγος είναι δυνατόν να αλεστεί και να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή τεχνητού χιονιού ώστε η αποτελεσματικότητά του να γίνει μεγαλύτερη, διότι αποφεύγεται η επαφή των ιχθύων με τον αέρα, ο οποίος τα αλλοιώνει. Ο πάγος που χρησιμοποιείται για την ψύξη μπορεί να είναι από πόσιμο ή θαλασσινό νερό.

Η θερμική μεταφορά αρχίζει αμέσως μετά την τοποθέτηση των ιχθύων και του πάγου στα κιβώτια. Το νερό που προέρχεται από την τήξη του πάγου απομακρύνεται από τα κενά των κιβωτίων. Η θερμική μεταφορά γίνεται από την επιφάνεια των ιχθύων που βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον πάγο και από εκείνο το τμήμα της επιφάνειας του που έρχεται σε επαφή με τον αέρα. Η θερμοκρασία του αέρα στην περίπτωση αυτή είναι περίπου 0°C. Ο χρόνος ψύξης της επιφάνειας αυτής είναι μεγαλύτερος από το χρόνο ψύξης της επιφάνειας των ιχθύων που έρχεται σε άμεση επαφή με τον πάγο (Γεωργάκης κ συν. 2000).

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

### **1.7.2 Αλάτιση**

Η χρήση αλατιού ως μέθοδος συντήρησης των αλιευμάτων δρα στη μείωση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ), η πτώση της οποίας παρεμποδίζει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Σε  $a_w < 0.92$  έχουμε αναστολή της βακτηριακής δράσης, με εξαίρεση κάποιους αλόφιλους μικροοργανισμούς (Μποζιάρης 2009). Εξαίρεση αποτελεί το τοξιογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* το οποίο μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να παράξει τοξίνη σε τιμή  $a_w = 0.86$  (Lupin et al. 1981). Η αλάτιση μπορεί να γίνει με προσθήκη άλατος αλλά και με υγρή αλάτιση (Αρβανιτογιάννης και Τζούρος 2004).

### **Ξηρή αλάτιση**

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

### **Υγρή αλάτιση**

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

### **1.7.3 Οξίνιση (Μαρινάρισμα)**

Η συντήρηση με οξίνιση (μαρινάρισμα), είναι μία τεχνική συντήρησης που βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Η οξίνιση πραγματοποιείται συνήθως με μαγειρικό ξύδι, το οποίο περιέχει 5-6% οξικό οξύ.



Το ψάρι υπόκειται σε προετοιμασία όπως αποκεφαλισμός, εκσπλαχνισμός, αφαίρεση του κεντρικού οστού, φιλετοποίηση, πλύσιμο και κατόπιν τοποθετείται σε δοχείο μαζί με οξικό οξύ το οποίο περιέχει και μικρή περιεκτικότητα σε αλάτι. Συνήθως, προηγείται ελαφριά αλάτιση. Η οξίνιση πραγματοποιείται είτε εν ψυχρώ είτε εν θερμώ. Τέλος, τα προϊόντα αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος ή σε θερμοκρασία ψύξης (Μποζιάρης 2009).

### **1.8 Αιθέρια έλαια**

Τα αιθέρια (πτητικά) έλαια προέρχονται από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά γνωστά για τις αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Η χρήση αυτών των φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων είναι σημαντική στη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων και στην αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων (Baratta *et al.* 1998).

Είναι φυσικές, πτητικές, ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από ισχυρή οσμή και λαμβάνονται από εκχυλίσματα αρωματικών φυτών ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Συνήθως λαμβάνονται με απόσταξη με ατμό, με τη χρήση υγρού διοξειδίου του άνθρακα και με μικροκύματα. Είναι γνωστά ως βακτηριοκτόνα, μυκητοκτόνα, αντιμικροβιακά, ιοκτόνα, και οι ιδιότητες τους και το άρωμα τους χρησιμοποιούνται στην διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων. Στις περισσότερες από τις χρήσεις τους, εμφανίζονται στην υγρή τους μορφή, είναι διαυγή και άχρωμα, λιποδιαλυτά και εύκολα διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες (Bakkali *et al.* 2007).

Τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν έντονη δράση ενάντια κυρίως σε Gram θετικά, αλλά και σε Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι ιδιαίτερος δραστικά έναντι των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*. Φυσικές συνθήκες που

βελτιώνουν τη δράση τους είναι το χαμηλό pH, η χαμηλή θερμοκρασία και η παρουσία χαμηλών επιπέδων οξυγόνου (Burt 2004).

Η διάρκεια ζωής των νωπών θαλασσινών είναι σύντομη και αυτό αποτελεί πρακτικά ένα ουσιαστικό πρόβλημα για την διανομή τους σε προϊόντα. Τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά αντιμικροβιακά, που είναι σε θέση να επεκτείνουν την διάρκεια ζωής των αλιευμάτων, είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές συντήρησης (Mejlholm & Dalgaard 2002).

### **Θυμάρι**

Το θυμάρι ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και χρησιμοποιείται σαν φαρμακευτικό προϊόν αλλά και στην μαγειρική σχεδόν σε κάθε σημείο του πλανήτη. Οι μη φαρμακευτικές του χρήσεις χρήζουν περαιτέρω προσοχής επειδή το θυμάρι χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων και αρωμάτων. Χρησιμοποιείται ευρέως σαν μαγειρικό συστατικό και εξυπηρετεί σαν συντηρητικό στα τρόφιμα κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης (Hailemariam and Emire 2013). Τα εκχυλίσματα αιθανόλης ή το αιθέριο έλαιο του θυμαριού παρουσιάζει σημαντικό ποσοστό αντιμυκητιακής και αντιμικροβιακής δράσης με ισχυρή αναστολή στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και των ριζών του οξυγόνου (Manou *et al* 1998).

Οι χρήσεις του θυμαριού στην μαγειρική και στην επεξεργασία τροφίμων καθορίζονται από τις ιδιότητες των συστατικών του ως προς το άρωμα, τη γεύση αλλά και τις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις του. Ουσίες όπως η θυμόλη και carvacrol που βρίσκονται στο θυμάρι αλλά και τα φλαβονοειδή και άλλες πολυφαινόλες θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική του δραστηριότητα (Descalzo and Sancho 2008). Ιδιαίτερα η θυμόλη και carvacrol που αποτελούν τα δύο κύρια εκχυλίσματα του θυμαριού παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική

δράση από ουσίες, ιδιαίτερα γνωστές, όπως (BHT) και τα αντιοξειδωτικά α-tocopherol (Lee and Shibamoto 2002).

## **1.9 Σκοπός της εργασίας**

Η χρησιμοποίηση οξικού οξέος (ξύδι) κατά τη διάρκεια του μαριναρίσματος, δημιουργεί όξινο περιβάλλον στο τρόφιμο, το οποίο είτε αναστέλλει την ανάπτυξη είτε αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς. Τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά αντιμικροβιακά, τα οποία είναι σε θέση να επεκτείνουν την διάρκεια ζωής των προϊόντων με παράλληλη παρεμπόδιση ή/και αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Η παρούσα εργασία έχει σκοπό να διερευνήσει την τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* και *Staphylococcus aureus*) καθώς και της φυσικής μικροχλωρίδας (ολικός μικροβιακός πληθυσμός, εντεροβακτήρια, οξυγαλακτικά, ζύμες και μύκητες) κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου, με και χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου θυμαριού.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Πειραματική διαδικασία**

Πραγματοποιήθηκαν δύο όμοια πειράματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές παρτίδες γαύρου. Το πρώτο πείραμα αποσκοπούσε στην παρακολούθηση των μεταβολών της Ολική Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικών και ζύμων-μύκητων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασίες ψύξης μαρινάτου γαύρου με ή χωρίς αιθέριο έλαιο Θυμαριού. Το δεύτερο αποσκοπούσε στην παρακολούθηση της τύχης των παθογόνων *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis , *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* και *Aeromonas hydrophila*, με ή χωρίς την παρουσία δενδρολίβανου, κατά την αποθήκευση και συντήρηση του μαριναρισμένου γαύρου.

## **2.2 Μικροβιολογικά υλικά**

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

1. Tryptone Soy Broth (TSB)
2. Tryptone Soy Agar (TSA)
3. Red Bile Glucose Agar (VRBGA)
4. Mann Rogosa Sharpe agar (MRS)
5. Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar)
6. Baird Parker
7. Palcam Agar
8. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)
9. Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC)

Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η σύσταση και ο τρόπος παρασκευής τους.

