



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

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ  
ΣΕ ΜΥΔΙΑ ΠΟΥ ΣΥΣΚΕΥΑΣΘΗΚΑΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ  
ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΨΥΞΗ  
ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*»**

**ΤΟΥ**

**ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ του ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ  
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΟΥ ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**



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

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ  
ΣΕ ΜΥΔΙΑ ΠΟΥ ΣΥΣΚΕΥΑΣΘΗΚΑΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ  
ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΨΥΞΗ  
ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*»**

**ΤΟΥ**

**ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ του ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ  
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΟΥ ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

## **Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

*Στη σύζυγό μου Κασσιανή  
Στα παιδιά μου Αναστάση, Ζωή & Ηλία*

**Μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μύδια που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη και κατά του *Vibrio parahaemolyticus***

**Περίληψη**

Τα μύδια αποτελούν μία πολύ δημοφιλή τροφή, λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας και της ιδιαίτερης γεύσης τους. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα ευαλλοιώτα τρόφιμα με περιορισμένο χρόνο ζωής που δεν υπερβαίνει τις 6 ημέρες, κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη. Για το λόγο αυτό διάφορες νέες μέθοδοι έχουν μελετηθεί για την επιμήκυνση του χρόνου ζωής των μυδιών. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης διαθέτει ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση και τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτενώς η χρήση του σε διάφορα τρόφιμα για την αύξηση του χρόνου συντήρησής τους, ως εναλλακτικό των χημικών συντηρητικών.

Επιπλέον, τα μύδια εμπλέκονται συχνά στη πρόκληση τροφιμογενών νόσων. Μεταξύ των κυριότερων τροφιμογενών παθογόνων που εμπλέκονται σε παγκόσμιο επίπεδο είναι το *Vibrio parahaemolyticus*. Τα τελευταία χρόνια, κυρίως εξαιτίας κλιματικών αλλαγών αλλά και άλλων παραγόντων, αναφέρεται η απομόνωση του παθογόνου και σε περιοχές που μέχρι σήμερα ήταν σπάνια η παρουσία του, όπως την Ευρώπη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του συνδυασμού της συσκευασίας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και της προσθήκης αιθέριου ελαίου (ΑΕ) ρίγανης σε μύδια κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη και κατά του *V. parahaemolyticus*.

Μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες με την προσθήκη αιθέριου ελαίου (ΑΕ) ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2% (AIROR) και χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (AIRCON) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (N<sub>2</sub> 30% - CO<sub>2</sub> 70%) με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% (MAPOR) και χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (MAPCON). Κάθε ημέρα πραγματοποιούνταν σε όλα τα δείγματα, οργανοληπτικός έλεγχος (οσμή, γεύση, συνολική αποδοχή). Επίσης, κάθε 2 ημέρες και μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C, πραγματοποιούνταν μικροβιολογικός έλεγχος, που περιελάμβανε τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των *Enterobacteriaceae*, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *V. parahaemolyticus* που ενοφθαλμίστηκε (περίπου 4 log cfu/g).

Τα δείγματα AIRCON παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα, ενώ τα δείγματα AIROR, MAPCON και MAPOR παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 12<sup>η</sup>, 13<sup>η</sup> και 18<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους, αντίστοιχα. Τα δείγματα της ομάδας που συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και με την προσθήκη του ΑΕ ρίγανης 0,2% (MAPOR) παρουσίασαν σημαντικά μικρότερους ( $P < 0,05$ ) πληθυσμούς της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες δειγμάτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Το ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2% παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus* από τη 2<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη.

Λέξεις – κλειδιά : Μύδια, αιθέριο έλαιο ρίγανης, συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, *V. parahaemolyticus*

**Study of the antimicrobial effect of oregano essential oil and Modified Atmosphere Packaging on mussels (*Mytilus galloprovincialis*) during refrigerated storage and against *Vibrio parahaemolyticus***

**Abstract**

Mussels are a popular food due to their high nutritional value, delicate flavor and relatively low cost. However, mussels are highly perishable foods with a limited shelf life during refrigerated storage (5-6 days). As a result additional preservation methods have been investigated for the extension of mussels' shelf-life. Oregano essential oil has been traditionally used in seafood as flavouring. Many recent studies have shown its strong antimicrobial activity against important foodborne pathogens.

*Vibrio parahaemolyticus* is a ubiquitous Gram-negative bacterial pathogen that naturally occurs in marine coastal waters and is recognized as the most common causative agent of seafood - associated gastroenteritis, worldwide. Shellfish that are frequently consumed whole and raw can serve as carriers of pathogenic vibrios. Especially, bivalves (oysters, clams and mussels), which filter water through their digestive system to obtain food, accumulate and concentrate pathogenic microorganisms.

Aim of this work was to study the antimicrobial effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on mussels during refrigerated storage and against *V. parahaemolyticus*.

Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were packed aerobically with the addition of oregano EO at 0.2% (AIROR) or without the addition of the essential oil (AIRCON) and under modified atmosphere conditions (N<sub>2</sub> 30% - CO<sub>2</sub> 70%) with the addition of oregano EO at 0,2 % (MAPOR) or without the addition of the essential oil (MAPCON). Initially, the organoleptic effect of the addition of oregano EO was evaluated. Results showed that mussels with the addition of the oregano EO up to 0.2% were organoleptically acceptable. Microbiological analysis of all the samples was made at 2 days intervals up to the end of their storage, for the enumeration of Total Viable Count (TVC), psychrophilic bacteria, Lactic Acid Bacteria (LAB), Enterobacteriaceae and *V. parahaemolyticus*, which was inoculated (ca 4 log cfu / g).

The samples AIRCON remained organoleptically acceptable until the 6th day, while samples AIROR, MAPCON and MAPOR remained organoleptically acceptable until the 12th, 13th and 18th day of refrigerated storage, respectively. The samples which were packaged in modified atmosphere with the addition of oregano EO 0.2% (MAPOR) showed significantly lower ( $P<0,05$ ) populations for TVC, psychrophilic bacteria and *Enterobacteriaceae* compared with the other samples during their storage at 4 ° C. The oregano EO in a concentration of 0.2% showed a strong antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus* from the second day, until the end of the refrigerated storage.

**Key – words :** mussels, oregano essential oil, modified atmosphere packaging, *V. parahaemolyticus*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

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

## ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	2

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΤΑ ΜΥΔΙΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ

1.1	ΓΕΝΙΚΑ	3
1.1.1	ΤΑ ΜΑΛΑΚΙΑ (MOLLUSCA)	3
1.1.2	ΜΥΔΙΑ ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	4
1.1.3	ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ	4
1.1.4	ΕΙΔΗ ΜΥΔΙΩΝ	7
1.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΔΙΩΝ	7
1.3	ΤΟ ΜΥΔΙ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ	8
1.4	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΥΔΙΩΝ	9

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ *V. PARAHAEMOLYTICUS* ΣΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΙΙΕΥΜΑΤΩΝ

2.1	ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	11
2.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i>	11
2.3	ΚΑΤΑΝΟΜΗ	12
2.4	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	12
2.5	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	14
2.6	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	16
2.7	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	18
2.8	ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i>	19
2.9	ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	21
2.10	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	21
2.10.1	ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	22



2.10.2	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.10.3	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
2.11	ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ	25
2.12	Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ ΣΗΜΕΡΑ	25

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ**

3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	27
3.2	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΕΣ	29
3.2.1	ΓΕΝΙΚΑ	29
3.2.2	ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΙΩΝ	30
3.2.3	ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	32
3.2.4	ΥΛΙΚΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ	32
3.2.5	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΜΤΗΜΑΤΑ	33
3.3	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΕΣ	35
3.3.1	ΓΕΝΙΚΑ	35
3.3.2	ΨΑΡΙΑ	37
3.3.3	ΚΕΦΑΛΟΠΟΔΑ – ΟΣΤΡΑΚΟΕΙΔΗ – ΓΑΣΤΕΡΟΠΟΔΑ	38
3.3.4	ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ	39
3.3.5	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑ ΣΤΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ	39
3.3.6	ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	40

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ**

4.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	42
4.2	ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	42
4.3	ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	43
4.4	ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ	45
4.4.1	ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ	46
4.4.2	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ	48
4.4.3	ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ	48
4.5	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ	49
4.6	ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ	50

## **ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

5.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	51
5.2	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	52
5.3	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	53
5.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	54

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

6.1	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	55
6.2	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	56
6.2.1	AIRCON	56
6.2.2	AIROR	57
6.2.3	MARCON	59
6.2.4	MAROR	60

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** 65

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

8.1	ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67
8.2	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77
8.3	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	78

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντά μου, Καθηγητή κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση του τόσο ιδιαίτερου και ενδιαφέροντος θέματος.

Ευχαριστώ ολόθερμα τους Επίκουρους καθηγητές, κ. Πεξará Ανδρεάνα και κ. Σολωμάκο Νικόλαο, μέλη της τριμελούς Επιτροπής μου, για τη διαρκή και ακούραστη στήριξή τους, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και εύστοχες παρατηρήσεις τους, τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματισμών όσο και κατά τη συγγραφή της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς :

Τη Διεύθυνση και το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη φιλοξενία στο χώρο τους αλλά και τη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της ΝΑ Πιερίας, για την παρέμβαση και τη βοήθειά τους στην εξασφάλιση της απαραίτητης ποσότητας μυδιών από μυδοκαλλιέργεια της περιοχής ευθύνης τους.

Την εταιρεία ΕΚΟΦΑΡΜ ΕΛΛΑΣ ΑΒΕΕ για την ευγενική χορήγηση της ποσότητας του αιθέριου ελαίου ρίγανης που χρησιμοποιήθηκε.

Τη Διεύθυνση Υγειονομικού του Γενικού Επιτελείου Στρατού για την ευκαιρία που μου παρείχε να παρακολουθήσω το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστώ από καρδιάς, τη σύζυγό μου Κασσιανή Πλατή και τα τρία παιδιά μας Αναστάση, Ζωή και Ηλία, για την υπομονή που επέδειξαν αλλά και τη συμπαράσταση με τα χαμόγελά τους...

## Πίνακας διαγραμμάτων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Διάγραμμα 1 :	Αριθμός περιστατικών που ανακοινώθηκαν στο RASFF τα έτη 1997 – 2008 και αφορούσαν παρουσία <i>Vibrio</i> spp & <i>V. parahaemolyticus</i> σε τρόφιμα	25
Διάγραμμα 2 :	Μεταβολή των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), σε δείγματα μυδιών ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη	62
Διάγραμμα 3 :	Μεταβολή των πληθυσμών των Ψυχρόφιλων βακτηρίων, σε δείγματα μυδιών ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη.	63
Διάγραμμα 4 :	Μεταβολή των πληθυσμών των Enterobacteriaceae, σε δείγματα μυδιών ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη	63
Διάγραμμα 5 :	Μεταβολή των πληθυσμών του <i>V. parahaemolyticus</i> , σε δείγματα μυδιών ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη	64
Διάγραμμα 6 :	Μεταβολή των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε δείγματα μυδιών ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη	64

## Κατάσταση πινάκων

Α/Α	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1 :	Κυριότερα εμπορικά είδη μυδιών	7
Πίνακας 2 :	Κατά κεφαλή κατανάλωση μυδιών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2001 – 2011	7
Πίνακας 3 :	Διαθρεπτική σύσταση μυδιών ανάλογα με την εποχή του έτους	9
Πίνακας 4 :	Σύσταση μυδιών σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία	9
Πίνακας 5 :	Ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του <i>V. parahaemolyticus</i> σε διάφορες θερμοκρασίες	13
Πίνακας 6 :	Ιστορική εξέλιξη των υλικών συσκευασίας	28

# ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μύδια εκτρέφονται σε πολλές περιοχές στον κόσμο και στην Ελλάδα. Η ελληνική μυδοκαλλιέργεια αποτελεί σημαντική οικονομική και επαγγελματική δραστηριότητα, στο χώρο της Βόρειας Ελλάδας και κυρίως στην περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου. (Goulas et al, 2005).

Τα μύδια είναι μία πολύ δημοφιλής τροφή, ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η υψηλή θρεπτική τους αξία, η λεπτή και ιδιαίτερη γεύση τους, αλλά και το σχετικά χαμηλό κόστος (Goulas, 2008). Εκτός, όμως από θρεπτική αξία, αποτελούν και εύγεστη τροφή. Χαρακτηριστικά των μυδιών όπως ο υψηλός συντελεστής ενεργότητας νερού ( $a_w > 0,95$ ), η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο και ελεύθερα αμινοξέα και το υψηλό pH (6,7 – 7,1), αφενός τα καθιστούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, αφετέρου περιορίζουν πολύ τη διάρκεια ζωής τους.

Τα δίθυρα μαλάκια φυσιολογικά διηθούν το νερό με τα βράγχια τους, ώστε να κατακρατήσουν την τροφή τους, που αποτελείται κυρίως από φυτοπλαγκτόν. Παράλληλα όμως κατακρατούν βακτήρια, σωματίδια, οργανικές ουσίες και υλικά αποδόμησης, διαδραματίζοντας έναν προστατευτικό ρόλο κατά της μόλυνσης σε πολλές παράκτιες περιοχές (Συμεωνίδης, 2010). Αυτή όμως η ιδιότητά τους, μπορεί να τα καταστήσει επικίνδυνα για την υγεία των καταναλωτών, λόγω της βιοσυσσώρευσης επικίνδυνων χημικών ουσιών και ρυπαντών αλλά και της συγκέντρωσης παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα οστρακοειδή αποτελούν ένα από τα συχνότερα αίτια πρόκλησης τροφικών δηλητηριάσεων σε παγκόσμια κλίμακα. Μεταξύ των παραγόντων που δύνανται να προκαλέσουν τροφιμογενή λοίμωξη από κατανάλωση οστρακοειδών είναι το *Vibrio parahaemolyticus*. Πρόκειται για μη σπορογόνο Gram αρνητικό βακτηρίδιο, προαιρετικά αναερόβιο. Ενδημεί σε υδάτινα οικοσυστήματα. Είναι αλόφιλο βακτήριο, που για την καλύτερη ανάπτυξή του, απαιτεί συγκεντρώσεις NaCl 1 – 3% (Solomakos et al, 2012). Κατανάλωση ωμών ή ατελώς θερμικά επεξεργασμένων, μολυσμένων με *V. parahaemolyticus* οστρακοειδών, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη οξείας γαστρεντερίτιδας η οποία χαρακτηρίζεται από διάρροια, πονοκέφαλο, εμετό, ναυτία, κοιλιακούς πόνους και χαμηλό πυρετό.

Η συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού ποικίλλει στις διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο. Στις ασιατικές χώρες, ήταν και παραμένει να είναι ο σημαντικότερος αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης τροφιμογενών λοιμώξεων από αλιεύματα, ενώ στις ΗΠΑ, αποτελεί σήμερα το κυριότερο αίτιο τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας που σχετίζεται με την κατανάλωση αλιευμάτων. Ωστόσο, στην Ευρώπη μόλις τα τελευταία 15 χρόνια αναφέρονται ουσιαστικά κρούσματα τροφικών λοιμώξεων από το παθογόνο, ενώ η παρουσία του σε ψάρια και αλιεύματα έχει αναφερθεί σε μελέτες που

πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου, μεταξύ των οποίων στην Ελλάδα, την Ιταλία, την Ισπανία και την Τουρκία. Τέλος, η εμφάνιση και εξάπλωση πανδημικών στελεχών του μικροοργανισμού σε όλον τον κόσμο, σε συνδυασμό με την μη ύπαρξη μικροβιολογικών κριτηρίων για τον προσδιορισμό του μικροοργανισμού στην κείμενη νομοθεσία (ΕΚ 1441 / 2007), εγείρει την ανησυχία της ακαδημαϊκής κοινότητας, σχετικά με την εμφάνιση τροφιμογενών δηλητηριάσεων λόγω της κατανάλωσης αλιευμάτων.

Με σκοπό την επιμήκυνση του χρόνου ζωής των μυδιών, αλλά και της προσφοράς ασφαλών προϊόντων στο καταναλωτικό κοινό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες όπως, κάπνιση, κονσερβοποίηση, προσθήκη συντηρητικών (σορβικό κάλιο), κατάψυξη κλπ. Ωστόσο, η αυξημένη απαίτηση του καταναλωτή για ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και εφαρμογή μοντέρνων μεθόδων όπως η προσθήκη φυσικών αντιβακτηριακών ουσιών και η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του συνδυασμού προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης και συσκευασίας σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε μύδια και κατά του *Vibrio parahaemolyticus*, κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΤΑ ΜΥΔΙΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ

## 1.1 ΓΕΝΙΚΑ

### 1.1.1 ΤΑ ΜΑΛΑΚΙΑ (*MOLLUSCA*)

Τα μαλάκια αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα φύλα του ζωικού βασιλείου με περισσότερα από 45.000 είδη. Είναι ζωικοί οργανισμοί, το σώμα των περισσότερων περικλείεται από όστρεο. Τα περισσότερα εμπορεύσιμα είδη είναι τα μύδια (*Mytilidae*), τα στρείδια (*Ostreidae*), τα χτένια (*Pectinidae*), τα κυδώνια (*Cardidae*), οι αχιβάδες (*Venus*), οι γαρίδες (*Penaeidae*), τα καλαμάρια (*Loliginidae*) και τα χταπόδια (*Octapodidae*) (Βαρελτζής, 1999). Ο όρος αναφέρεται σε ζώα τα οποία φέρουν μαλακό σώμα, αν και τα περισσότερα καλύπτονται από σκληρό κέλυφος. Πρόκειται για φύλο με μεγάλη εξάπλωση, τα μέλη του οποίου έχουν διεισδύσει σε όλα τα περιβάλλοντα (Λαζαρίδου, 1992).

Γενικά, τα μαλάκια παρουσιάζουν αμφίπλευρη συμμετρία, που δευτερογενώς έχει μετατραπεί σε ασυμμετρία. Δεν εμφανίζουν μεταμέρεια και το κοίλωμα έχει περιοριστεί και περιβάλλει την καρδιά. Το σωματικό τοίχωμα είναι μαλακό και μυώδες, ενώ το κοιλιακό έχει μετατραπεί σε μυώδες όργανο, το πόδι, που χρησιμεύει για τη μετακίνηση του ζώου. Το νωτιαίο σωματικό τοίχωμα προεκτείνεται και σχηματίζει πτυχή, το μανδύα, που εκκρίνει το κέλυφος (Λαζαρίδου, 1992).

Μία από τις 7 κλάσεις των μαλακίων, είναι τα δίθυρα μαλάκια. Τα περισσότερα δίθυρα μαλάκια είναι θαλάσσια είδη και απαντώνται σε όλα τα βάθη, πάνω ή μέσα σε διάφορα υποστρώματα (επιβενθικά ή ενδοβενθικά ζώα). Συνήθως, κυριαρχούν σε ρηχά νερά και σε βραχώδεις ή αμμώδεις ακτές, ενώ σημαντική είναι η παρουσία τους και σε ιζήματα μακριά από τις ακτές. Υπάρχουν επίσης δίθυρα μαλάκια στις εκβολές των ποταμών. Τέλος, δεν υπάρχουν χερσαία δίθυρα μαλάκια (Συμεωνίδης, 2010).

Τα δίθυρα μαλάκια φέρουν όστρακο αποτελούμενο από δύο θυρίδες, μέσα στις οποίες περικλείονται όλα τα μαλακά μέρη του ζώου. Τα μαλακά μέρη των ζώων αυτών περιλαμβάνουν τα εσωτερικά όργανα των διαφόρων συστημάτων του οργανισμού, όπως το πεπτικό (στόμα, στομάχι, έντερο, έδρα, αδένες του πεπτικού συστήματος), το κυκλοφορικό (καρδιά, αρτηρίες), το νευρικό, τις γονάδες, τα βράγχια και ένα μυώδες όργανο, το πόδι σε σχήμα πέλεκυ, με το οποίο το ζώο μετακινείται και σκάβει στον πυθμένα της θάλασσας (Gosling, 2003). Όλα τα μαλακά μέρη, περιβάλλονται από μία μεμβράνη σε μορφή σάκου που ονομάζεται μανδύας. Ο μανδύας αυτός έχει δίλοβο σχήμα και εκκρίνει  $\text{CaCO}_3$ , για να σχηματιστούν οι δύο θυρίδες του οστράκου. Στο πίσω μέρος, ο μανδύας σχηματίζει συνήθως ένα διπλό σύστημα σωλήνων εισόδου και εξόδου του νερού, τους σίφωνες (siphons). Τα δίθυρα μαλάκια διηθούν το νερό με τα βράγχια, κατακρατώντας την τροφή τους που αποτελείται κυρίως από φυτοπλαγκτόν, βακτήρια, σωματίδια, οργανικές ουσίες και υλικά αποδόμησης (Συμεωνίδης, 2010).

Οι κυριότεροι αντιπρόσωποι είναι τα μύδια, τα στρείδια, τα χτένια, οι γυαλιστερές και τα κυδώνια (Ντόντου, 2013).



### 1.1.2 ΜΥΔΙΑ (*Mytilus galloprovincialis*)

Τα μύδια, κυρίως τα είδη *Mytilus edulis* και *Mytilus galloprovincialis*, εκτρέφονται σε πολλές περιοχές στον κόσμο και στην Ελλάδα. Στη συνέχεια θα αναφερόμαστε μόνο στο είδος *Mytilus galloprovincialis*, η ταξονομική θέση του οποίου, σύμφωνα με τον Vaught, (1989) έχει ως εξής :

Φύλο	: <i>Mollusca</i>
Κλάση	: <i>Bivalvia</i>
Τάξη	: <i>Mytilloida</i>
Υπόταξη	: <i>Mytilacea</i>
Οικογένεια	: <i>Mytilidae</i>
Γένος	: <i>Mytilus</i>
Είδος	: <i>Mytilus galloprovincialis</i> / <i>Mytilus edulis</i>

Συνήθως απαντάται στη Μεσόγειο θάλασσα και στη Μαύρη θάλασσα, όπως επίσης και ανάμεσα σε πληθυσμούς του *M. edulis* στον Ατλαντικό ωκεανό, κατά μήκος των ακτών της Ισπανίας, της Γαλλίας, της Βρετανίας και της Ιρλανδίας. Αποτελεί κυρίαρχο είδος στα θαλάσσια οικοσυστήματα της Μεσογείου και η εξάπλωσή του αρχίζει από τη μεσοπαραλιακή ζώνη και φτάνει μέχρι το βάθος των 17 μέτρων (Συμεωνίδης, 2010).

### 1.1.3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΥΔΙΩΝ

#### Κέλυφος – Μανδύας – Μύες

Εξωτερικά το *Mytilus galloprovincialis* είναι μαύρο ή μπλε σκοτεινό και εσωτερικά μαύρο γυαλιστερό με ζωηρές μπλε ανταύγειες. Το ζώο μέσα στο όστρακο έχει κίτρινο χρώμα. Το όστρακο αποτελείται από 2 κόγχες συμμετρικές και ίσες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με έναν ελαστικό σύνδεσμο που ελέγχει το άνοιγμα του κελύφους, το δε κλείσιμο ελέγχεται από 2 προσαγωγούς μύες (Μουρατίδου, 2005).

Το σώμα του μυδιού αποτελείται από το σπλαχνικό σάκο, που περικλείει τα περισσότερα όργανα (πεπτικό σωλήνα, καρδιά, ηπατοπάγκρεας, γεννητικούς αδένες) και το πόδι, ενώ στερείται κεφαλιού (Μουρατίδου, 2005). Διαθέτουν δίλοβο μανδύα. Η εξωτερική επιφάνεια των μανδυακών λοβών προσκολλάται στην εσωτερική επιφάνεια των θυρίδων, όπου τα όρια των λοβών διαγράφονται με μία γραμμή που ονομάζεται μανδυακό αποτύπωμα. Ο μανδύας σχηματίζει δύο σίφωνες από όπου μπαίνει και βγαίνει το νερό. Ο μανδύας εκκρίνει ασβεστολιθικά στρώματα για το σχηματισμό του όστρακου (Λαζαρίδου, 1992).

#### Κινητικό σύστημα

Το πόδι τους, είναι μία σαρκώδης μάζα σε σχήμα πέλεκυ, που χρησιμεύει για τη μετακίνηση του ζώου. Επίσης, φέρει αδένες που εκκρίνουν στην αρχή μια γλοιώδη ουσία, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε ανθεκτικά νήματα, με τη βοήθεια των οποίων προσκολλάται στα διάφορα στερεά αντικείμενα. Η δέσμη αυτή των νημάτων λέγεται

βύσσος. Για να αποκολληθεί ένα μύδι από ένα στερεό αντικείμενο πρέπει να αποκοπεί η βύσσος. Το μύδι όταν αποκολληθεί μπορεί εκ νέου να προσκολληθεί σε άλλο αντικείμενο με την έκκριση νέας βύσσου (Λαζαρίδου, 1992).

### **Πεπτικό Σύστημα**

Ο πεπτικός σωλήνας περιλαμβάνει το στόμα, το φάρυγγα, ένα μικρό οισοφάγο, το στομάχι και το έντερο το οποίο καταλήγει στην έδρα (Μουρατίδου 2005, Λαζαρίδου 1992). Γύρω από τον οισοφάγο υπάρχει το ήπαρ, το οποίο υποβοηθά τη πέψη (Παπουτσόγλου, 1997). Το στόμα τους, που δεν έχει όργανα μασήσεως και ξύστρου, περιβάλλεται από φυλλοειδείς κεραίες που πάλλονται και διευκολύνουν έτσι την είσοδο στην στοματική κοιλότητα του θαλάσσιου ύδατος που περιέχει θρεπτικές ουσίες (Μουρατίδου, 2005). Η εσωτερική επιφάνεια του μανδύα, η οποία καλύπτει τα βράγχια, καλύπτεται από βλεφαρίδες οι οποίες κινούμενες δημιουργούν ένα γρήγορο ρεύμα νερού. Οι βλεφαρίδες χρησιμοποιούνται για την συλλογή τροφής (Λαζαρίδου, 1992).

Το μύδι είναι διηθηματοφάγος οργανισμός, τρέφεται με φυτοπλακτονικούς οργανισμούς σε διαστάσεις μικρότερους των 5μm, οι οποίοι διηθούνται από το θαλάσσιο νερό με τα βράγχια. Τα βράγχια για το λόγο αυτό είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένα εφόσον εκτελούν διπλό προορισμό, δηλαδή το βασικό της αναπνοής και της σύλληψης της τροφής. Έχει υπολογιστεί ότι το μύδι είναι δυνατό να διηθήσει 2 έως 5 περίπου λίτρα νερό την ώρα (Bardach et al, 1972).

### **Απεκκριτικό σύστημα**

Όλα τα δίθυρα φέρουν ένα ζεύγος μετανεφριδίων, η απεκκριτική οπή των οποίων βρίσκεται στη μανδυακή κοιλότητα. Το άλλο άκρο τους, το νεφροστόμιο βρίσκεται στη περικαρδιακή κοιλότητα. Είναι στενά συνδεδεμένα με το κυκλοφορικό σύστημα (Λαζαρίδου, 1992).

### **Αναπνευστικό Σύστημα**

Μεταξύ μανδύα και σπλαχνικού σάκου, υπάρχει η μανδυακή κοιλότητα, που περιλαμβάνει το αναπνευστικό σύστημα του ζώου. Αυτό αποτελείται από 4 βράγχια σε σχήμα ημισέλων, που καλύπτουν το 75% του μήκους του σώματος. Με το άνοιγμα των θυρίδων, το νερό περνά στα βράγχια μέσω σχισμών του μανδύα, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη διατροφή και αναπνοή του μυδιού. Χάρη στα συνεχή χτυπήματα των βλεφαρίδων των βραγχίων, που δρουν ως φίλτρο, κατακρατείται η τροφή (Μουρατίδου, 2005).

### **Κυκλοφορικό Σύστημα**

Μέσα στην περικαρδιακή κοιλότητα βρίσκεται η καρδιά, που αποτελείται από δύο κόλπους και μία κοιλία. Το αίμα φέρεται με μία πρόσθια και μία οπίσθια αορτή από την καρδιά στα διάφορα μέρη του σώματος (Λαζαρίδου, 1992).

## Νευρικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από τα εγκεφαλικά γάγγλια, που με νευρικά σχοινιά συνδέονται με τα ποδικά και τα σπλαγχνικά γάγγλια (Λαζαρίδου, 1992).