### 2.2.1. Tryptone Soy Broth (TSB)

Το υλικό αυτό είναι ένας ζωμός γενικής χρήσης ( Πίνακας 1) που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά.

Πίνακας 1. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό TSB σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

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

Διαδικασία παρασκευής:

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

### 2.2.2. Tryptone Soy Agar (TSA)

Η απαρίθμηση της OMX έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) μετά από επώαση για 48 h στους 25 °C. Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης (Πίνακας 2), το οποίο επιτρέπει την αύξηση όλων των μικροοργανισμών, που μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε εργαστηριακά υλικά (Εικ. 4).

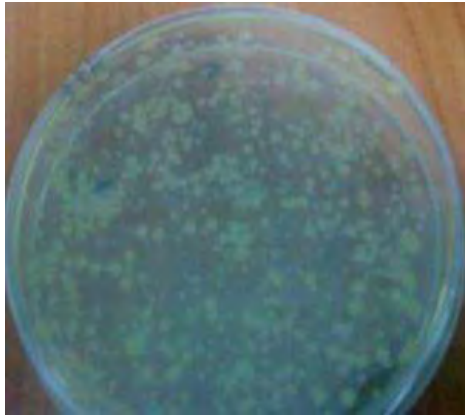
Πίνακας 2. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό TSA σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

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

Διαδικασία παρασκευής:

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

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



**Εικόνα 4.** Θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Μακρυγιάννης 2011).

### **2.2.3. Red Bile Glucose Agar (VRBGA)**

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Είναι εκλεκτικό υλικό (Πίνακας 3) χάρη στη δράση των χολικών (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 37 °C για 24 ώρες και ακολουθούσε καταμέτρηση των αποικιών χρώματος μωβ με δακτύλιο (Εικ. 5).

Πίνακας 3. Συστατικά και περιεκτικότητά τους σε ζωμό VRBGA σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Yeast extract	3 g
Peptone	7 g
Sodium chloride	5 g
Bile salts	1,5 g
Glucose	10 g
Neutral red	0,03 g
Crystal violet	0,002 g

Agar	12 g
------	------

Διαδικασία παρασκευής:

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



**Εικόνα 5.** Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA ([www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)).

#### **2.2.4. Mann Rogosa Sharpe agar (MRS)**

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Mann Rogosa Sharpe agar (MRS) (Πίνακας 4). Το οξικό νάτριο καθώς και το pH του που βρίσκεται στο 7 καταστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 96 h στους 37 °C (Εικ. 6).



Πίνακας 4. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό MRS σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Mixed Peptones	10,0 g
Yeast Extract	5,0 g
Beef Extract	10,0 g
Glucose	20,0 g
Potassium phosphate	2,0 g
Sodium acetate	5,0 g
Magnesium sulphate	0,2 g
Manganese sulphate	0,05 g
Tween	1,08 g
Ammonium citrate	2,0 g

Διαδικασία παρασκευής:

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



**Εικόνα 6.** Θρεπτικό υπόστρωμα MRS ([www.oxid.com](http://www.oxid.com)).

### **2.2.5. Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar)**

Το Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (Πίνακας 5), που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και απαρίθμηση ζυμών και μυκήτων. Οι αποικίες εμφανίζονται με χρώμα ροζ. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 48-72 h στους 25°C (Εικ. 7).

Πίνακας 5. Συστατικά και περιεκτικότητά τους σε ζωμό RBC σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

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

Διαδικασία παρασκευής:

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



**Εικόνα 7.** Επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα RBC με ζύμες και μύκητες (www.oxid.com).

#### **2.2.6. Baird Parker**

Ο προσδιορισμός του *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τον Baird Parker (1962), πραγματοποιείται σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker (Πίνακας 6). Αυτό περιέχει χλωριούχο λίθιο και τελουρίτη για την αναστολή ανάπτυξης των μη επιθυμητών μικροοργανισμών, ενώ το πυροσταφυλικό και η γλυκίνη διεγείρουν

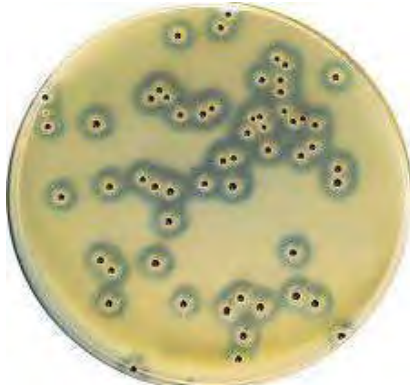
εκλεκτικά την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων. Οι αποικίες που σχηματίζονται έχουν μαύρο χρώμα. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 48 h στους 37 °C (Εικ. 8).

Πίνακας 6. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό Baird Parker σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

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

Διαδικασία παρασκευής:

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



**Εικόνα 8.** Εκλεκτικό υπόστρωμα Baird Parker με αποικίες *Staphylococcus aureus* (Μακρυγιάννης 2011).

### 2.2.7. Palcam Agar

Ο προσδιορισμός της *Listeria monocytogenes* πραγματοποιείται με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Palcam (Πίνακας 7) σύμφωνα με τους Van Netten *et al.* (1989). Η σύνθεσή του αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των κατά Gram θετικών βακτηρίων αλλά και των περισσότερων Gram αρνητικών βακτηρίων. Η εκλεκτικότητά του οφείλεται στα συστατικά του, όπως πολυμυξίνη, acriflavin, κεφταζιμίνη και χλωριούχο λίθιο. Η *Listeria monocytogenes* εμφανίζεται με χρώμα πράσινο ελιάς στις αποικίες της και όταν βρίσκονται πολλές μαζί το πράσινο μετατρέπεται σε μαύρο. Η επώαση των τρυβλίων γίνεται για 24 - 48 h στους 37°C (Εικ. 9).

Πίνακας 7. Συστατικά και περιεκτικότητά τους σε ζωμό Palcam σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Peptone	23,0 g
Yeast Extract	3,0 g
Starch	1,0 g
Sodium chloride	5,0 g

Agar	13,0 g
D(-)μαννιτόλη	10,0 g
Κιτρικό αμμώνιο σιδήρου (III)	0,5 g
Εσκουλίνη	0,8 g
Glucose	0,5 g
Sodium chloride	15,0 g
Ερυθρό φαινόλης	0,08 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 71,8 g σκόνης από το Palcam.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία 45 °C.
- Προστέθηκαν ασηπτικά, το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου με εκλεκτικό αντιβιοτικό για την *Listeria*.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.



**Εικόνα 9.** Εκλεκτικό υπόστρωμα Palcam με αποικίες *Listeria monocytogenes* (Μακρυγιάννης 2011).

### 2.2.8. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)

Ο προσδιορισμός της *Salmonella* spp. γίνεται με το εκλεκτικό υπόστρωμα XLD (Xylose Lysine Deoxycholate). Η σύνθεσή του επιτρέπει την απομόνωση και διαφοροποίηση παθογόνων εντεροβακτηρίων, όπως *Shigella* spp. και *Salmonella* spp. (Πίνακας 8). Η *Salmonella* spp. εμφανίζει ίδιο χρώμα με αυτό του υποστρώματος (διαυγές, σκούρο, κόκκινο), ημιδιαφανείς με μαύρο κέντρο. Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 24 - 48 h στους 37 °C (Εικ. 10).

Πίνακας 8. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό XLD σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Yeast Extract	3,0 g
Sodium Chloride	5,0 g
Xylose	3,5 g
Lactose	7,5 g
Sucrose	7,5 g
L-Lysine	5,0 g
Sodium Desoxycholate	2,5 g
Sodium Thiosulfate	6,8 g
Ferric Ammonium Citrate	0,8 g
Phenol Red	0,08 g
Agar	13,5 g

Διαδικασία παρασκευής:

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



**Εικόνα 10.** Επιλεκτικό υπόστρωμα XLD με αποικίες *Salmonella spp* ([www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)).

### 2.2.9. Cetrимide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC)

Ο προσδιορισμός του *Aeromonas hydrophila* γίνεται με το εκλεκτικό υπόστρωμα CFC (Cetrимide Fusidin Cephaloridine Agar). Η εκλεκτικότητα του εξαρτάται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό αντιβακτηριακών ενώσεων, τη Cetrимide, τη Fusidin και τη Cephaloridine (Πίνακας 9). Οι αποικίες είναι λευκού χρώματος, ημιδιαφανές. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 24 - 48 h στους 37 °C.



Πίνακας 9. Συστατικά και περιεκτικότητα τους σε ζωμό CFC σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Gelatin Peptone	16 g
Enzymatic Digest of Casein	10 g
Potassium Sulfate	10 g
Magnesium Chloride	1,4 g
Agar	11 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 48,4 g σκόνης από το CFC.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Προσθέτουμε 5ml γλυκερόλης.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- Προστίθενται τα αντιβιοτικά Ceftriaxone, Fusidic acid και Cephaloridine.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.

### 2.3 Προετοιμασία ιχθύων και μαρινάρισμα

Αγοράστηκε γάυρος (*Engraulis encrasicolus*) από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε στο εργαστήριο και εκεί αποκεφαλίσθηκε και αφαιρέθηκε το κεντρικό οστό. Εν συνεχεία, πλύθηκε καλά και φιλετοποιήθηκε. Κατόπιν, παρασκευάστηκε διάλυμα 6% (v/v) οξικού οξέος με 2% (w/v) NaCl, χρησιμοποιώντας μαγειρικό ξύδι (6% v/v οξικό) και μαγειρικό αλάτι, και τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε λεκάνη με το παραπάνω μίγμα οξίνισης για 8 ώρες. Μετά το πέρας

του χρονικού διαστήματος των 8 ωρών, τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία σε μερίδες των 100g.

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με παθογόνους μικροοργανισμούς σε όσες μεταχειρίσεις χρειαζόταν. Κατόπιν προστέθηκε αιθέριο ελαιο σε συγκεντρώσεις 0.4 % v/w ψαριού και κατόπιν καλύφθηκαν με 100 ml ηλιελαίου. Τέλος, τα δοχεία αυτά αποθηκεύθηκαν στους 4 °C.

#### **2.4. Εμβολιασμός με παθογόνους**

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



**Εικόνα 11.** Μέθοδος βαπτίσματος σε σωληνάκι ([www.oxid.com](http://www.oxid.com)).

Οι υγρές καλλιέργειες *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* και *Yersinia enterocolitica* σε TSB με πληθυσμό περίπου  $10^9$  cfu/ml, αραιώθηκαν σε αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent - 0,85% NaCl, 0.1% peptone) και κατόπιν όγκοι (2-3 ml) των βακτηριακών εναιωρημάτων από την κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν το προϊόν με αρχικές συγκεντρώσεις περί των  $10^5$  cfu/g.

## **2.5. Προσθήκη αιθερίου ελαίου**

Το αιθέριο έλαιο προμηθεύτηκε από την εταιρεία Dioscurides SA (Πτολεμαίδα, Ν. Κοζάνης). Ποσότητα αιθερίου ελαίου διαλύθηκε σε ηλιέλαιο και κατόπιν κατανεμήθηκε στην επιφάνεια των φιλέτων μαριναρισμένου γαύρου. Η τελική συγκέντρωση του μετά και την προσθήκη του ηλιελαίου στα δείγματα αντιστοιχούσε σε 0.4 % v/w φιλέτου (0.4 ml/100 g φιλέτου)

## **2.6. Μέθοδοι απαρίθμησης μικροβιακού πληθυσμού**

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργητικές τεχνικές όπου η ανάπτυξη των μικροοργανισμών πραγματοποιείται σε τεχνητά αποστειρωμένα εργαστηριακά θρεπτικά υλικά. Βασίζονται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα, τοποθετούνται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν πεπτόνες, διάφορα εκχυλίσματα, σάκχαρα, ανόργανα συστατικά κτλ, τα οποία σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή, αναφέρονται ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (Colony Forming Units, cfu).

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

I. Τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique): Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής τοποθετήθηκε όγκος 1 ml από το δείγμα σε τρυβλίο και στην συνέχεια έγινε μετάγγιση θρεπτικού υλικού που περιέχει άγαρ θερμοκρασίας 45 °C. Τα θρεπτικά υλικά για τα οποία ακολουθήθηκε αυτή η μέθοδος είναι τα εξής:

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

II. Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique): Με τη μέθοδο αυτή, το αποστειρωμένο και τηγμένο άγαρ, απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Κατόπιν, αφότου σταθεροποιηθεί, τα τριβλία προεπιάζονται κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η επώαση ξηραίνει την επιφάνεια του άγαρ, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μην συνενωθούν κατά το άπλωμα τους πάνω στην επιφάνεια του άγαρ. Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής, τοποθετήθηκε όγκος 0,1 ml σε κάθε τρυβλίο. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε στα εξής θρεπτικά υλικά:

- Tryptone Soy Agar (TSA)
- Rose Bengal Chloramphenicol (RBC)
- Baird Parker Agar (BP)
- Palcam Agar (P)
- Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)
- Cetrимide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC).

Από κάθε μεταχείριση λαμβάνονται εις διπλούν 1g σάρκας, το οποίο τοποθετείται σε αποστειρωμένο MRD, και κατόπιν αφού πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες αραιώσεις, διανέμεται με την κατάλληλη τεχνική (ενσωμάτωση ή επίστρωση), στα τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα.

## 2.7. Μέτρηση pH

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



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

## **2.8. Υπολογισμός ρυθμού θανάτωσης**

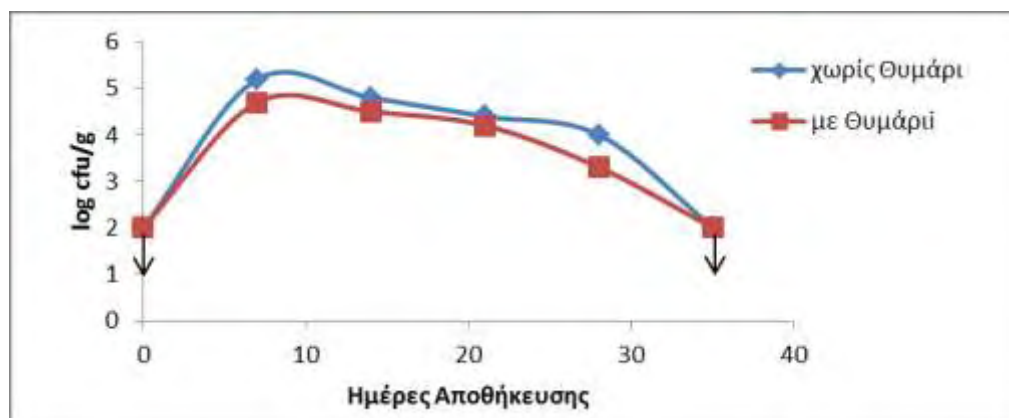
Στις μετρήσεις των παθογόνων μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ο τύπος  $D = -1/\alpha$ , από την γραμμική συνάρτηση μικροβιακής αδρανοποίησης, η οποία είναι  $\log \text{cfu/g} = \alpha * t + \beta$ . Από τον συγκεκριμένο τύπο προσδιορίζεται ο ρυθμός θανάτωσης του κάθε παθογόνου σε συνάρτηση με το χρόνο.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Μικροβιακή ανάπτυξη

##### 3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

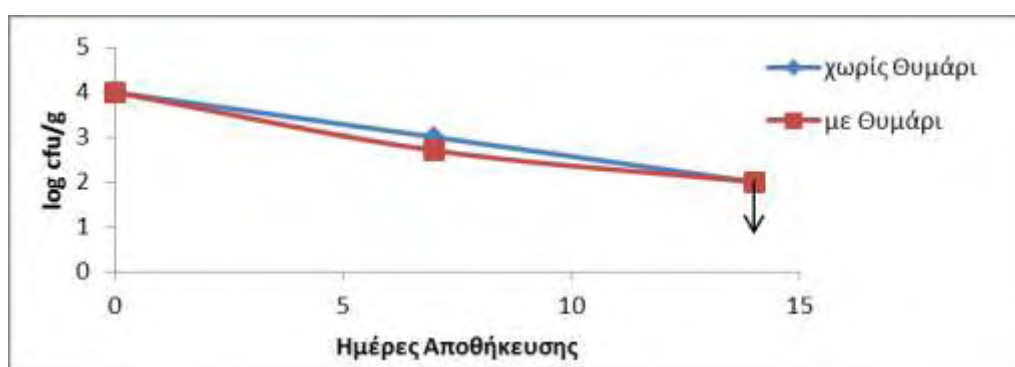
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή της OMX κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, με και χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου θυμαριού. Παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων μέχρι την 7<sup>η</sup> μέρα όπου ο πληθυσμός έφτασε περίπου στα 5 log cfu/g. Τις επόμενες ημέρες, υπήρξε μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού, ο οποίος καταλήγει στο τέλος του πειράματος σε επίπεδα μικρότερα των 2 log cfu/g, όπου είναι και το όριο ανίχνευσης με την τεχνική της επίστρωσης (Σχήμα 3.1.).