## Γεννητικό σύστημα

Τα δίθυρα είναι γονοχωριστικά. Τα γεννητικά όργανα του αρσενικού και του θηλυκού βρίσκονται στις πλευρές του ήπατος ή περιβάλλουν το έντερο και σχηματίζουν δύο μεγάλους λοβούς (Seed, 1969).

Το θηλυκό άτομο απελευθερώνει 5 – 10 εκατομμύρια ωάρια / έτος, η γονιμοποίηση των οποίων, πραγματοποιείται στο θαλάσσιο περιβάλλον από τα σπερματοζωάρια του αρρενος ατόμου, σε θερμοκρασία 10 – 20° C (Μουρατίδου, 2005). Σχετικά με τον βιολογικό κύκλο του *M. galloprovincialis*, υπάρχουν δύο απόψεις. Η πρώτη αναφέρει ότι εμφανίζει δύο αναπαραγωγικές περιόδους, άνοιξη και φθινόπωρο και η δεύτερη ότι μπορεί να αναπαράγεται συνεχώς, εκεί όπου η θερμοκρασία του νερού δεν πέφτει κάτω από 6°C (Συμεωνίδης, 2010, Seed, 1969).

## Ανάπτυξη

Ο ρυθμός ανάπτυξης των μυδιών ορίζεται ως η επί τοις % αύξηση του μεγέθους στη μονάδα του χρόνου και εξαρτάται από :

- Τη γενετική τους σύσταση.
- Το στάδιο ανάπτυξης του ζώου (μέγεθος, ηλικία).
- Την ποιότητα και διαθεσιμότητα της τροφής.
- Το ρυθμό διήθησης του νερού.
- Αβιοτικούς παράγοντες (φωτισμός, θερμοκρασία, αλατότητα, οξυγόνο, pH, θρεπτικά συστατικά, τοπογραφία βυθού).

Το βέλτιστο εύρος τιμών pH στο οποίο αυξάνεται χωρίς προβλήματα είναι 7,5 – 8,1. Επιβιώνει και αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος αλατότητας (5 – 35 ‰), ενώ το βέλτιστο εύρος είναι 25 – 35 ‰. (Μουρατίδου, 2005). Τέλος, σχετικά με τις συνθήκες θερμοκρασίας, η μέγιστη ανάπτυξη των μυδιών πραγματοποιείται στους 15 – 19° C.

Μία σημαντική λειτουργία των δίθυρων μαλακίων, είναι ότι διηθούν το νερό με τα βράγχια, κατακρατώντας την τροφή τους που αποτελείται κυρίως από φυτοπλαγκτόν. Παράλληλα όμως κατακρατούν βακτήρια, σωματίδια, οργανικές ουσίες και υλικά αποδόμησης. Έτσι, διαδραματίζουν έναν προστατευτικό ρόλο κατά της μόλυνσης σε πολλές παράκτιες περιοχές ενώ, παράλληλα, χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιτυχία ως βιολογικοί δείκτες μόλυνσης (bioindicator), καθώς φιλτράρουν τεράστιες ποσότητες νερού (Συμεωνίδης, 2010). Αυτή η ιδιότητά τους, μπορεί να τα καταστήσει επικίνδυνα, λόγω της συγκέντρωσης παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και βιοσυσσώρευσης επικίνδυνων χημικών ουσιών και ρυπαντών.

#### 1.1.4 ΕΙΔΗ ΜΥΔΙΩΝ

Τα κυριότερα είδη μυδιών που καλλιεργούνται ή ενδημούν σε διάφορες περιοχές του πλανήτη φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1 :** Κυριότερα εμπορικά είδη μυδιών (προσαρμόστηκε από Duncan, 2003)

Είδος	Κοινή ονομασία	Κύριος τόπος παραγωγής
<i>Mytilus edulis</i>	Μπλε	Ευρώπη/Β. Αμερική/Κίνα
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Μεσογειακό	Ευρώπη/Νότια Αφρική
<i>Mytilus chilensis</i>	Χιλιανό	Χιλή
<i>Perna viridis</i>	Πράσινο	Νοτιοανατολική Ασία
<i>P. perna</i>	Νοτιοαμερικάνικο μύδι των βράχων	Βραζιλία/Βενεζουέλα
<i>P. canaliculus</i>	Νεοζηλανδέζικο μύδι	Ν. Ζηλανδία

Άλλα είδη μυδιών είναι το *Modiolus barbatus* (Χάβαρο ή ξανθό μύδι ή Μούσουλο), το *Volsella modiolus* (μύδι άλογο), το *Volsella demissa* (ραβδωτό μύδι), το *Dreissensia polymorpha* (μύδι του γλυκού νερού), το *Mytilus californicus* κ.α.

## 1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΔΙΩΝ

Είναι γεγονός ότι τα προϊόντα που προέρχονται από τη συλλεκτική αλιεία δεν μπορούν πλέον να ικανοποιήσουν τη ζήτηση που υπάρχει για αυτά, παγκοσμίως. Από 0,7 Kg / έτος το 1970, η κατά κεφαλή κατανάλωση αυτών των προϊόντων αυξήθηκε στα 7,8 Kg το 2006 (Συμεωνίδης, 2010).

Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του FAOSTAT, το 2012 η παραγωγή μυδιών στην Ευρώπη ξεπέρασε τις 500.000 τόνους, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή στην Ελλάδα, κυμάνθηκε γύρω στους 17.500 τόνους. Σύμφωνα με άλλη πηγή, η συνολική παραγωγή των μαλακίων στον Ελλαδικό χώρο, το 2011, ήταν 23.740 τόνους.

**Πίνακας 2 :** Κατά κεφαλή κατανάλωση μυδιών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2001 – 2011 (FAOSTAT, 2013)

Κατά κεφαλή κατανάλωση μυδιών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2001-2011 (Kg/έτος)										
2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
1.40	1.10	1.40	0.70	0.70	0.60	0.60	1.00	0.90	1.50	1.50

Τέλος, η κατά κεφαλή κατανάλωση μυδιών στην Ελλάδα το 2011 ανέρχεται σε 1500 g / έτος, περισσότερο από τα προηγούμενα 12 έτη (FAOSTAT, 2013), κατέχοντας την 9η θέση μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών.

Η ελληνική μυδοκαλλιέργεια, εμφανίζει μεγάλη οικονομική σημασία για τη χώρα μας. Οι κυριότερες περιοχές εκτροφής μυδιών είναι η Αλεξανδρούπολη, το Πόρτο Λάγος, η Κεραμωτή, ο Θερμαϊκός κόλπος, ο Αμβρακικός κόλπος, ο κόλπος της Καλλονής κ.α. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ποσότητα μυδιών, περίπου το 92%, παράγεται στην περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου, στους νομούς Θεσσαλονίκης – Πιερίας (Ντόντου, 2013).

Ο κόλπος του Θερμαϊκού είναι η κατεξοχήν ελληνική τοποθεσία καλλιέργειας των μυδιών. Από το 1980, αποτελεί σημαντική οικονομική και επαγγελματική δραστηριότητα, όπου δραστηριοποιούνται περισσότερες από 200 εκτροφές, (Theodorou et al, 2011). Στην παραγωγή του Μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*), τα δύο συστήματα καλλιέργειας που εφαρμόζονται στην Ελλάδα, είναι οι πλωτές εγκαταστάσεις ('long-lines') και οι πασσαλωτές εγκαταστάσεις ('on-tables'). Και στις δύο περιπτώσεις τα μύδια αναπτύσσονται μέσα σε κυλινδρικά δίχτυα προσκολλημένα αντίστοιχα σε οριζόντια σχοινιά ή οριζόντιους πόλους ή σωλήνες. Η κυριότερη διαφορά τους έγκειται στο βάθος στο οποίο πραγματοποιείται η καλλιέργεια, δεδομένου ότι στις πασσαλωτές εγκαταστάσεις τα μύδια εκτίθενται στον αέρα για μακρά περίοδο. Τέλος, άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι στις πλωτές εγκαταστάσεις η παραγωγή φτάνει τους 100 – 150 τόνους / εκτάριο, ενώ στις πασσαλωτές η παραγωγή αγγίζει τους 500 τόνους / εκτάριο (Karagiannis et al, 2013).

### 1.3 ΤΟ ΜΥΔΙ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ

Τα μύδια είναι μία ιδιαίτερα δημοφιλής τροφή, η παραγωγή της οποίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η υψηλή θρεπτική τους αξία, η λεπτή και ιδιαίτερη γεύση τους, αλλά και το σχετικά χαμηλό κόστος (Goulas, 2008).

Τα μύδια έχουν μια ιδιαίτερη θρεπτική αξία, καθιστώντας τα ιδανικά για την ανθρώπινη διατροφή. Η σάρκα των μυδιών είναι πλούσια σε γλυκογόνο και πρωτεΐνες. Ακόμη, περιέχει πολύτιμα συστατικά απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη του ανθρώπου. Είναι πλούσια σε σελήνιο, σε άλατα ασβεστίου και φωσφόρου, σίδηρο και μαγνήσιο, καθώς και σε βιταμίνες A, C και του συμπλέγματος B (B1, B2, B6, B12). Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι το λίπος των μυδιών είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και μάλιστα το 37 – 48% των συνολικών λιπαρών, είναι ω – 3, τα οποία, σύμφωνα με τους Kromhout et al (1985) σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ωστόσο, όλα τα λιπαρά οξέα των μυδιών, συμβάλλουν στην υγιεινή διατροφή του ανθρώπου (Caglag et al, 2008, Goulas et al, 2005). Τέλος, η συγκέντρωση της χοληστερόλης στη σάρκα των μυδιών, είναι μικρότερη από ότι σε άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Kiriazis – Papadopoulou & Vareltzis, 2003).

Η σύσταση των μυδιών μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή τους έτους. Σύμφωνα με έρευνα των Karakoltsidis et al (1995), η αναλυτική διαθρεπτική σύστασή των μυδιών ανά εποχή, φαίνεται στον Πίνακα 3, ενώ η σύσταση των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 3 :** Διαθρεπτική σύσταση μυδιών ανάλογα με την εποχή του έτους (προσαρμόστηκε από Karakoltsidis et al, 1995)

Εποχή	Πρωτεΐνες %	Λιπαρά %	Υγρασία %	Τέφρα %	Υδατάνθρακες %
Άνοιξη	8	2	87	0,7	2
Φθινόπωρο	13	2	82	2	1
Χειμώνας	11	1	82	1	5

**Πίνακας 4 :** Σύσταση μυδιών σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία (προσαρμόστηκε από Karakoltsidis et al, 1995)

Μέταλλο/Ιχνοστοιχείο	Συγκέντρωση/ Περιεκτικότητα	Μονάδα μέτρησης
<b>K</b>	328 ± 36	mg / 100 g
<b>Ca</b>	88 ± 21	mg / 100 g
<b>Mg</b>	44 ± 10	mg / 100 g
<b>Fe</b>	109 ± 29	ppm
<b>Zn</b>	46 ± 9	ppm
<b>Cu</b>	11 ± 5	ppm
<b>Pb</b>	1 ± 0,2	ppm
<b>Mn</b>	8 ± 2,4	ppm
<b>Ni</b>	7 ± 3,2	ppm
<b>Cr</b>	10 ± 3,2	ppm
<b>Cd</b>	2 ± 0,6	ppm
<b>Co</b>	0,2 ± 0,06	ppm

Σύμφωνα επίσης, με την παραπάνω μελέτη, το συνολικό ποσοστό του εδώδιμου τμήματος των μυδιών σε στερόλες είναι  $121 \pm 1,1$  mg / 100 g. Τέλος, η θερμιδική αξία μαγειρεμένων μυδιών κυμαίνεται σε 103 Kcal / 100 g τροφής (Anonymous, 2012).

Εκτός, όμως από θρεπτική, αποτελούν και εύγεστη τροφή. Είναι ένα εξαιρετικό έδεσμα, που μπορούν να μαγειρευτούν και να προσφερθούν με ποικίλους τρόπους.

#### 1.4 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΥΔΙΩΝ

Τα μύδια διακινούνται συνήθως νωπά, με ή χωρίς κέλυφος, και αποτελούν ιδιαίτερα ευαλλοίωτα προϊόντα. Η υποβάθμιση των μυδιών, όπως και όλων των τροφίμων, μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των μυδιών μέχρι και της κατανάλωσης του προϊόντος (Pastoriza et al, 2004).

Χαρακτηριστικά των μυδιών όπως, ο υψηλός συντελεστής ενεργότητας νερού ( $a_w > 0,95$ ), η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο και ελεύθερα αμινοξέα και το υψηλό pH (6,7 – 7,1), τα καθιστούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, η διάρκεια ζωής τους, συντηρημένων υπό ψύξη είναι περίπου 4 ημέρες (Kiriazi

– Papadopoulou & Vareltzis, 2003) ενώ σε καμία περίπτωση δεν υπερβαίνει τις 6-7 ημέρες σε θερμοκρασίες ψύξης (Goulas et al, 2005).

Διάφοροι είναι οι τρόποι με τους οποίους τα μύδια μπορούν να καταστούν μολυσμένα, τοξινογόνα ή λοιμογόνα. Πιο συγκεκριμένα, οι τρόποι αυτοί, σύμφωνα με τον Kaysner (1999), είναι :

- Με την πρόσληψη τοξινών ή/και παθογόνων μικροοργανισμών από το φυσικό περιβάλλον τους.
- Με την έκθεσή τους στο φυσικό περιβάλλον σε ανθρώπινα απόβλητα, ή απόβλητα ζωικής κοπρανόδους προέλευσης καθώς και σε χημικούς ρυπαντές.
- Με την έκθεσή τους σε επιμολυσμένο περιβάλλον ή εξοπλισμό ή προσωπικό, που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα, κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους.
- Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους σε εγκαταστάσεις παραγωγής και παράθεσης γευμάτων (catering).