**Σχήμα 3.1.** Μεταβολή της OMX κατά την διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του μαριναρισμένου γάδρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Η μπλε γραμμή τάσης αποτυπώνει τη μεταβολή χωρίς την παρουσία ελαίου, αντίθετα η κόκκινη τη μεταβολή με την παρουσία αυτού. Το βελάκι υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 log cfu/g.

### 3.1.2. Enterobacteriaceae

Η μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.2. Αρχικά ο πληθυσμός των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που παρατηρήθηκε ήταν 4,1 και 3 log cfu/g, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο πληθυσμός μειώθηκε και μετά την 7<sup>η</sup> μέρα και από τη 14<sup>η</sup> μέρα και μετά, παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης των 1 log cfu/g όπου είναι και το όριο ανίχνευσης με την τεχνική της ενσωμάτωσης, σε όλη την διάρκεια ωρίμανσης-συντήρησης.



**Σχήμα 3.2.** Μεταβολή των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Το βελάκι υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 1 log cfu/g. Η μπλε γραμμή τάσης αποτυπώνει τη μεταβολή χωρίς την παρουσία ελαίου, αντίθετα η κόκκινη τη μεταβολή με την παρουσία αυτού.

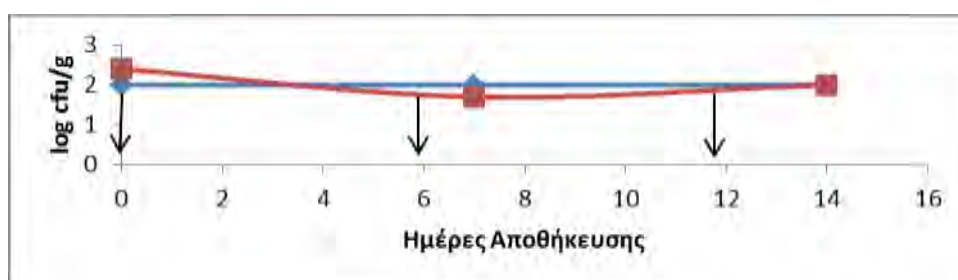
### 3.1.3. Οξυγαλακτικά

Η μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4°C, ουσιαστικά δεν βρέθηκε πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων πάνω από το επίπεδο ανίχνευσης των 10 cfu/g.



### 3.1.4. Ζύμες και μύκητες

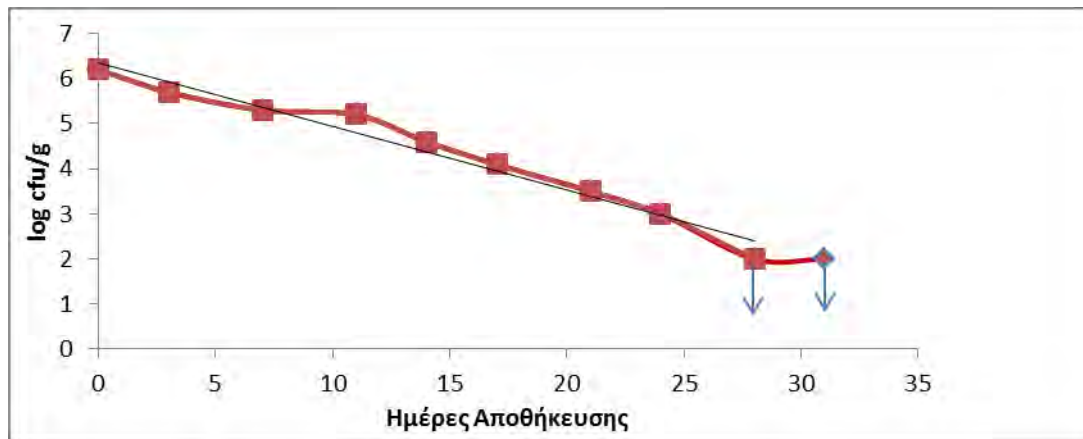
Η μεταβολή του πληθυσμού ζυμών-μυκήτων που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα RBC παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3. Στην αρχική μέτρηση ο πληθυσμός από ζύμες και μύκητες ήταν 3 και 2,3 log cfu/g. Από την 7<sup>η</sup> ημέρα και ύστερα ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης των 10<sup>2</sup> cfu/g.



**Σχήμα 3.3.** Μεταβολή του πληθυσμού ζυμών-μυκήτων κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 4°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους. Η μπλε γραμμή τάσης αποτυπώνει τη μεταβολή χωρίς την παρουσία ελαίου, αντίθετα η κόκκινη τη μεταβολή με την παρουσία αυτού.

### 3.1.5. *Staphylococcus aureus*

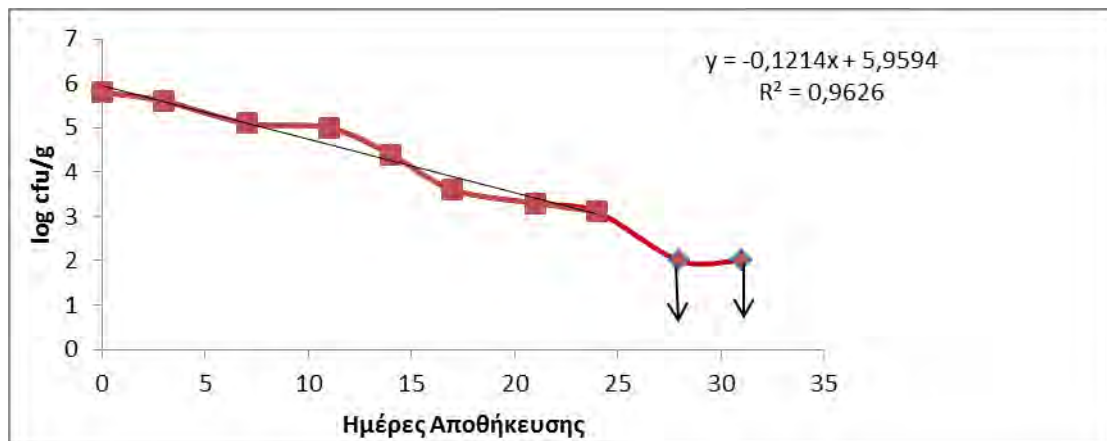
Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 6 των log cfu/g. Στο Σχήμα 3.4, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Staphylococcus aureus* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου. Παρατηρείται ότι λαμβάνει χώρα μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το τέλος του πείραματος, όπου ο πληθυσμός έπεσε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των 2 log cfu/g την 28<sup>η</sup> ημέρα.



**Σχήμα 3.4.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D = -1/\alpha$ , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Staphylococcus aureus* σε διάστημα 7,5 ημερών.

Στο **Σχήμα 3.5**, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Staphylococcus aureus* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου με την παρουσία θυμαριού. Παρατηρείται ότι λαμβάνει χώρα μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού με τον πληθυσμό να μειώνεται κάτω του ορίου ανίχνευσης την 24<sup>η</sup> ημέρα.



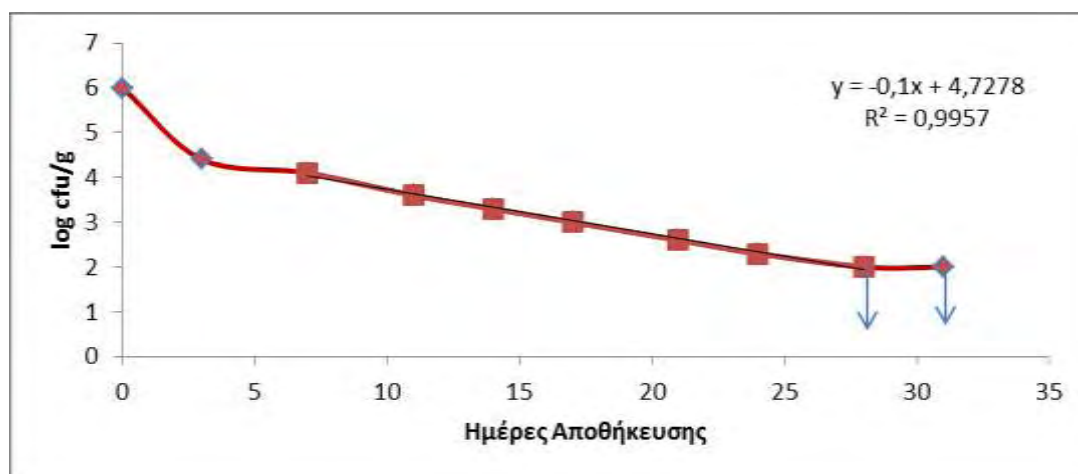
**Σχήμα 3.5.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C, με τη παρουσία θυμαριού. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

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

Παρατηρείται λοιπόν με τη παρουσία 0.4 % v/w αιθέριου ελαίου μικρή αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του παθογόνου.

### 3.1.6. *Aeromonas hydrophila*

Στο Σχήμα 3.6, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Aeromonas hydrophila* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου. Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης των 6 log cfu/g. Παρατηρούνται δύο φάσεις, στην μία λαμβάνει χώρα μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 1,8 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα, και στην άλλη μία μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 28<sup>η</sup> ημέρα.

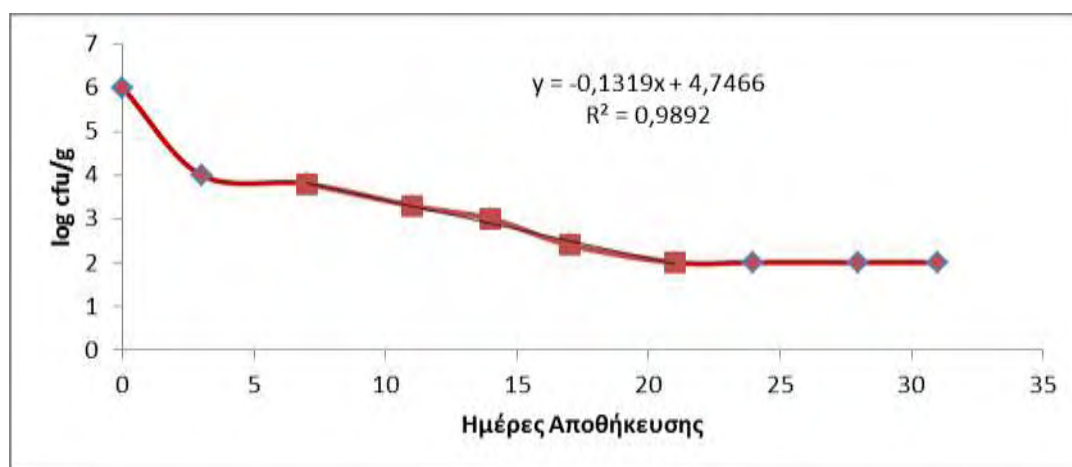


**Σχήμα 3.6.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους

4 °C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Κατα την δεύτερη φάση υπολογίστηκε από τον τύπο  $D=-1/\alpha$  , ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Aeromonas hydrophila* σε διάστημα 10 ημερών.

**Στο Σχήμα 3.7**, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Aeromonas hydrophila* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου με την παρουσία θυμαριού. Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης των 6 log cfu/g. Παρατηρούνται δύο φάσεις, στην μία λαμβάνει χώρα μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 1,9 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα, και στην άλλη μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 21<sup>η</sup> ημέρα.



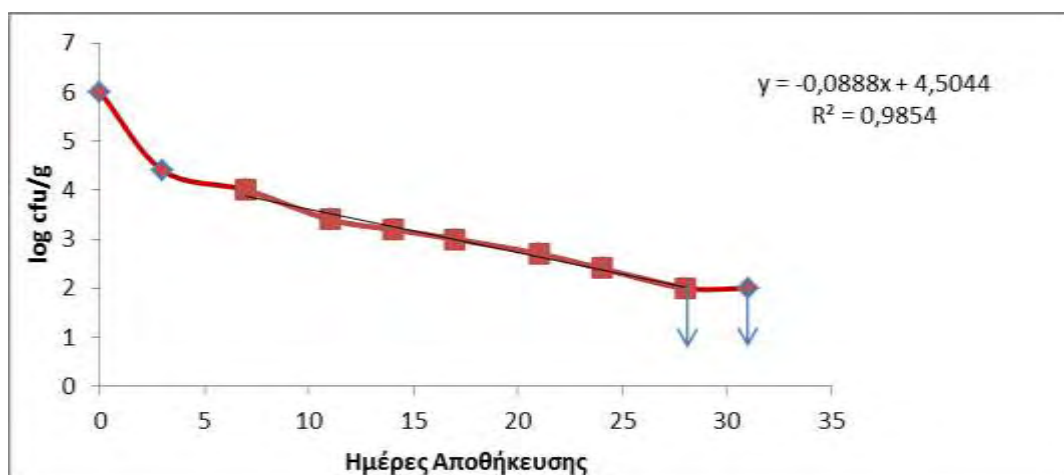
**Σχήμα 3.7.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C, με τη παρουσία δενδρολίβανου. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D=-1/\alpha$  , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Aeromonas hydrophila* σε διάστημα 7,2 ημερών.

Παρατηρείται λοιπόν με τη παρουσία 0.4 % v/w αιθέριου ελαίου μία σημαντική αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του παθογόνου.

### 3.1.7. *Yersinia enterocolitica*

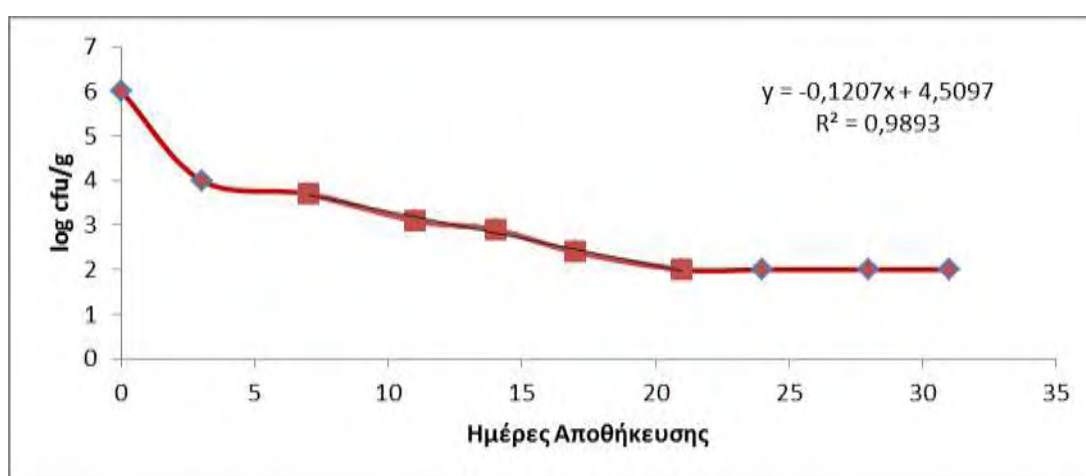
Στο Σχήμα 3.8, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Yersinia enterocolitica* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου. Και εδώ παρατηρούνται δύο φάσεις, στην πρώτη λαμβάνει χώρα μία απότομη μείωση του πληθυσμού την 3<sup>η</sup> ημέρα στα επίπεδα των 4,2 log cfu/g και εν συνεχεία στην δεύτερη υπήρξε μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 28<sup>η</sup> ημέρα.



**Σχήμα 3.8.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D=-1/\alpha$  , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Yersinia enterocolitica* σε διάστημα 11,2 ημερών.

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης των 6 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.9, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Yersinia enterocolitica* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου με την παρουσία θυμαριού. Παρατηρούνται δύο φάσεις, στην μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 2,1 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα και στην άλλη μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 21<sup>η</sup> ημέρα.



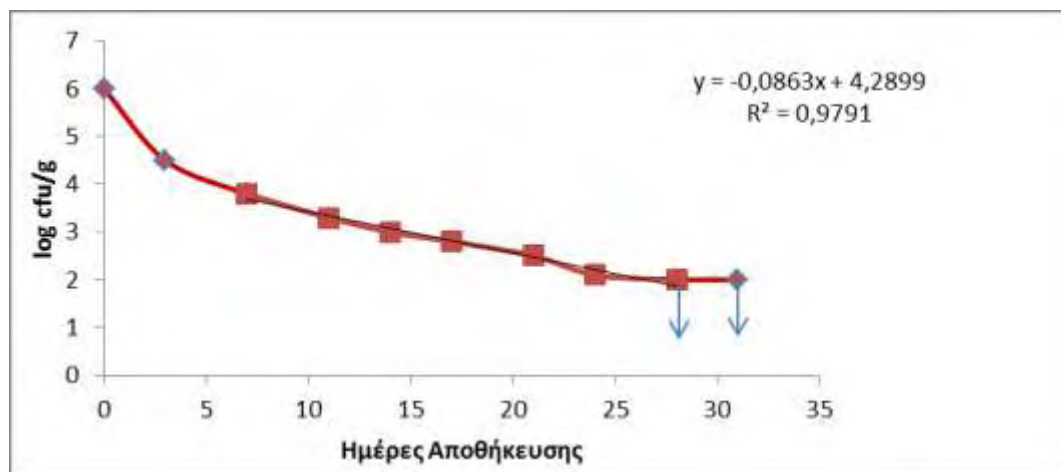
**Σχήμα 3.9.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C, με τη παρουσία δενδρολίβανου. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D=-1/\alpha$  , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Yersinia enterocolitica* σε διάστημα 8,5 ημερών.