Έτσι, δεν είναι λίγα τα παραδείγματα πρόκλησης τροφικών δηλητηριάσεων που οφείλονται σε μύδια και γενικά σε οστρακοειδή. Σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία των υπόψη τροφικών δηλητηριάσεων, διαδραματίζει η συνήθεια να καταναλώνονται ωμά ή με ελάχιστη θερμική επεξεργασία. Οι κυριότεροι και συχνότεροι κίνδυνοι που σχετίζονται με τα μύδια είναι :

- *Salmonella* spp
- *Vibrio* spp (*V. cholera*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*)
- *Aeromonas hydrophila* & *Plesiomonas* spp
- *Listeria monocytogenes*
- *Yersinia* spp
- *Campylobacter* spp
- *Shigella* spp
- *E. coli*
- Ιός της ηπατίτιδας Α
- *Cryptosporidium parvum*
- Θαλάσσιες τοξίνες που παράγονται από δινομαστιγωτά (σαξιτοξίνη, οκαδαϊκό οξύ, δομοϊκό οξύ κλπ)
- Χημικοί ρυπαντές (πχ υδράργυρος, PCB's, )

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η εμφάνιση πανδημικών στελεχών *V. parahaemolyticus*, σε πολλές χώρες της Ασίας, της Αμερικής, αλλά και πρόσφατα της Ευρώπης, εγείρουν την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας, σχετικά με τον υπόψη μικροοργανισμό. Μεταξύ των παγκοσμίως συχνότερων αιτιών τροφικογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με την κατανάλωση μυδιών αλλά και γενικότερα αλιευμάτων, προκαλώντας πρόβλημα στη Δημόσια Υγεία, είναι το *Vibrio parahaemolyticus*.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ *V. PARAHAEMOLYTICUS* ΣΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ

### 2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ιστορία του μικροοργανισμού ξεκινάει το φθινόπωρο του 1950, στην Οσάκα της Ιαπωνίας, οπότε εξαιτίας τροφικής δηλητηρίασης από ημι – αποξηραμένες σαρδέλες, αρρώστησαν 272 άτομα, 20 εκ των οποίων κατέληξαν (Ramamurthy & Nair 2014, Levin, 2006). Στην προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης του αιτιολογικού παράγοντα, απομονώθηκε από τον Tsunesaburo Fujino, ένας μικροοργανισμός, μη ταξινομημένος ως τότε, ο οποίος ονομάστηκε *Pasteurella parahaemolytica*. Αργότερα, και όταν διαπιστώθηκε ότι ο υπόψη μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση NaCl, μετονομάστηκε σε *V. parahaemolyticus* (Broberg et al, 2011).

### 2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ *V. PARAHAEMOLYTICUS*

Το γένος *Vibrio* περιλαμβάνει περισσότερα από 50 είδη, από τα οποία τουλάχιστον τα 11 έχουν μεγάλη κλινική σημασία για τον άνθρωπο (Ramamurthy & Nair 2014, Levin 2006). Μεταξύ αυτών, στα παθογόνα για τον άνθρωπο αναφέρονται τα *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela*, *V. metshnikovii* και το *V. carchariae*. Από τα παθογόνα είδη του γένους *Vibrio*, για τα τρόφιμα, μεγαλύτερη σημασία έχουν τα *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* (Drake et al, 2007).

Το *V. parahaemolyticus* είναι Gram – αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που δεν έχει την ικανότητα να σχηματίζει ενδοσπόρια. Είναι οξειδάση θετικό, καταλάση θετικό και χρησιμοποιεί τη D – γλυκόζη ως μοναδική ή κύρια πηγή άνθρακα και ενέργειας. Επίσης, όπως και άλλα *Vibrio* spp, είναι αλόφιλος μικροοργανισμός, απαιτώντας για την ανάπτυξη του NaCl 1 – 3% (ιδανικά 3 %) (Ramamurthy & Nair 2014, Levin 2006). Το μέγεθός του κυμαίνεται μεταξύ 0,5 – 0,8 μm σε πλάτος και 1,4 – 2,6 μm σε μήκος (Solomakos et al, 2012).

Πρόκειται για μεσόφιλο βάκιλο, ο οποίος μπορεί να έχει μια απλή καμπή στο σχήμα του. Ανάλογα με το στέλεχος, υφίσταται είτε ως κύτταρο που μπορεί να κολυμπάει με τη βοήθεια απλού πολικού μαστιγίου που διαθέτει, είτε ως κύτταρο που έρπει, με τη βοήθεια πλευρικών μαστιγίων (Broberg et al, 2011).

Σχετικά με τις αντιγονικές ιδιότητες του μικροβίου, υπάρχουν 3 κύριες κατηγορίες αντιγόνων, που παράγονται από τα στελέχη του (Levin 2006) :

- Θερμοανθεκτικά σωματικά αντιγόνα (O) (λιποπολυσακχαρίτες)
- Θερμοευαίσθητα αντιγόνα κάψας (K) (όξινοι πολυσακχαρίτες)



- Αντιγόνα μαστιγίου

Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες το *V. parahaemolyticus* μπορεί να παράγει μία κάψα με διαφορετική αντιγονικότητα, όπως ανιχνεύεται στα διάφορα στελέχη. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 12 παθογόνοι ορότυποι (Broberg et al, 2011). Η κύρια βάση της ταξινόμησης των στελεχών *V. parahaemolyticus* είναι ένα σχήμα οροτυποποίησης, το οποίο αποτελεί συνδυασμό των σωματικών αντιγόνων Ο και των αντιγόνων της κάψας Κ και εξαρτάται από τις αντιγονικές ιδιότητές τους. Η οροτυποποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια εμπορικά διαθέσιμων αντιορών. Οι διαθέσιμοι αντιγονικοί τύποι περιλαμβάνουν 11 διαφορετικά σωματικά αντιγόνα και 71 αντιγόνα κάψας (Ramamurthy & Nair 2014). Σε νεότερες έρευνες, έχουν χρησιμοποιηθεί 20 βακτηριοφάγοι εναντίον του μικροοργανισμού, προκειμένου να γίνει η οροτυποποίηση των στελεχών του *V. parahaemolyticus*. Ωστόσο, εξαιτίας της χαμηλής ειδικότητας της μεθόδου, δε χρησιμοποιείται ευρέως. Πρόσφατα, μάλιστα, μια ποικιλία μοριακών τεχνικών τυποποίησης, όπως ribotyping, PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) και MLST (multilocus sequence typing), έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη μελέτη και την επιδημιολογία του μικροοργανισμού (Nair et al, 2007).

## 2.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Το *V. parahaemolyticus*, είναι ευρύτατα διαδεδομένο παγκοσμίως. Θεωρείται ότι ενδημεί σε εκβολές ποταμών και ανευρίσκεται σε υφάλμυρα νερά και υδάτινα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένου ιζημάτων, αιωρούμενων σωματιδίων και πλαγκτόν (Levin, 2006). Η κατανομή του μικροβίου στα υδάτινα οικοσυστήματα, σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία τους. Σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι το βακτήριο δεν ανιχνεύεται όταν η θερμοκρασία του νερού είναι χαμηλότερη των 15° C, παρά μόνο παραμένει σε αδρανή φάση στο ίζημα. Όταν η θερμοκρασία ανέλθει πάνω από τους 15° C, παρατηρείται απελευθέρωση του μικροοργανισμού από το ίζημα στο νερό και αρχίζει ο πολλαπλασιασμός του (Su & Liu, 2007).

Επίσης, απομονώνεται από ψάρια όπως σκουμπρί, σαρδέλες, μπακαλιάρο, κεφαλόποδα όπως πχ χταπόδια αλλά και οστρακοειδή, όπως στρείδια, γαρίδες, μύδια, και καβούρια (Bisha et al, 2012). Ειδικά τα δίθυρα μαλάκια, λόγω της φυσιολογικής λειτουργίας τους να διηθούν το νερό για να κατακρατούν την τροφή τους, βιοσυσσωρεύουν διάφορους επιμολυντές, όπως βακτήρια, ιούς, παράσιτα, βαρέα μέταλλα κλπ. Έτσι, μπορούν να βρεθούν και μεγάλοι πληθυσμοί φυσικά ευρισκόμενων στελεχών *V. parahaemolyticus*, η κατανάλωση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε τροφικές λοιμώξεις (Pomykala et al, 2012).

## 2.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

### ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Το *V. parahaemolyticus*, όπως αναφέρθηκε ενδημεί σε υδάτινα οικοσυστήματα. Η θερμοκρασία των υδάτων διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξή του. Όταν η

θερμοκρασία του νερού παραμένει πάνω από τους 15° C, ο μικροοργανισμός ανιχνεύεται καθόλη τη διάρκεια του έτους, και μάλιστα ο πληθυσμός του στο νερό, το ίζημα αλλά και τα αλιεύματα, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού (Broberg et al, 2011). Σε μελέτη των De Paola et al (1990), διαπιστώθηκε ότι ενώ η πυκνότητα του βακίλου στο νερό ήταν 4 κύτταρα/100 ml σε θερμοκρασία ύδατος < 16° C, αυτή ανερχόταν στα 1000 κύτταρα/100 ml, όταν η θερμοκρασία ανέρχονταν στους 25° C.

Το εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus*, κυμαίνεται μεταξύ 9 – 10° C η μικρότερη, μέχρι 44° C η μεγαλύτερη (Levin, 2006), με ιδανικές θερμοκρασίες τους 30–35° C (Jay et al, 2005). Τέλος, σύμφωνα με τους Solomakos et al (2012), στη θερμοκρασία των 37° C, ο χρόνος διπλασιασμού είναι μικρότερος από 10 min.

## pH

Το *V. parahaemolyticus* μπορεί να αναπτυχθεί σε pH που κυμαίνεται από την περιοχή του ουδέτερου έως αλκαλικό. Για το λόγο αυτόν, τα καλλιεργητικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως εμπλουτιστικά και εκλεκτικά, έχουν τιμή pH μεταξύ 8 – 8,8 (Ramamurthy & Nair 2014).

Τα ιδανικά όρια pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι 7,6 – 8,6 ενώ οι ακραίες τιμές ανάπτυξης είναι 4,8 – 11,0. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία του, όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 5 (Jay et al, 2005).

**Πίνακας 5 :** Ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* σε διάφορες θερμοκρασίες (προσαρμόστηκε από Jay et al, 2005).

	Ελάχιστο pH ανάπτυξης σε συγκέντρωση NaCl	
Θερμοκρασία (° C)	3%	7%
5	7,3	7,6
9	7,2	7,1
13	5,2	6,0
21	4,9	5,3
30	4,8	5,2

## ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΟΣ ( $a_w$ )

Η επιβίωση και ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με συγκεκριμένο συντελεστή ενεργότητας νερού, εξαρτάται επίσης, από την περιεκτικότητα του περιβάλλοντος σε NaCl. Σύμφωνα με τους David et al (1998), στελέχη του *V. parahaemolyticus* αναπτύσσονταν σε ένα εύρος τιμών  $a_w$  μεταξύ 0,936 έως 0,995, όταν η συγκέντρωση του NaCl ήταν μεταξύ 9,6 – 0,4% αντίστοιχα, με ιδανική ανάπτυξη μεταξύ 0,982 – 0,987. Μάλιστα, σε τιμή  $a_w$  = 0,995, η ανάπτυξη γίνονταν με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με την ανάπτυξη στις ιδανικές συνθήκες (Miles et al, 1997). Η άριστη τιμή  $a_w$ , στην οποία παρουσιάζεται ο μικρότερος χρόνος διπλασιασμού, είναι 0,992, όταν η συγκέντρωση του NaCl είναι 2,9% (Jay et al, 2005).

## ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ NaCl

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρόκειται για αλόφιλο μικροοργανισμό. Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του, απαιτεί ιδανικά, επίπεδα αλατότητας 1 – 3%, όπως άλλωστε είναι η συγκέντρωση του NaCl στα θαλασσινά νερά (Bisha et al, 2012). Ωστόσο, αναφέρεται (Yang et al, 2010) ότι μπορεί να επιβιώσει μέχρι συγκέντρωση άλατος 8%, ενώ δεν μπορεί να επιζήσει σε αποσταγμένο νερό (Jay et al, 2005).

## ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ

Το *V. parahaemolyticus* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Μπορεί να αναπτύσσεται τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου, αλλά η ανάπτυξη ευνοείται κάτω από αερόβιες συνθήκες.

## 2.5 ΕΠΙΒΙΩΣΗ

### ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

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). Το *V. parahaemolyticus* είναι θερμοευαίσθητο. Η τιμή D του μικροοργανισμού έχει βρεθεί ότι είναι 1,75 min στους 55° C. *In vitro*, ο πληθυσμός του μειώνεται κατά τουλάχιστον 7 δεκαδικούς λογαρίθμους στους 70° C για 2 min (Johnston and Brown, 2002), ενώ σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι αδρανοποιείται στους 47° C. Η θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου στην ίδια θερμοκρασία αυξάνεται, όταν προηγουμένως επέλθει θερμικό σοκ στους 42° C για 30 min (Drake et al, 2007).

*In vivo*, οι Andrews et al (2000), διαπίστωσαν 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.

### ΨΥΞΗ

Σε συνθήκες συντήρησης σε θερμοκρασίες ψύξης, διαπιστώθηκε ότι ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται κάτω από τους 10° C (Drake et al, 2007). Σε έρευνα των Thompson and Vanderzant (1976) αναφέρεται ότι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε αποφλοιωμένα στρείδια, ο πληθυσμός μειώθηκε από 411,000 σε 0.36 MPN/g μετά από 7 ημέρες στους 3° C.

## ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Η συντήρηση του *V. parahaemolyticus* στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , όταν συντηρείται σε BHI broth, εμπλουτισμένο με 3% NaCl, μειώνει τον πληθυσμό κατά 1 μόλις δεκαδικό λογάριθμο, κατά τη διάρκεια της συντήρησής του για 35 ημέρες (Drake et al, 2007).

Στα οστρακοειδή, η κατάψυξη μειώνει τα επίπεδα των *Vibrio* spp, χωρίς ωστόσο να εξαλείφει το μικροοργανισμό, ακόμη και μετά από 12 εβδομάδες. Ο ISSC θεωρεί την κατάψυξη και τη συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, ικανοποιητικές για τον έλεγχο του δονακίου, μετά τη συλλογή οστρακοειδών. Ωστόσο, ο πληθυσμός τους, δεν εξαλείφεται πλήρως.

## ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΟΣ ( $a_w$ )

Η αλόφιλη φύση του μικροοργανισμού, το καθιστά ανθεκτικό σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού. Σύμφωνα με τους Yang et al (2008), η επιβίωση και ανάπτυξη παθογόνων στελεχών του υπόψη μικροοργανισμού, σε αποξηραμένα και αλατισμένα αλιεύματα τα οποία συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες αποτελεί καθοριστικό κίνδυνο για την ασφάλεια του τροφίμου αλλά και της Δημόσιας Υγείας.

## ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Επεξεργασία στρειδιών με ακτινοβολία X, ελέγχει γενικά τα παθογόνα βακτήρια και παρατείνει τη διάρκεια ζωής του τροφίμου. Επίπεδα ακτινοβολίας 1 – 5 kGy, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συγκέντρωση του *V. parahaemolyticus* αλλά και της φυσιολογικής χλωρίδας στρειδιών, σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, χαμηλότερα του 1 log cfu/g (Ramamurthy & Nair 2014).

Επίσης, η  $\gamma$  – ακτινοβολία, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του μικροοργανισμού σε οστρακοειδή, δεδομένου ότι τα είδη των δονακίων είναι μεταξύ των πλέον ραδιο – ευαίσθητων μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τους Matches and Liston (1971), στις περισσότερες περιπτώσεις, δόση 0,3 – 0,4 kGy, μείωσε τους πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* κατά 4 – 6 log. Επίσης, αναφέρεται ότι η δράση  $\gamma$  – ακτινοβολίας σε επίπεδο 1,5 kGy, μείωσε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πληθυσμούς  $10^4$  cfu/g του πανδημικού στελέχους *V. parahaemolyticus* O3 : K6. Οι Su & Liu (2007), αναφέρουν ότι χαμηλές δόσεις  $\gamma$  – ακτινοβολίας ( $< 3$  kGy) δε θανατώνουν τα στρείδια και δεν επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ενώ μειώνουν τους συνολικούς πληθυσμούς των μικροοργανισμών κατά 99%. Σύμφωνα με τους Drake et al (2007), ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – FDA), επέτρεψε την ακτινοβολήση ως πρόσθετο στα αλιεύματα.

## ΥΨΗΛΗ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (ΥΥΠ)

Η Υψηλή Υδροστατική Πίεση, είναι μία μη θερμική επεξεργασία, η οποία χρησιμοποιείται για τη θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών και την επιμήκυνση του χρόνου ζωής σε τρόφιμα, χωρίς να επιφέρει αλλαγές στα θρεπτικά συστατικά, τη γεύση

και την εμφάνισή τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η YYΠ ήταν αποτελεσματική στην αδρανοποίηση του *V. parahaemolyticus* (Ramamurthy & Nair 2014, Su & Liu, 2007). Γενικά, όλα τα *Vibrio* spp, είναι ευαίσθητα στη δράση της YYΠ (Drake et al, 2007). Η προτεινόμενη διαδικασία προβλέπει επίπεδα μεγαλύτερα από 350 MPa για χρονικό διάστημα 120 sec, 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). Πολλοί ερευνητές συμφωνούν ότι, το αντίστοιχο στέλεχος O3:K6, έχει αναφερθεί ότι είναι περισσότερο ανθεκτικό στην επίδραση της YYΠ και συγκεκριμένα για να επιτευχθεί το παραπάνω καταστρεπτικό αποτέλεσμα απαιτείται χρόνος δράσης 180 sec σε πίεση 300 MPa (Ramamurthy & Nair 2014, Drake et al, 2007, Su & Liu 2007) .

## 2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ιστορικά, τα είδη του *V. parahaemolyticus* ταξινομούνται με βάση τον ορότυπό τους. Πιο πρόσφατα η ταξινόμηση βασίζεται στην παρουσία ειδικών γονιδίων, εκ των οποίων ορισμένα συσχετίζονται με παθογονικότητα. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν οι κυριότεροι παράγοντες μολυσματικότητας του *V. parahaemolyticus* (Drake et al, 2007).

Τα παθογόνα στελέχη του *V. parahaemolyticus* χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων μολυσματικότητας (Solomakos et al, 2012). Σύμφωνα με τον Levin (2006), τουλάχιστον 5 διαφορετικά είδη αιμολυσινών, αναφέρεται ότι έχουν βρεθεί να παράγονται από στελέχη του *V. parahaemolyticus* και συγκεκριμένα :

- Άμεση θερμοανθεκτική αιμολυσίνη (TDH)
- Θερμοευαίσθητη σχετική – TDH (TRH)
- Θερμοευαίσθητη άμεση αιμολυσίνη
- Φωσφολιπάση A
- Λυσοφωσφολιπάση

Επίσης, το *V. parahaemolyticus* παράγει μία λεκιθινάση και μία γλυκεροφωσφορυλοχολίνη διεστεράση.

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).

Η παραπάνω αντίδραση των KP+ στελεχών είναι απόρροια της ύπαρξης της άμεσης θερμοανθεκτικής αιμολυσίνης (thermostable direct hemolysin – TDH). Πρόκειται για μια διμερή πρωτεΐνη, MB 44000 daltons, ανθεκτική σε θέρμανση σε θερμοκρασία 100° C για 10 min, ενώ έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται από την παρουσία Ca<sup>++</sup> (Levin, 2006). Η δράση της αιμολυσίνης δεν περιορίζεται μόνο στη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αποδείχθηκε ότι εμφανίζει κυτταροτοξική αλλά και εντεροτοξινογόνο δράση (Ham & Orth, 2012).

Σύμφωνα με τους Jay et al (2005), τα περισσότερα παθογόνα στελέχη που απομονώνονται είναι KP +, ενώ τα περισσότερα απαθογόνα στελέχη, είναι KP -. Επίσης, μόνο το 1% των στελεχών που απομονώνονται από τη θάλασσα και το 100 % των στελεχών που απομονώνονται από ασθενείς με γαστρεντερίτιδα εξαιτίας του *V. parahaemolyticus*, είναι KP+. 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).

Πολλά KP - στελέχη, παράγουν μια άλλη θερμοευαίσθητη αιμολυσίνη (TRH). Οι Solomakos et al (2012), αναφέρουν ότι, περιστασιακά, KP- στελέχη, έχουν απομονωθεί από περιστατικά γαστρεντερίτιδας σχετιζόμενα με την κατανάλωση αλιευμάτων. Τα στελέχη αυτά παράγουν την αιμολυσίνη TRH, αποδίδοντας έτσι λοιμογόνο ικανότητα και σε αυτήν. Η πρωτεΐνη αυτή, είναι παρόμοια, όχι όμως πανομοιότυπη με την TDH. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Ham and Orth (2012), η ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των 2 πρωτεϊνών, είναι 68%.

Η παραγωγή των δύο παραπάνω αιμολυσινών TDH και TRH, οι οποίες θεωρούνται οι κυριότεροι γνωστοί παράγοντες μολυσματικότητας, κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *tdh* και *trh* (Yang et al, 2008). Τα γονίδια αυτά αποτελούν πλέον τους κύριους δείκτες παθογονικότητας των στελεχών του *V. parahaemolyticus* (Jones et al, 2012). Ωστόσο, σε πρόσφατη έρευνα σχετικά με τα παθογόνα αποτελέσματα μεμονωμένων παραγόντων, διαπιστώθηκε ότι η διαγραφή του γονιδίου *tdh* δεν επηρέασε την κυτταροτοξικότητα του στελέχους, δείχνοντας ότι στη λοιμογόνο ικανότητα του μικροοργανισμού περιλαμβάνονται κι άλλοι παράγοντες, εκτός από την παρουσία των γονιδίων *tdh* και *trh*. Στη συνέχεια, ο ρόλος του τύπου III του συστήματος έκκρισης (type III secretion system – T3SS) του *V. parahaemolyticus*, αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας (Jones et al, 2012, Ham & Orth, 2012, Ottavianni et al, 2012).

Ο T3SS αποτελεί ένα οργάνιδιο του κυττάρου, που εμπλέκεται στη διανομή πρωτεϊνών, καλούμενων τελεστών, απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Σύμφωνα με τους Broberg et al (2011), αποτελείται από 20 – 30 πρωτεΐνες και συνίσταται στα εξής :

- Στο βασικό σώμα που εκτείνεται τόσο στην εσωτερική όσο και στις εξωτερικές βακτηριακές μεμβράνες
- Σε μία βελόνα, η οποία δρα ως αγωγός μεταξύ βακτηριακού και ευκαρυωτικού κυττάρου, και
- Σε έναν πόρο, ο οποίος εισάγεται μέσα στο ευκαρυωτικό κύτταρο

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.

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

περιγραφτεί 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).

Ακόμη, πρέπει να αναφερθεί ότι όλα τα στελέχη του *V. parahaemolyticus* μπορούν να παράγουν μια θερμοευαίσθητη αιμολυσίνη, η παραγωγή της οποίας κωδικοποιείται από το γονίδιο *lht*, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει παθογόνο ικανότητα κατά του ξενιστή (Bisha et al, 2012).

Σύμφωνα με τους Su & Liu (2007), σε έρευνα που έγινε, διαπιστώθηκε ότι στελέχη τα οποία δεν παρήγαγαν TDH και TRH, προκάλεσαν τη συσσώρευση υγρών σε θηλάζοντα ποντίκια. Πρόσφατα, μια άλλη θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη (πρωτεάση της σερίνης), θεωρήθηκε παράγοντας μολυσματικότητας, σε στελέχη τα οποία την παρήγαγαν αλλά δε διέθεταν τα γονίδια *tdh* και *trh*.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η πλήρης ανάλυση του γενώματος του *V. parahaemolyticus* ανέδειξε περισσότερο πολύπλοκους μηχανισμούς παθογένειας απ' ό τι ήταν γνωστό μέχρι τότε. Η μεγάλη ικανότητα προσκόλλησης, ορισμένα ένζυμα, η υδρόλυση της ουρίας από την ουρεάση και πιο πρόσφατα μια θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη (πρωτεάση της σερίνης) αλλά και ο μηχανισμός δέσμευσης των ιόντων Fe με το σιδηροφόρο vibrioferrin, επιτείνουν ακόμη περισσότερο το πολύπλοκο πρόβλημα της παθογένειας του *V. parahaemolyticus* (Solomakos et al, 2012, Bisha et al, 2012, Broberg et al, 2011).

Ωστόσο, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν, με τα σημερινά δεδομένα, ότι η TDH, η TRH και οι T3SSs, είναι οι κυριότεροι μηχανισμοί πρόκλησης παθογένειας του *V. parahaemolyticus*.

## 2.7 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η μόλυνση με το *V. parahaemolyticus* μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση 3 ξεχωριστών ιατρικών καταστάσεων (Ramamurthy & Nair 2014) :

- γαστρεντερίτιδα
- μόλυνση των ανοικτών πληγών
- σηψαιμία

Η μόλυνση ανοικτών πληγών, είναι πολύ συχνή σε ψαράδες και πραγματοποιείται όταν μικρές πληγές δημιουργούνται μέσα ή γύρω από το θαλασσινό νερό. Ο τύπος αυτής της μόλυνσης, συνήθως περιορίζεται σε κυτταρίτιδα, προοδευτικά όμως, μπορεί να μετατραπεί σε νεκρωτική απονευρωσίτιδα, μια ασυνήθιστη λοίμωξη των μαλακών ιστών, η οποία χαρακτηρίζεται από ταχεία εξάπλωση των βακτηρίων με ταυτόχρονη φλεγμονή και νέκρωση των ιστών (Broberg et al, 2011), ειδικά σε ασθενείς με κάποιο υποκείμενο νόσημα, όπως χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδη διαβήτη κ.α. (Ramamurthy & Nair 2014). Επίσης, εκτός από μόλυνση των πληγών ο Levin (2006), αναφέρει περιπτώσεις μόλυνσης των άκρων, των αυτιών και των ματιών. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Su & Liu (2007), αναφέρθηκαν 2 θάνατοι μεταξύ 3 περιπτώσεων από

μόλυνση πληγών από το *V. parahaemolyticus* στη Λουιζιάνα και στο Μισισσιπή, μετά τον τυφώνα Κατρίνα, το 2005.

Σηψαιμία μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις που το δονάκιο εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια μεταφέρεται σε όλον τον οργανισμό. Η συστηματική ανοσολογική ενεργοποίηση του οργανισμού, οδηγεί στη φλεγμονή και στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, που με τη σειρά της οδηγεί σε ολιγαιμικό σοκ, πολυσυστηματική ανεπάρκεια οργάνων και θάνατο. Υποκείμενα ιατρικά προβλήματα, όπως καρκίνος, σακχαρώδης διαβήτης, ηπατοπάθειες και ανοσοκατασταλτικές καταστάσεις, προδιαθέτουν και στην περίπτωση της σηψαιμίας (Broberg et al, 2011).

Η άμεση διάγνωση και η κατάλληλη αντιβιοθεραπεία 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).

Όμως, τα συχνότερα προβλήματα που παρουσιάζονται εξαιτίας του *V. parahaemolyticus* υπόψη μικροβίου, είναι η ήπιας μορφής οξεία γαστρεντερίτιδα. Θεωρείται σύμφωνα με τους Nordstrom et al (2007), ως ο κυριότερος βακτηριακός παράγοντας πρόκλησης ασθένειας που σχετίζεται με την κατανάλωση αλιευμάτων στις ΗΠΑ και σε Ασιατικές χώρες, όπως Ιαπωνία, Ταιβάν και Κίνα (Yang et al, 2008). Πρόκειται για τροφολοίμωξη, η οποία προκαλείται κατά την κατανάλωση ατελώς θερμικά επεξεργασμένων αλιευμάτων και κυρίως οστρακοειδών (στρείδια, μύδια) (Ham & Orth, 2012, Su & Liu, 2007). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Kim et al (2012), η κατανάλωση διαφόρων ψαριών όπως σολωμού σε γεύματα όπως σούσι (sushi) ή σασίμι (sashimi), έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές περιπτώσεις τροφικής λοίμωξης από *V. parahaemolyticus*.

Τα κυριότερα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν τη νόσο, η οποία είναι συνήθως αυτοϊάσιμη είναι κοιλιακές κράμπες, ναυτία, έμετος, χαμηλός πυρετός και διάρροια, πολλές φορές αιματηρή, διαφορετική από αυτές που εμφανίζεται σε άλλες εντερικές λοιμώξεις (Ottavianni, 2012, Broberg, 2011). Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται στις 4 – 96 (συνήθως γύρω στις 15) ώρες, ενώ τα συμπτώματα υποχωρούν, σε λιγότερο από 72 ώρες (Solomakos et al, 2012).