Παρατηρείται λοιπόν με τη παρουσία 0.4 % v/w αιθέριου ελαίου μία αισθητή αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του παθογόνου.

### 3.1.8. *Listeria monocytogenes*

Στο Σχήμα 3.10, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Listeria monocytogenes* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου. Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης των 6 log cfu/g. Ομοίως, παρατηρούνται δύο φάσεις, στην πρώτη μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 1,7 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα. Και στην δεύτερη μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 28<sup>η</sup> ημέρα.

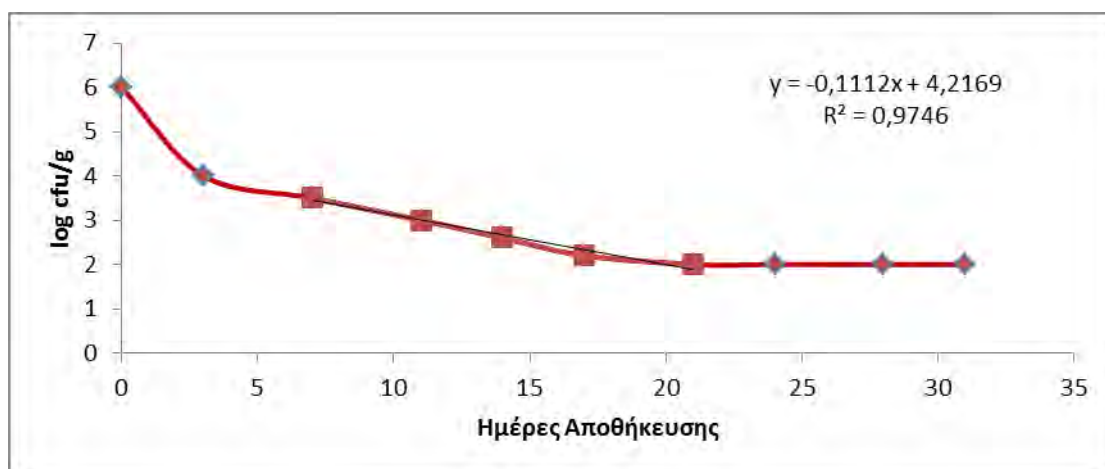


**Σχήμα 3.10.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D = -1/\alpha$ , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* σε διάστημα 11,5 ημερών.

Στο Σχήμα 3.11, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Listeria monocytogenes* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου με την παρουσία θυμαριού. Παρομοίως παρατηρούνται δύο φάσεις, μία απότομη μείωση του πληθυσμού την 3<sup>η</sup>

ημέρα της τάξης των 2,1 log cfu/g και εν συνεχεία μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 21<sup>η</sup> ημέρα.



**Σχήμα 3.11.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C, με τη παρουσία δενδρολίβανου. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

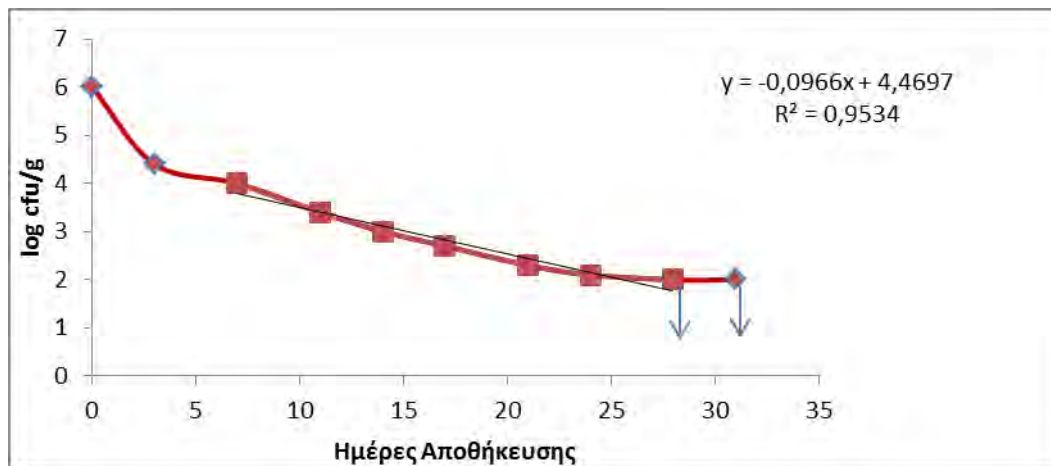
Από τον τύπο  $D = -1/\alpha$ , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* σε διάστημα 9,7 ημερών.

Παρατηρείται λοιπόν με τη παρουσία 0.4 % v/w αιθέριου ελαίου μία ελαφρά αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του παθογόνου.

### 3.1.9. *Salmonella Enteritidis*

Στο Σχήμα 3.12, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Salmonella Enteritidis* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γαύρου. Παρατηρείται ότι λαμβάνει χώρα μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 1,8 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα. Εν συνεχεία υπήρξε μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, την 28<sup>η</sup> ημέρα.

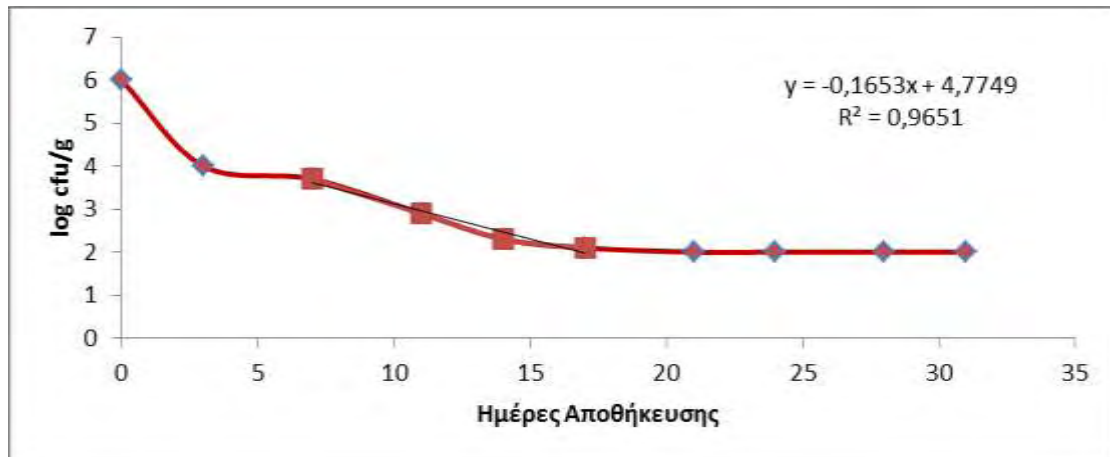




**Σχήμα 3.12.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella Enteritidis* κατά τη διάρκεια των 31ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γάουρου στους 4 °C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D = -1/\alpha$  , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Salmonella Enteritidis* σε διάστημα 10,3 ημερών.

Στο Σχήμα 3.13, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Salmonella Enteritidis* κατά την αποθήκευση του μαριναρισμένου γάουρου με την παρουσία θυμαριού. Παρατηρείται ότι λαμβάνει χώρα μία απότομη μείωση του πληθυσμού της τάξης των 2,1 log cfu/g την 3<sup>η</sup> ημέρα. Εν συνεχεία, υπήρξε μία σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι το πέρας του πείραματος, τη 14<sup>η</sup> ημέρα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η *Salmonella Enteritidis* εξουδετερώθηκε γρηγορότερα σε σχέση με τους υπόλοιπους παθογόνους μικροοργανισμούς.



**Σχήμα 3.13.** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella Enteritidis* κατά τη διάρκεια των 31 ημερών αποθήκευσης του μαριναρισμένου γαύρου στους 4 °C, με τη παρουσία δενδρολίβανου. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων της μέτρησης. Τα βελάκια υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

Από τον τύπο  $D = -1/\alpha$ , βρέθηκε ότι υπάρχει 90% μείωση του πληθυσμού του *Salmonella Enteritidis* σε διάστημα 5,3 ημερών.

Παρατηρείται λοιπόν με τη παρουσία 0.4 % v/w αιθέριου ελαίου μία σημαντικότερη αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του παθογόνου.

Συνοπτικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίν. 1), το Θυμάρι

είχε την μεγαλύτερη επίδραση στην *Salmonella Enteritidis* και την μικρότερη στον *Staphylococcus aureus*. Στα *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* υπήρξε μία ικανοποιητική μείωση.