Ο Levin (2006), αναφέρει ότι η μολύνουσα δόση για πρόκληση τροφοδηλητηρίασης, εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του στελέχους. Έτσι, για στελέχη KP + έχει βρεθεί ότι συμπτώματα γαστρεντερίτιδας εμφανίζονται με τη λήψη  $2 \times 10^5$  έως  $3 \times 10^7$  κυττάρων, ενώ η λήψη από εθελοντές πληθυσμού  $1,6 \times 10^{10}$  κυττάρων KP – στελεχών, δεν προκάλεσε συμπτώματα διάρροιας. Ο μηχανισμός πρόκλησης διάρροιας σχετίζεται με τον αποικισμό του εντέρου από το δονάκιο και στη συνέχεια την παραγωγή τοξινών η οποία προκαλεί καταστροφή των κυττάρων και απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών (Solomakos et al, 2012).

## 2.8 ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *V. PARAHAEMOLYTICUS*

Από το 1950 που ανακαλύφθηκε ο μικροοργανισμός και μέχρι περίπου τις αρχές της



δεκαετίας του 1970, κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης εξαιτίας του *V. parahaemolyticus* αναφέρονταν μόνο στις Ασιατικές χώρες. Το 1971, αναφέρθηκε το πρώτο κρούσμα στις ΗΠΑ και στη συνέχεια σποραδικά κρούσματα αναφέρονταν παγκοσμίως σποραδικά. Το μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων εμφανίζονταν κυρίως στις Ασιατικές χώρες, εξαιτίας πιθανότατα της διατροφικής συνήθειας του πληθυσμού σχετικά με τη μεγάλη κατανάλωση ψαριών και ιχθυηρών και μάλιστα ωμών ή ατελώς θερμικά επεξεργασμένων. Σε έρευνα των Chiu et al (2000), αναφέρεται ότι ποσοστό 63,76 % (542/850) των επιδημιών στην Ταϊβάν οφείλονταν στο *V. parahaemolyticus*.

Σε παγκόσμιο επίπεδο λοιπόν, αυτό που διαπιστώθηκε ήταν ότι μέχρι το 1996, οι λοιμώξεις λόγω του *V. parahaemolyticus*, οφείλονταν σε διαφορετικούς ορότυπους του μικροοργανισμού (πχ O1:K38, O3:K29, O4:K8, O3:K6, O2:K3, O4:K8 κ.α.), οι οποίοι παρουσίαζαν μία τοπική κατανομή και εμφανίζονταν σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου, κυρίως τους θερμούς μήνες του χρόνου (Velazquez-Roman et al, 2012).

Όμως, το Φεβρουάριο του 1996, κατά τη διάρκεια επιδημιολογικής διερεύνησης αιτιολογικών παραγόντων διάρροιας σε νοσηλευόμενους ασθενείς στο νοσοκομείο της Καλκούτα, παρατηρήθηκε αύξηση των περιστατικών που οφείλονταν σε *V. parahaemolyticus*. Η οροτυποποίηση των στελεχών, έφερε στο προσκήνιο τον ορότυπο O3:K6, ο οποίος δεν είχε προηγουμένως παρατηρηθεί στην Καλκούτα. Ο συγκεκριμένος ορότυπος εμφάνισε μοναδικά γενοτυπικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα ήταν *tdh* +, *trh* - και ουρεάση -. Ο ίδιος ορότυπος είχε απομονωθεί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, από έναν ταξιδιώτη που επέστρεψε από την Ινδονησία στην Ιαπωνία, το 1995 (Nair et al, 2007). Στα επόμενα χρόνια, παρόμοια στελέχη με αυτά της Καλκούτας, αναφέρθηκαν ως αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων σε κρούσματα στην Νοτιοανατολική Ασία, στις ΗΠΑ και πιο πρόσφατα και στην Ευρώπη (Velazquez-Roman et al, 2012).

Μετά το συμβάν στην Καλκούτα το 1996, ο ορότυπος O3:K6 θεωρήθηκε υπεύθυνος για το 50 – 80 % των λοιμώξεων στο επόμενο διάστημα. Επίσης, στο Ταϊβάν, ενώ η συχνότητα που παρουσιάζονταν το 1995 ήταν μόλις 0,6%, ανήλθε στο 50,1% το 1996 και ξεπέρασε το 83% το 1997 (Nair et al, 2007).

Σε έρευνα του 2005 που έγινε σε Αφρικανική χώρα (Μοζαμβίκη), διαπιστώθηκε ότι το 81 % των στελεχών του *V. parahaemolyticus* που απομονώθηκαν από ασθενείς με κλινικά συμπτώματα, ανήκε σε ορότυπους O3:K6 και O4:K68 (Ansaruzzaman, 2005). Επίσης, στην Αμερική έχουν αναφερθεί επιδημίες με πολλά κρούσματα τα οποία οφείλονταν στον ορότυπο O3 : K6. Συγκεκριμένα, μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου 1998, αναφέρθηκε επιδημία από τον υπόψη ορότυπο, σε κατοίκους της Νέας Υόρκης, του Νιου Τζέρσευ και του Κονέκτικατ, λόγω κατανάλωσης αλιευμάτων τα οποία αλιεύτηκαν στην περιοχή του Long Island Sound. Τροφικές επιδημίες αναφέρθηκαν και στη Χιλή στην περιοχή της Antofagasta, από τέλος 1997 έως αρχές 1998, καθώς και στο Puerto Montt, μια περιοχή με κρύα ύδατα, τους θερινούς μήνες του 2004 και 2005 (Nair et al, 2007). Τέλος, αναφέρεται ότι στην περιοχή της Λατινικής Αμερικής, η πρώτη επιδημία που οφείλονταν στο πανδημικό στέλεχος O3 : K6 στο Μεξικό, παρουσιάστηκε το 2004, με περισσότερα από 1200 κρούσματα (Velazquez-Roman et al, 2012).

Το πρώτο κρούσμα από αλιεύματα που παρήχθησαν στην Ευρώπη, αναφέρθηκε το 2004, στην Ισπανία, με 80 κρούσματα, από τα οποία, εκτός από το πανδημικό στέλεχος O3:K6, απομονώθηκε και ορότυπος O3:KUT. Ως υπεύθυνο τρόφιμο, ενοχοποιήθηκαν

ζωντανά καβούρια, τα οποία μεταφέρθηκαν από το Ηνωμένο Βασίλειο (Martinez-Urtaza et al, 2005).

Τέλος, και άλλοι μη – O3:K6 ορότυποι, ανιχνεύονται παγκοσμίως, φαίνοντας να έχουν πανδημική τάση (Velazquez-Roman, 2012).

## 2.9 ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ

Παραδοσιακά, οι περιπτώσεις τροφικών λοιμώξεων εξαιτίας του *V. parahaemolyticus* ήταν σποραδικές και μάλιστα κυρίως κατά τους θερινούς μήνες του χρόνου σε εύκρατες και τροπικές περιοχές (Bauer et al, 2006). Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζεται μία έξαρση κρουσμάτων τόσο σε αριθμό όσο και σε γεωγραφική εξάπλωση. Αναφορικά, οι κυριότερες αιτίες που εκτιμάται ότι σχετίζονται με το γεγονός αυτό, συνοψίζονται στα παρακάτω :

- Η αύξηση της παραγωγής και της κατανάλωσης των οστρακοειδών, αυξάνει αναλογικά την έκθεση του πληθυσμού σε παθογόνα δονάκια (Gudmundsson et al, 2006).
- Η παγκόσμια κλιματική αλλαγή που λαμβάνει χώρα τα τελευταία χρόνια με χαρακτηριστική την αύξηση της θερμοκρασίας των υδάτινων συλλογών, δημιουργεί ευνοϊκότερες συνθήκες για την επιβίωση των *Vibrio* spp. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί η μεταφορά τεράστιων όγκων θαλασσιών υδάτων, από μια περιοχή σε άλλη, εξαιτίας θερμών ρευμάτων, αυξάνοντας τη θερμοκρασία στις τελευταίες (Martinez – Urtaza et al, 2010, Baker – Austin et al, 2010).
- Η μείωση της αλατότητας των θαλασσών, εξαιτίας φαινομένων πλημμύρων και βροχοπτώσεων, βοηθάει επίσης, την ανάπτυξη του δονακίου σε υφάλμυρα περιβάλλοντα (Garcia et al, 2009).
- Η μεταφορά του παθογόνου παράγοντα με υδρόβια άγρια ζώα και πτηνά, ζωοπλαγκτόν, πλοία κλπ (Niimi 2004, Ruiz et al, 2000).

## 2.10 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία αλλά και ο πληθυσμός του μικροοργανισμού σε τρόφιμα αλλά και σε περιβαλλοντικά δείγματα, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα εργαστηριακών εξετάσεων. Οι μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης του *V. parahaemolyticus*, μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κυρίως κατηγορίες :

- Κλασσικές μέθοδοι
- Ανοσολογικές μέθοδοι
- Μοριακές μέθοδοι

### 2.10.1 ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διάφοροι εκλεκτικοί εμπλουτιστικοί ζωμοί έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση και ανίχνευση του *V. parahaemolyticus*, ως αποτέλεσμα της αναγνώρισής του ως σημαντικό παράγοντα τροφιμογενούς λοίμωξης εξαιτίας της κατανάλωσης αλιευμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη την αλόφιλη φύση του μικροβίου και την ανθεκτικότητά του σε αλκαλικό περιβάλλον, γίνεται προσθήκη NaCl σε επίπεδα 1 -7 % ενώ ρυθμίζεται το pH σε τιμές 8,6 – 9,4 ενισχύοντας την εκλεκτικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθούν επιφανειοδραστικές ουσίες όπως sodium dodecyl sulphate (SDS), χολικά άλατα, χρωστικές και αντιβιοτικά, όπως κολιστίνη ή πολυμυξίνη B (Bisha et al, 2012).

Για την απομόνωση του *V. parahaemolyticus* αλλά και παράλληλα το διαχωρισμό του από το *V. cholerae*, έχει αναπτυχθεί μέθοδος σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο ISO 21782 – 1 (2007). Σύμφωνα με αυτό, λαμβάνει χώρα διπλός εμπλουτισμός σε Alkaline Saline Peptone Water (ASPW) και στη συνέχεια σπορά σε δύο εκλεκτικά στερεά υποστρώματα, εκ των οποίων το ένα από αυτά είναι υποχρεωτικά το Thiosulfate Citrate Bile and Sucrose (TCBS) agar, ενώ η επιλογή του δεύτερου αφήνεται στην ευχέρεια του εργαστηρίου. Στη συνέχεια, οι ύποπτες αποικίες επιβεβαιώνονται με συγκεκριμένες βιοχημικές δοκιμές που περιλαμβάνουν δοκιμή οξειδάσης, παραγωγή αερίου από ζύμωση γλυκόζης, ζύμωση λακτόζης και σουκρόζης, ανίχνευση της αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης και της λυσίνης, ανίχνευση της υδρόλυσης της αργινίνης, ανίχνευση παραγωγής ινδόλης και β-γαλακτοσιδάσης και τέλος, ανθεκτικότητα σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl. Ο περαιτέρω έλεγχος της παθογονικότητας των στελεχών, γίνεται σε εξειδικευμένο εργαστήριο ή κέντρο αναφοράς.

Η μέθοδος του Πλέον Πιθανού Αριθμού (Most Probable Number – MPN), χρησιμοποιείται επίσης, συχνά για την ανίχνευση και καταμέτρηση του υπόψη μικροοργανισμού στα τρόφιμα (Bisha et al, 2012). 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 (Biomérieux), RapID NF Plus System (Remel Inc), Crystal Enteric/Non – Fermenter ID Kit (Becton Dickinson) κλπ. Επιπρόσθετα, αυτοματοποιημένα (VITEK 2 – Biomérieux) ή ημι – αυτοματοποιημένα συστήματα (Omnilog – Biolog), έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών (Su & Liu, 2007).

Πλεονέκτημα των κλασσικών μεθόδων καλλιέργειας, αποτελεί το γεγονός ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα.

Το πρόβλημα της ίδιας μορφολογίας αποικιών του *V. parahaemolyticus* με αποικίες στελεχών *V. mimicus*, *V. vulnificus* κλπ στα στερεά εκλεκτικά υλικά, φαίνεται να

εξαλείφεται με την εμφάνιση και τη χρήση χρωμογόνων υλικών, όπως πχ του Bio-Chrome Vibrio Medium (BCVM) (Su & Liu, 2007).

Μειονέκτημα των κλασσικών μεθόδων, παραμένει η αδυναμία χαρακτηρισμού της παθογονικότητας των στελεχών. Το φαινόμενο Kanagawa (β-αιμόλυση στο αιματούχο υπόστρωμα Wagatsuma), που οφείλεται στη δράση της TDH, αν και αποτέλεσε για πολλά χρόνια τη χρυσή μέθοδο για την ταυτοποίηση παθογόνων στελεχών, πλέον αντικαταστάθηκε από άλλες μεθόδους, εξαιτίας ανακάλυψης νέων δεδομένων που σχετίζονται με την παθογονικότητα των στελεχών του *V. parahaemolyticus* (Bisha et al, 2012).

### 2.10.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων μικροοργανισμών, έχει χρησιμοποιηθεί 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), ενώ και άλλες μοριακές τεχνικές, αναδύονται στο προσκήνιο.

Η ανίχνευση σε μοριακό επίπεδο της παθογονικότητας στελεχών, αποτελεί την πλέον έγκυρη μέθοδο. Έτσι, η άμεση PCR μέθοδος, που στοχεύει στα γονίδια *tdh* και *trh*, μετά από εμπλουτισμό του δείγματος σε APW, αποτελούν τις πιο επιτυχημένες μεθόδους για την ανίχνευση του μικροοργανισμού. Ωστόσο, το κύριο πρόβλημα με αυτές τις τεχνικές που στοχεύουν στα υπόψη γονίδια, είναι ότι κι άλλοι μικροοργανισμοί φέρουν γονίδια και πρωτεΐνες με κοινή ομολογία με αυτές τις τοξίνες (Ramamurthy & Nair 2014). Ακόμη, η ανίχνευση του γονιδίου *lht*, υπεύθυνου για την παραγωγή μιας θερμοευαίσθητης αιμολυσίνης που δεν παρουσιάζει παθογόνο δράση και παράγεται από όλα τα στελέχη του *V. parahaemolyticus*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση όλων των τύπων (παθογόνων και μη παθογόνων) του μικροοργανισμού (Bisha et al, 2012).