Πίνακας 2: Χρονικό διάστημα το οποίο χρειάστηκε για να μειωθεί ο πληθυσμός του κάθε μικροοργανισμού από το επίπεδο των 6 log στο επίπεδο κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log) με ή χωρίς την παρουσία αιθέριου ελαίου.

	χρόνος (ημέρες)		
	χωρίς	με αιθέριο	
	αιθέριο έλαιο	έλαιο	% μεταβολή
staph	28	24	14,2
aeromonas	28	21	25
yersinia	28	21	25
listeria	28	21	25
salmonela	28	17	32,2

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

Σημαντικός λόγος είναι το stress που δημιουργήθηκε λόγω της αυξημένης οξύτητας (χαμηλού pH) που συνάντησαν στο νέο οξυνισμένο περιβάλλον. Ζύμες/μύκητες, καθώς επίσης και εντεροβακτήρια παρουσίασαν την 1<sup>η</sup> ημέρα τιμές της τάξης των 3 και 4 log cfu/g αντίστοιχα, αλλά την 14<sup>η</sup> ημέρα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Τέλος οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν μόνο κάτω από το όριο ανίχνευσης, καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε παρόμοια έρευνα (Kilinc & Cakli 2004), δημιουργήθηκε ένα παστεριωμένο δείγμα μαριναρισμένης σαρδέλας με χυμό ντομάτας. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός, οι ζύμες/μύκητες, τα εντεροβακτήρια και τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Η επιμόλυνση με σταφυλόκοκκο είναι πολύ κοινή για τα τρόφιμα. Για να προκληθεί κρούσμα τροφικής δηλητηρίασης, όπως προαναφέρθηκε, πρέπει ο *S. aureus* να

πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό πάνω από  $10^6$  cfu/g (Tatini *et al.* 1973). Σε παρόμοια μελέτη επιβίωσης του *Staphylococcus aureus* κατά το μαρινάρισμα βοδινού κρέατος, τα επίπεδα του μικροοργανισμού μετά το πέρας 4 ημερών ήταν περίπου 3 log cfu/g, μικρότερο σε σχέση με τα 5,5 log cfu/g που μετρήθηκαν στο γαύρο (Naido & Lindsay 2009).

Στον εμβολιασμό του γαύρου με *Aeromonas hydrophila*, ο πληθυσμός παρουσίασε μία απότομη μείωση την 7<sup>η</sup> ημέρα, και εν συνεχεία υπήρξε μία ομαλή πτωτική τάση μέχρι την 28<sup>η</sup> ημέρα όπου βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σε παρόμοια μελέτη επιβίωσης του *Aeromonas hydrophila* σε εμβολιασμένα δείγματα καπνιστού σολωμού, τα οποία επώαστηκαν στους 5 °C, ο αρχικός πληθυσμός ήταν 5 log cfu/g και η μείωση ήταν ανάλογη με την πάροδο του χρόνου. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, στα φιλέτα καπνιστού σολωμού, επιβίωσε για διάστημα 3 εβδομάδων, προτού πέσει κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g (Hudson & Mott 1993).

Κατά τον εμβολιασμό του γαύρου με *Yersinia enterocolitica*, τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά του *Aeromonas hydrophila*. Παρουσιάστηκε μία απότομη μείωση την 7<sup>η</sup> ημέρα, και εν συνεχεία υπήρξε μία ομαλή πτωτική τάση μέχρι την 28<sup>η</sup> ημέρα όπου βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σε παρόμοια μελέτη επιβίωσης του *Yersinia enterocolitica*, εμβολιασμένα δείγματα καπνιστού μπακαλιάρου ποσότητας 25 γραμμαρίων επώαστηκαν στους 3 °C και στους -1 °C, σε συνθήκες κενού και σε συνθήκες με την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα. Ο αρχικός πληθυσμός ήταν της τάξης των 5 log cfu/g. Στην θερμοκρασία επώασης των 3 °C, σε συνθήκες κενού ο πληθυσμός αυξήθηκε στο πέρας του χρόνου, ενώ σε συνθήκες διοξειδίου του άνθρακα άντεξε για 32 ημέρες, προτού πέσει κάτω από το όριο ανίχνευσης (Bell *et al.* 1995).

Όσον αφορά τον εμβολιασμό με *Listeria monocytogenes*, λόγω του όξινου περιβάλλοντος που είχε δημιουργηθεί, παρουσιάστηκε μία ταχεία πτώση την 3<sup>η</sup> κιάλας μέρα, και εν συνεχεία υπήρξε μία ομαλή πτωτική τάση μέχρι την 28<sup>η</sup> ημέρα όπου βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σε παρόμοιο πείραμα που διεξήχθη για να μελετηθεί πόσο επηρεάζει η βιοποικιλότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* σε σαλάτα με μαριναρισμένα θαλασσινά, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των βακτηρίων σε συνδυασμό με το μαρινάρισμα και την χαμηλή θερμοκρασία (4 °C) θέτει ένα αποτελεσματικό εμπόδιο στην ανεπιθύμητη ανάπτυξη του παθογόνου, και κατ'έκταση μειώνει σε σύντομο χρονικό διάστημα τα επίπεδα του πληθυσμού του (Andrighetto *et al.* 2008).

Διαδεδομένη επιμόλυνση των τροφίμων είναι και η μόλυνση από *Salmonella Enteritidis*. Το οξυνισμένο περιβάλλον δεν βοήθησε στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και σε συνδυασμό με την χαμηλή θερμοκρασία των 4 °C, ο πληθυσμός της μειώθηκε αισθητά την 7<sup>η</sup> ημέρα και την 28<sup>η</sup> ημέρα έπεσε κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σαλάτα με μαριναρισμένα θαλασσινά, οι μικροβιολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι ο πληθυσμός του *Salmonella Enteritidis* δεν ανιχνεύθηκε πάνω από το όριο των 2 log cfu/g, λόγω του όξινου περιβάλλοντος που δημιουργήθηκε από το μαρινάριμα (Hecer 2011).

Η παρουσία αιθέριων ελαίων, και στην προκειμένη περίπτωση θυμάρι, ενήργησε ευεργετικά στην ποιότητα των δειγμάτων, καθώς αδρανοποίησε ταχύτερα το πληθυσμό των παθογόνων βακτηρίων και κατ'επέκταση αύξησε τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Σε σύγκριση με τα δείγματα χωρίς έλαιο, παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά στο πληθυσμό των παθογόνων στην πάροδο του χρόνου, αφού αυτός έπεφτε κάτω από το όριο ανίχνευσης μία εβδομάδα νωρίτερα, με τον *Staphylococcus aureus* να αποδεικνύεται πιο οξυάντοχος. Σύμφωνα με μία παρόμοια μελέτη σε δείγματα τσιπούρας (*Sparus aurata*) με την παρουσία θυμαριού, τα συμπεράσματα συμφωνούν απόλυτα με το παρών πείραμα, αφού η παρουσία του ήταν ευεργετική στην ποιότητα του τροφίμου και είχε θετική επίδραση στην αισθητική ποιότητα των δειγμάτων (Ozyurt *et al.* 2011).

Σε παρόμοιο πείραμα αλλά με παρουσία αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου παρατηρήθηκαν σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα με ελάχιστες διαφοροποιήσεις.

Ομοίως σε φιλέτα γαλοπούλας, το μαρινάρισμα με αιθέρια έλαια ήταν αποτελεσματικό μέσο επιβραδύνσεως της οξειδωσης των λιπιδίων. Τα δείγματα με την παρουσία θυμαριού είχε τις χαμηλότερες τιμές TBA (triobarbitaric acid), πτητικών συστατικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα αιθέρια έλαια, μπορούν να αξιοποιηθούν σε μαριναρισμένο θερμικά επεξεργασμένο κρέας γαλοπούλας για τη πρόληψη τάγγισης κατά την αποθήκευση (Mielnik *et al.* 2007).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οξίνιση του γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella sp.* δεν μπορούν να αναπτυχθούν και ο πληθυσμός τους μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου. Κατά την διάρκεια της οξίνισης (μαρινάρισμα), οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αδρανοποιούνται με διαφορετικούς ρυθμούς, με το *Staphylococcus aureus* να αποδεικνύεται το περισσότερο οξυάντοχο, και αντιθέτως τη *Salmonella sp.* το λιγότερο. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η παρουσία αιθέριου ελαίου (θυμάρι), μειώνει ακόμα πιο γρήγορα το πληθυσμό των παθογόνων, λόγω της αντιμικροβιακής του δράσης, βελτιώνοντας έτσι την ασφάλεια του προϊόντος.



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Andrighetto C., Lombardi A., Ferrati M., Guidi A., Corrain C., Arcangeli G.,** (2008). Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Control, Elsevier Science.
- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.** (2008). Biological effects of essentials oils- A review. Food and Chemical Toxicology, Elsevier Science, **46**: p.446-475.
- **Baratta M.T., Dorman H.J., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Ruberto G.** (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal, **13**: p.235-244.
- **Bell R.G., Penney N., Moorhead S.M.** (1995). Growth of the psychrotrophic pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on smoked blue cod (*Papapercis colias*) packed under vacuum or carbon dioxide. International Journal of Food Science and Technology, **30**: p.515-521.
- **Bhowmik P., Prasanta K. B., Tapas K. H., Rituparna D., Pradipto S. and Ramamurthy T.** (2009). Pathogenic potential of *Aeromonas hydrophila* isolated from surface waters in Kolkata, India. Journal of Medical Microbiology, **58**: p.1549-1558.

- **Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J.M.** (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: p.481-484.
- **Boziaris I.S., Kordila A., Neofitou C.** (2011). Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**: p.887-895.
- **Burt** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*, **93**: p.223-253.
- **Cormac G.M., Gahan, C.H.** (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, **50**: p.93-100.
- **Davies A., Cristopher C., Jehanno D., Nychas G., Kirby R.** (2001). Incidence of foodborne pathogens on European. *Food Control*, **12**: p.67-71.
- **Feldhusen F.** (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, p.1651-1660.
- **Frimodt C.** (1995). Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. p.215.
- **Gandhi M., Chikindas M.L.,** (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, **113**: p.1-15.
- **Gould G.W. ed.** (1989). *Mechanisms of Action of Food Preservation Producers*. Elsevier Science Publishers, UK.

- **Gounadaki A., Skandamis P.N., Drosinos, E.H., Nychas G.-J.E.** (2007). Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. *Journal of Food Protection*, **70**: p.2313-2320.
- **Gram L., Huss H.H.** (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: p. 121-137.
- **Hecer C.** (2011). Changes in chemical, microbiological and sensory properties of marinated seafood salad during storage period. *African Journal of Agricultural Research*, **6**(22): p.5087-5090.
- **Horner W.F.A.,** (1992). Presentation of fish by curing (drying, salting and smoking). In G.M. Hall (Ed.), *Fish Processing Technology* (1<sup>st</sup> Ed.) Blackie Academic and Professional, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, p.31-71.
- **Hudson J.A., Mott S.J.** (1993). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology*, **10**: p.61-68.
- **Huis in't Veld** (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier Science B.V., **33**: p.1-18.
- **Janda J.M., Abbott S.L.** (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **23**(1): p.35-73.
- **Kilinc B., Cakli S.** (2004). Determination of the shelf life of sardine (*Sardina pilchardus*) marinades in tomato sauce stored at 4 °C. *Food Control*, **16**: p.639-644.

- **Koutsoumanis K.P., Sofos J.N.** (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. Letters in Applied Microbiology 2004, **38**: p.321-326.
- **Kreuzer R.** (1971). Fish inspection and quality control. London.
- **Lupin M., Boeri L., Moschiar M.,** (1981). Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. Journal of Food Technology, **16**: p.31-38.
- **Malekzadeh F., Alberti C., Nouraei M., Vahedi H., Zaccaria I.,** (2009). Crohn's Disease and Early Exposure to Domestic Refrigeration. 4(1):e4288.
- **Mejlholm O., Dalgaard P.** (2001). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Letters in Applied Microbiology, **34**: p.27-31.
- **Mielnik M.B., Sem S., Egelanddal B., Skrede G.,** (2007). By-products from herbs essential oil production as ingredient in marinade for turkey thighs. Institute of Chemistry, Biotechnology and Food Science, **41**: p.93-100.
- **Naidoo K., Lindsay D.** (2009). Survival of *Listeria monocytogenes* and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong-manufacturing processes. Food Control, **21**(7): p.1042-1050.
- **Ozyurt G., Ozkutuk A.S., Polat A.,** (2011). Capability of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the oxidative stability of cooked sea bream (*Sparus aurata*) during frozen storage. Journal of Consumer Protection and Food Safety, **6**: p.167-174.

- **Perry R.D., Fetherston J.D.** (1997). *Yersinia pestis*-Etiologic Agent of Plague. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**(1): p.35-66.
- **Roberts T.A., (Chairman), Baird-Parker A.C., Tompkin R.B.** (1996). *ICMSF Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*, Blackie Academic & Professional.
- **Shotts E.B., Rilmer R.** (1973). Medium for the Isolation of *Aeromonas hydrophila* . *Applied and Environmental Microbiology*, **26**(4): p.550-553.
- **Stergiou K.I., Cristou E.D., Georgakopoulos A.Z., Souvermezoglou C.** (1997). The Hellenic Seas: physics, chemistry, biology and fisheries. *Oceanography Marine Biology: an Annual Review*, **35**: p.415-538.
- **Tatini S.R., Wasela W.D., Jezeski J.J., Morris H.A.** (1973). Production of Staphylococcal enterotoxin A in blue, break, Mozerrella and Swiss cheeses. *J. Dairy Science*, **56**: p.429-435.
- **Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N.R., Nogueira M.F., Saraiva A., Nunes M.L.** (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, **43**: p. 587– 595.
- **Whitehead P.J.P.** (1990). Engraulididae. p. 228-229. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post, and L. Saldanha (eds). *Checklist of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFENTA)* JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 1.

## 6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- **Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Τζούρος Η.Ν.,** (2004). Επιλογή, Συντήρηση και Μεταχείριση Τροφίμων. Οδηγός Καταναλωτή για Ασφαλή Μεταχείριση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη: 145-147.
- **Ανανιάδη Κ.,** (1961). Θαλασσινή Εγκυκλοπαίδεια, Τόμος Γ, Αθήνα, σελ. 436.
- **Γεωργάκης Σ., Βαρελτζής Κ., Αμβροσιάδης Ι.,** (2000). Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης (εκτός γάλακτος και των προϊόντων του). Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.
- **Μακρυγιάννης Α.,** (2011). Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την ωρίμανση και αποθήκευση αλατισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*). Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Μποζιάρης Ι.** (2009). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 127-131.
- **Σάββα Μ.** (2010). Μικροβιακή χλωρίδα των γονάδων του αχινού και η επίδρασή της στον εμπορικό χρόνο ζωής κατά την συντήρησή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

### 6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- <http://www.fishbase.org> (2013)
- <http://www.oxoid.com> (2011)

### ABSTRACT

In the present study the fate of *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteridis during acidification and storage of marinated anchovy was monitored, with or without the presence of rosemary essential oil. The anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) was purchased from the local market of Volos. Then, the anchovy was washed, gutted and de-headed. Also the central bone and the tail were removed. Subsequently filleted and then was added the solution of 6% acetic acid and 2% NaCl to effect the process of acidification.

The acidified product was placed in plastic containers in portions of 100 g, essential oil was added in concentrations of 0,4 % v/w fish, inoculated with *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteridis, with initial population level of about  $10^6$  cfu/g., and subsequently covered with 100 ml of sunflower oil. Finally, the containers were stored at 4 °C for 31 days. Enumeration of *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteridis in Baird-Parker, CFC, VRBGA, Palcam and XLD respectively, was carried out. Populations of lactic acid bacteria in MRS, yeasts-fungi in RBC, enterobacteria in VRBGA and the total population in TSA, were also monitored.

During storage of anchovy with and without the presence of rosemary, the population of yeast-fungi firstly were 3 log cfu/g and by the 7<sup>th</sup> day under the limit of 1 log cfu/g, of lactic acid was never found over the limit of 1 log cfu/g, while the this one of enterobacteria firstly was of the order of 4 and 3 log cfu/g respectively, and by the 14<sup>th</sup> day and after remained below the limit of measurement of 1 log cfu/g. The total population which measured in TSA started from 2 log cfu/g, was increased on 7<sup>th</sup> day to 5 and 4,3 log cfu/g respectively, until 31<sup>st</sup> day falls below the detection limit of 2 log cfu/g. In the samples without the presence of the essential oil of rosemary, the population of five pathogenic microorganisms found below the detection of 2 log cfu/g on 28<sup>th</sup> day. Conversely, in the samples with the presence of rosemary, the population of Salmonella Enteritidis found below the limit of 2 log cfu / g on 17<sup>th</sup> day, that of Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila and Yersinia enterocolitica at 21<sup>st</sup> day, while the population of Staphylococcus aureus on the 24<sup>th</sup> day . In conclusion, the use of rosemary accelerate the elimination of pathogenic microorganisms.

**Keywords:** marination, acidification, anchovies, essential oils, rosemary, Staphylococcus, Aeromonas, Listeria, Yersinia, Salmonella