Πλεονέκτημα των μοριακών τεχνικών, είναι η μεγάλη ακρίβεια και η υψηλή ευαισθησία τους. Έτσι, είναι δυνατή η ανίχνευση του μικροβίου ακόμη και σε πολύ χαμηλούς πληθυσμούς, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε κρύα νερά. 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). Πάνω στη δυνατότητα της ποσοτικοποίησης του πληθυσμού με μοριακές μεθόδους, εργάστηκαν οι Wang & Levin (2004), αναπτύσσοντας μια διαδικασία PCR, με την οποία μετρούνταν σε πηκτή αгарόζης το επίπεδο φθορισμού που προκαλούνταν από το γονίδιο *trh*. Επίσης, πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της Real Time – PCR, για τον προσδιορισμό του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus*, σε οστρακοειδή και θαλασσινό νερό (Drake et al, 2007).

Τέλος, μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα με μεγάλη επιτυχία στην επιδημιολογία των πανδημικών στελεχών που μονοπώλησαν το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια.

### 2.10.3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι δοκιμές που βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά συγκεκριμένων μικροοργανισμών ή τοξινών, θεωρούνται ακόμη πολύ ειδικές τεχνικές ανίχνευσης και ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* και των τοξινών του. Το 1980 αναπτύχθηκε από τους Honda et al μία μέθοδος ανοσοκαθίζησης, που ονομάστηκε Elek, για την ανίχνευση της TDH, η ευαισθησία της οποίας ήταν παρόμοια με το φαινόμενο Kanagawa (Bisha et al, 2012).

Από τους Honda et al (1989), αναφέρθηκε για πρώτη φορά η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά παθογόνων στελεχών *V. parahaemolyticus*, οι οποίοι ανέπτυξαν μία ανοσοενζυμική τεχνική (ELISA), που παρουσίαζε μεγάλη ευαισθησία στην ταυτοποίηση στελεχών από κλινικά δείγματα, που παρήγαγαν TDH και TRH (Ballamoule et al, 2011). 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).

Τέλος, μία άλλη τεχνική ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση K αντιγόνων, κατά τη διερεύνηση τροφικών δηλητηριάσεων εξαιτίας *V. parahaemolyticus* και η οποία εφαρμόστηκε επιτυχώς στην ταυτοποίηση στελεχών O3:K6 από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Nair et al, 2007).

Σαν συμπέρασμα εκτιμάται ότι το ιδανικό στην ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμό του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus*, θα ήταν ο συνδυασμός διαφόρων μεθόδων. Οι σημερινές στρατηγικές για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού, εμπλέκουν μία ή παραπάνω μεθόδους βασισμένες στις κλασσικές μεθόδους βακτηριολογίας για την απομόνωση και ταυτοποίηση του μικροοργανισμού, ακολουθούμενες από μία μοριακή μέθοδο για την ταυτοποίηση των παθογόνων παραγόντων (Bisha et al, 2012). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει μελέτη Rolec et al (2012), στην οποία προτείνεται η χρήση PCR τεχνικών για διερεύνηση θετικών δειγμάτων αλλά και επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών. Τέλος, σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν οι Di Pinto et al (2012), σχετικά με την εφαρμογή της τεχνικής PCR – ELISA, συνδυάζοντας μία μοριακή με μία ανοσολογική μέθοδο, όπου τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου κατά 100 φορές.

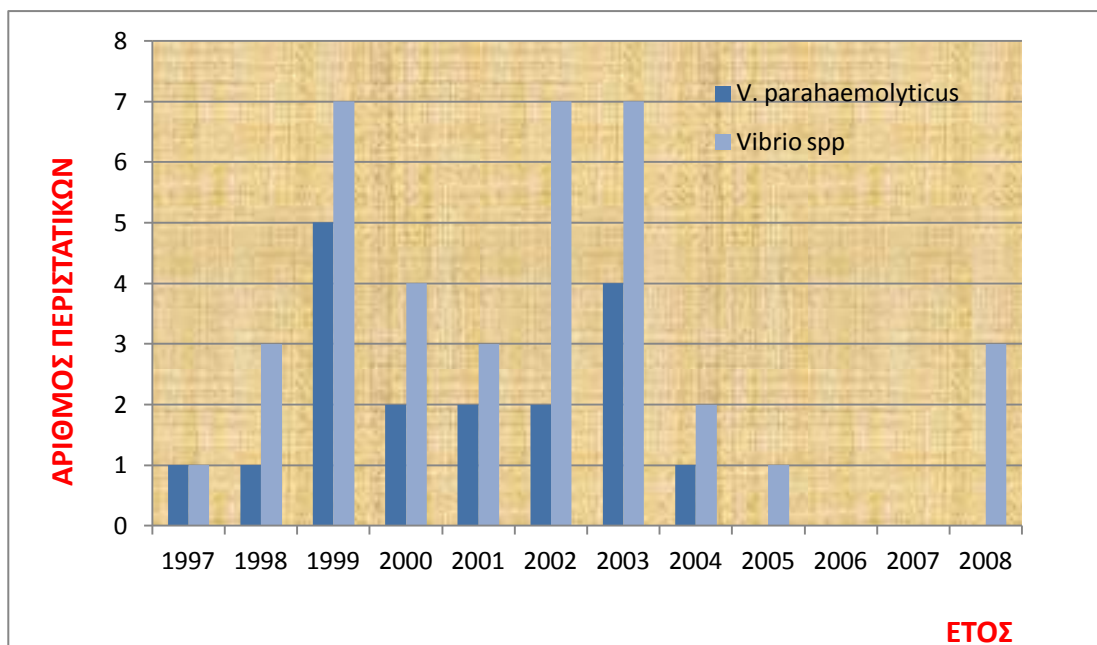
Νεότερες μέθοδοι εμφανίζονται σήμερα στον τομέα της ανίχνευσης του *V. parahaemolyticus*. Η μέθοδος MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), και η μέθοδος BMS (bead-based mesofluidic system), φαίνεται να προσελκύουν το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου με τη μεγάλη ακρίβεια, ευαισθησία και ταχύτητα που προσφέρουν στην ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών (Ramamurthy & Nair 2014).

## 2.11 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός για τη θέσπιση κριτηρίων ασφάλειας για τα τρόφιμα (ΕΚ 2073/2005 όπως τροποποιήθηκε από τον ΕΚ 1441/2007), δεν καθορίζει κριτήρια ασφάλειας ή κριτήρια υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ωστόσο, σε άλλες χώρες εκτός ΕΕ, όπου τα προβλήματα που δημιουργούνται εξαιτίας του δονακίου είναι εντονότερα, έχει γίνει καθορισμός επιπέδων. Δεδομένου, ότι τα παθογόνα στελέχη του *V. parahaemolyticus* έχουν βρεθεί σε λιγότερο από 1% σε περιβαλλοντικά δείγματα (Bisha et al, 2012) καθώς και ότι η μολύνουσα δόση των εντεροπαθογόνων στελεχών δεν είναι γνωστή επακριβώς, στις ΗΠΑ ο FDA έχει θεσπίσει όριο λήψης μέτρων στην ISSF τα 10.000 κύτταρα/g (Rosec et al, 2012), ενώ στην Ιαπωνία η κυβέρνηση καθόρισε όριο τα 100 MPN/g τροφίμων (Hara – Kudo & Takatori, 2011).

## 2.12 Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ ΣΗΜΕΡΑ

Σύμφωνα με το Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για την Ασφάλεια των Τροφίμων (Rapid Alert System for Food and Feed – RASFF), όπως προέκυψε από ελέγχους των επίσημων αρχών των Ευρωπαϊκών χωρών που συμμετέχουν σε αυτό, από το 1997 μέχρι το 2008, αναφέρονται 38 περιπτώσεις ανίχνευσης της παρουσίας *Vibrio* spp σε τρόφιμα, εκ των οποίων τα 18, ήταν *V. parahaemolyticus*. Ο αριθμός των περιστατικών που ανακοινώθηκαν στο RASFF τα έτη 1997 – 2008, φαίνεται στο διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1 :** Αριθμός περιστατικών που ανακοινώθηκαν στο RASFF τα έτη 1997 – 2008 και αφορούσαν παρουσία *Vibrio* spp & *V. parahaemolyticus* σε τρόφιμα. (www.rasff.com).

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. Το περιστατικό αναφέρθηκε σε εστιατόριο χώρου εργασίας, ενώ τα τρόφιμα που ενοχοποιήθηκαν ήταν δίθυρα μαλάκια, οστρακοειδή, γαστερόποδα και άλλα παραπλήσια προϊόντα. Ωστόσο, οι συνιστάμενοι παράγοντες δεν αναφέρθηκαν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η εξυγίανση ενός τροφίμου, με όποιο τρόπο και αν γίνεται, αποτελεί μόνο το πρώτο στάδιο για την ασφάλειά του. Με εξαίρεση τρόφιμα τα οποία μεταφέρονται σε χύμα μορφή, η ασφαλής διακίνηση των υπολοίπων, μέχρι να φτάσουν στο πιάτο του καταναλωτή, απαιτεί, μεταξύ άλλων, τις περισσότερες φορές την κατάλληλη συσκευασία του. Στόχος της συσκευασίας είναι να προστατεύσει τα τρόφιμα από φυσικούς παράγοντες, να διευκολύνει το χειρισμό, τη μεταφορά και την εμπορία τους με το μικρότερο δυνατό κόστος και επιπλέον να προσελκύσει τον καταναλωτή με σκοπό την προώθηση των πωλήσεων (Μπλούκας, 2004). Επίσης, σύμφωνα με τον McMillin (2008), αποτελεί εργαλείο προώθησης του προϊόντος αφού επικοινωνεί με τον καταναλωτή, ενώ ο Han (2005) αναφέρει ότι μία καλή συσκευασία συμβάλλει στο επιχειρηματικό κέρδος. Ωστόσο, η κύρια λειτουργία της συσκευασίας των τροφίμων είναι να συμβάλλει στην καλύτερη συντήρηση και την ασφαλή μεταφορά των τροφίμων, μέχρι την κατανάλωσή τους.

Η προστασία των τροφίμων ανακαλύφθηκε πολύ νωρίς, από τότε που ο άνθρωπος κυνηγούσε για να εξασφαλίσει την τροφή του, ώστε να την προστατέψει από τη σκόνη και την καταστροφή. Πιστεύεται, ότι, οι αρχαίοι Αιγύπτιοι 3000 χρόνια π.Χ., χρησιμοποίησαν κεραμικό υλικό για την αποθήκευση τροφίμων και στη συνέχεια ανακάλυψαν τρόπους για τη σφράγισή τους. Το 600 π.Χ. ο φελλός έγινε γνωστός σε αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους, ενώ μόλις περί το 1200 μ.Χ. εφευρέθηκαν τα υλικά από λευκοσίδηρο που οδήγησαν στη βιομηχανοποίηση των περιεκτών για την αποθήκευση (Cutter, 2002).

Στον Πίνακα 6, φαίνονται οι κυριότεροι σταθμοί στην ιστορία, όσον αφορά την ανακάλυψη και χρήση διαφόρων υλικών συσκευασίας.

Οι απαραίτητες συνθήκες για την παραγωγή κατάλληλων συσκευασιών σύμφωνα με τον Yokohama (1985), είναι :

- Μαζική παραγωγή.
- Αποτελεσματικό υλικό συσκευασίας.
- Κατάλληλη κατασκευή.
- Ευκολία στη χρήση.
- Εξέταση για διάθεση μετά τη χρήση.

Η ποιότητα των συσκευασμένων τροφίμων, σχετίζεται άμεσα με το είδος του τροφίμου, αλλά και με τις ιδιότητες των υλικών συσκευασίας. Διάφορα φαινόμενα, όπως η απορρόφηση της υγρασίας, η είσοδος οξυγόνου, η απώλεια γεύσης, η απορρόφηση μη επιθυμητών οσμών και η μετανάστευση ουσιών από τα υλικά συσκευασίας στα



τρόφιμα, μπορούν να υποβαθμίσουν την ποιότητα των συσκευασμένων τροφίμων (Han, 2005).

Σήμερα, λοιπόν, η τεχνολογία της συσκευασίας των τροφίμων, έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ, ώστε εκτός από την προστασία του προϊόντος που συσκευάζεται, παρέχει κι άλλες λειτουργίες (McMillin, 2008). Η ικανότητα δέσμευσης του οξυγόνου, η αντιμικροβιακή δράση, η δυνατότητα να καταναλωθεί από τον καταναλωτή και η ικανότητα για βιοδιάσπαση, αποτελούν μερικές μόνο από τις λειτουργικές ικανότητες των υλικών συσκευασίας. Έτσι, μπορούν πλέον να επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατηρώντας περισσότερο την ποιότητά τους, αυξάνουν την ασφάλεια των τροφίμων από την επιμόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και από την περίπτωση της βιοτρομοκρατίας και ενισχύουν την ευκολία της επεξεργασίας, της διανομής, της εμπορίας και φυσικά της κατανάλωσης των τροφίμων (Han, 2005).

**Πίνακας 6.** Ιστορική εξέλιξη των υλικών συσκευασίας (Προσαρμόστηκε από Cutter, 2002).

A/A	Έτος	Γεγονός
1	1809	Αμοιβή 12000 γαλλικών φράγκων στον Nicolas Appert από τον Ναπολέοντα, για την εφεύρεση γυάλινου μπουκαλιού με πώμα, που μπορεί να θερμανθεί σε υδατόλουτρο
2	1810	Ο Duran εφηύρε το μεταλλικό δοχείο – έναρξη της βιομηχανίας της κονσέρβας
3	1870s	Εφεύρεση της ζελατίνης
4	1875	Εφεύρεση του βιδωτού καπακιού
5	1890s	Δημιουργία αυτόματης μηχανής που κατασκευάζει φιάλες
6	1890s	Ανάπτυξη κερωμένου χαρτιού
7	1910	Παραγωγή φύλλου αλουμινίου σε ρολό
8	1920s	Παραγωγή φύλλου σελοφάν, με ανθεκτικότητα στην υγρασία και ανθεκτικότητα στη θερμότητα
9	1929	Ο White ανέπτυξε μία μέθοδο με την οποία ατμός προστίθεται στην επιφάνεια τροφίμων συσκευασμένων σε μεταλλικό ή γυάλινο περιέκτη, για να δημιουργήσει κενό μετά το κρύωμά του
10	1950s	Εισαγωγή θερμοσυρρικνούμενου PVC, νάυλον σε ρολό, επικάλυψη της επιφάνειας των λευκοσιδηρών δοχείων με λάκα
11	1960s	Ανάπτυξη πλαστικών φιαλών και φιλμ πολυμερών

## 3.2 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΕΣ

### 3.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η παγκόσμια κατεύθυνση για πιο υγιεινή διατροφή, για αλλαγές στον τρόπο ζωής του καταναλωτή και την εξέλιξη του λιανικού εμπορίου, έχουν οδηγήσει σε μια αξιοσημείωτη αύξηση της απαίτησης για φρέσκο, φυσικό, υγιεινό και πρακτικό τρόπο παραγωγής τροφίμων (Oluwafemi et al, 2013).

Την τελευταία δεκαετία, η αυξημένη απαίτηση του καταναλωτή για ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, έχει προκαλέσει την εμφάνιση διαφόρων επιστημονικών τάσεων, όπως η τεχνολογία *sous-vide*, το παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο, την επεξεργασία με υψηλή ατμοσφαιρική πίεση και την αποθήκευση σε προστατευόμενες ατμόσφαιρες (Bouletis et al 2014, Paarup et al 2002). Μεταξύ αυτών, η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες γίνεται ολοένα και πιο διαθέσιμη, αφού η βιομηχανία τροφίμων κάνει συνεχώς προσπάθειες, προκειμένου να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκα υπό ψύξη τρόφιμα, με παρατεταμένο χρόνο ζωής (Rodriguez-Aguilera et al, 2011, Sivertsvik et al, 2002).

Οι Singh et al (2012), διαπίστωσαν ότι τα τελευταία χρόνια, η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες έχει παρουσιάσει δεκαπλάσια ανάπτυξη στην αγορά, με ανάλογη αύξηση στις επιστημονικές εκδόσεις, στους τομείς της έρευνας. Παραδοσιακά, η συσκευασία σε ΤΑ έχει χρησιμοποιηθεί για να διατηρήσει τη φρεσκότητα νωπών προϊόντων, κρέατος και ψαριών, με τον έλεγχο του βιοχημικού μεταβολισμού τους – πχ αναπνοή (Han, 2005). Παρέχει, έτσι, το πλεονέκτημα της συσκευασίας ευαλλοίωτων τροφίμων, διατηρώντας τα κατά τρόπο που να αυξάνει τη διάρκεια της ζωής τους. Παράλληλα περιορίζει το κόστος μεταφοράς των προϊόντων, ενώ τέλος διατηρεί ανέπαφα τη θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Bouletis et al, 2014, Mastromatteo et al, 2010).

Η τεχνολογία της συσκευασίας ΤΑ, βασίζεται στην απομάκρυνση της περιβάλλουσας ατμόσφαιρας του τροφίμου και αντικατάστασή της με άλλη τροποποιημένη (Bouletis et al, 2014), η σύνθεση της οποίας είναι διαφορετική από αυτήν του αέρα του περιβάλλοντα χώρου (Floros & Matsos, 2005). Από τη στιγμή που η ατμόσφαιρα, υπό μορφή μίγματος αερίου θα εισαχθεί, δεν πραγματοποιείται καμία παρακολούθηση της σύνθεσης, η οποία, αναπόφευκτα, αλλάζει (Sivertsvik et al, 2002).

Ο σκοπός της συσκευασίας σε ΤΑ, σύμφωνα με τους Floros & Matsos (2005), είναι να παρατείνει το χρόνο ζωής των τροφίμων και να αποτρέψει ή τουλάχιστον να επιβραδύνει ανεπιθύμητες αλλαγές στην υγιεινή, την ασφάλεια, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία του τροφίμου. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται με τις 3 παρακάτω αρχές :

- Μείωση ανεπιθύμητων φυσιολογικών, χημικών/βιοχημικών και φυσικών αλλαγών των τροφίμων.
- Έλεγχος της μικροβιακής ανάπτυξης.
- Αποτροπή της επιμόλυνσης του προϊόντος.

### 3.2.2 ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΙΩΝ

Τα κυριότερα αέρια που λαμβάνουν μέρος στη συσκευασία ΤΑ είναι το άζωτο, το διοξείδιο του άνθρακα και το οξυγόνο (Mastromateo et al 2010, Floros & Matsos, 2005, Phillips, 1996). Τα τρία παραπάνω συστατικά, συμμετέχουν σε διαφορετικές ποσότητες και αναλογίες στη συσκευασία σε ΤΑ, ανάλογα με το προϊόν, τις ανάγκες του παραγωγού του τροφίμου, αλλά και τις επιθυμίες των καταναλωτών. Η επιλογή της σύστασης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η μικροβιακή χλωρίδα που δύναται να αναπτυχθεί στο προϊόν, η ευαισθησία του προϊόντος στο οξυγόνο και στο διοξείδιο του άνθρακα και οι απαιτήσεις για τη σταθερότητα του χρώματος του προϊόντος (Phillips, 1996). Ο ρόλος και η σημαντικότητα του κάθε αερίου, σχετίζεται με τις ιδιότητές του (Mastromateo et al 2010, Floros & Matsos, 2005).

Πρόκειται για αέρια τα οποία είναι ασφαλή, οικονομικά, εύκολα διαθέσιμα και δε θεωρούνται ότι είναι χημικά συντηρητικά. Ωστόσο, η ιδανική συγκέντρωση του καθενός από αυτά εξαρτάται από το είδος του τροφίμου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και ο καθορισμός τους γίνεται μεμονωμένα, προκειμένου να μεγιστοποιήσει τις θετικές και να ελαχιστοποιήσει τις αρνητικές επιδράσεις του.

#### Οξυγόνο (O<sub>2</sub>)

Το O<sub>2</sub> χρησιμοποιείται κυρίως για την αναστολή, της ανάπτυξης αναερόβιων μικροοργανισμών καθώς και της εκβλάστησης των σπόρων σπορογόνων βακτηρίων. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για τον έλεγχο ενός από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή σπορογόνα βακτήρια, του *Clostridium botulinum*. Από την άλλη μεριά όμως η παρουσία του σε ένα μίγμα αερίων συσκευασίας ΤΑ, ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των αερόβιων μικροοργανισμών, όπως πχ, των *Pseudomonas* spp. Επίσης, είναι υπεύθυνο για πολλές ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα διάφορα είδη τροφίμων, όπως, την οξείδωση και τάγγιση των λιπαρών οξέων, την ταχεία ωρίμανση και γήρανση φρούτων και λαχανικών, καθώς και μεταβολές του χρώματος του κρέατος (Mastromateo et al 2010, Floros & Matsos, 2005).

Ωστόσο, η παρουσία του σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι απαραίτητη. Χαρακτηριστικά αναφέρονται ως παραδείγματα, η περίπτωση των τυριών που ωριμάζουν με μύκητες (έστω και σε μικρές συγκεντρώσεις) και η συντήρηση του κρέατος όπου απαιτείται υψηλή συγκέντρωση για τη διατήρηση της μυοσφαιρίνης στην οξυγονωμένη της μορφή, την οξυαιμοσφαιρίνη, ώστε να διατηρηθεί το λαμπερό χρώμα του κρέατος. Μάλιστα στην τελευταία περίπτωση, η μικρή συγκέντρωση οξυγόνου (< 0,5%), είναι δυνατό να επηρεάσει δυσμενώς το χρώμα του (γκρι/καφέ), λόγω της μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη (Phillips, 1996).

#### Άζωτο (N<sub>2</sub>)

Το N<sub>2</sub> είναι αδρανές αέριο, άγευστο, χωρίς καμία αντιμικροβιακή ικανότητα. Αντικαθιστά το O<sub>2</sub>, ώστε να μειωθούν οι ανεπιθύμητες δράσεις του στα διάφορα είδη τροφίμων (πχ chips). Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ως αέριο πλήρωσης, δεδομένου ότι είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό και στις λιπαρές ουσίες. Τέλος, η παρουσία του

αποτρέπει τη συρρίκνωση της συσκευασίας του προϊόντος (Mastromateo et al 2010, Phillips, 1996)

### **Διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>)**

Το CO<sub>2</sub> είναι ο κυριότερος αντιμικροβιακός παράγοντας της συσκευασίας ΤΑ, έχοντας βακτηριοστατική αλλά και μυκητοστατική δράση. Επίσης, αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών αλλοιογόνων βακτηρίων, η δε αναστολή αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσής του στο μίγμα αερίων (Sivertsvik et al, 2002). Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί ότι το CO<sub>2</sub>, είναι διαλυτό στο νερό αλλά και στις λιπαρές ουσίες. Η βακτηριοστατική δράση του αυξάνεται όσο μειώνεται η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου και αντίστροφα (Phillips, 1996), εξαιτίας της μεταβολής της διαλυτότητας στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Σύμφωνα με τον Genigeorgis (1985) η αντιμικροβιακή δράση του CO<sub>2</sub>, προκύπτει μετά την απορρόφησή του από την επιφάνεια του τροφίμου και το σχηματισμό ανθρακικού οξέος, καθώς και στον επικείμενο ιονισμό του και πτώση του pH. Ωστόσο, η ελάχιστη μείωση του pH, εκτιμάται ότι πιθανόν δεν θα έχει σημαντική δράση (Phillips, 1996). Οι κυριότεροι μηχανισμοί βακτηριοστατικής δράσης του αερίου συνοψίζονται στα παρακάτω (Farber, 1991) :

- Μεταβολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένου των επιπτώσεων στην πρόσληψη και απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών.
- Άμεση αναστολή της λειτουργίας ή μείωση του ρυθμού των ενζυμικών αντιδράσεων.
- Διείσδυση διαμέσου των μεμβρανών, με αποτέλεσμα ενδοκυτταρική αλλαγή του pH.
- Άμεσες αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών.

Η χρήση του CO<sub>2</sub> για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης, δεν αποτελεί νέα τεχνολογία. Το 1877 ο Pasteur και ο Joubert, παρατήρησαν ότι ο *Bacillus anthracis* μπορούσε να θανατωθεί από το CO<sub>2</sub>, ενώ 5 χρόνια αργότερα, δημοσιεύτηκε το πρώτο άρθρο σχετικά με την επίδρασή του, στη συντήρηση των τροφίμων, παρατείνοντας το χρόνο συντήρησης σε βοδινό κρέας, το οποίο συντηρούνταν μέσα σε κύλινδρο με ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> (Sivertsvik et al, 2002).

Ωστόσο, η δράση του CO<sub>2</sub>, εξαρτάται από τη μικροβιακή χλωρίδα που θα δράσει και από το είδος του τροφίμου. Πιο συγκεκριμένα, τα αναερόβια τροφιμογενή παθογόνα *Cl. perfringens* και *Cl. botulinum*, δεν επηρεάζονται από τη δράση του. Επίσης, σε τρόφιμα στα οποία ο κυριότερος παράγοντας αλλοίωσης είναι ζύμες, το CO<sub>2</sub> δε θα παρουσιάσει σημαντική δράση, δεδομένου ότι οι υπόψη μικροοργανισμοί παράγουν CO<sub>2</sub> σε μεγάλες ποσότητες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (Phillips, 1996). Τέλος, η δράση του CO<sub>2</sub> εναντίον ιών, είναι μικρή, όπως καταδείχθηκε από τους Bidawid et al (2001). Πιο συγκεκριμένα, μαρούλι που συσκευάστηκε σε υψηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> (70%), διαπιστώθηκε 43% επιβίωση του ιού της Ηπατίτιδας Α (HAV) ύστερα από 12 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, συγκριτικά με αποθήκευση σε χαμηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> (6%), ή σε αερόβιες συνθήκες (Baert et al, 2009).

Στη συσκευασία σε ΤΑ, έχει προταθεί κατά καιρούς η συμμετοχή και άλλων αερίων,

μεταξύ των οποίων αναφέρονται οξείδια και υποοξείδια του αζώτου, CO, SO<sub>2</sub>, το Ar και Cl<sub>2</sub>. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν αναπτυχθεί για διάφορους λόγους, όπως οικονομικούς, νομικούς, θεμάτων ασφαλείας ή αποδοχής από τον καταναλωτή (Phillips, 1996). Έτσι, το CO, αν και ορισμένες φορές προστίθεται για να αναστείλει τη μικροβιακή ανάπτυξη, είναι τοξικό για τον άνθρωπο και η χρήση του είναι περιορισμένη. Επίσης, το SO<sub>2</sub>, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποτρέψει την αλλαγή χρωματισμού λόγω οξείδωσης και να ελέγξει την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Τέλος, το Ar έχει χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τη βακτηριακή ανάπτυξη, ενώ η αιθανόλη για να ενισχύσει τη σφριγηλότητα, να βελτιώσει τη γεύση και να μειώσει την ανάπτυξη μυκήτων σε ντομάτες.

### 3.2.3 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η συσκευασία σε ΤΑ είναι γνωστή και εφαρμόστηκε από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Οι κυριότερες στιγμές στην ιστορία της συσκευασίας σε ΤΑ είναι (Jay et al, 2005, Phillips, 1996) :

1882 : Αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub>, αποδείχθηκε ότι παρατείνουν τη διάρκεια ζωής κρέατος για 4 – 5 εβδομάδες.

1889 : Απόδειξη της αντιβακτηριακής ιδιότητας του CO<sub>2</sub>.

1895: Παρατηρήθηκε ότι ατμόσφαιρα 100% σε CO<sub>2</sub>, αναστέλλει την εκβλάστηση σπορίων μυκήτων.

1910 : Η συσκευασία ΤΑ χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη διατήρηση διαφόρων τροφίμων.

1927 : Καταγράφηκε επιμήκυνση του χρόνου ζωής μήλων, κατά την αποθήκευση σε ατμόσφαιρα μειωμένου O<sub>2</sub> και αυξημένης συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>.

1938 : Το 26% του κρέατος της Ν. Ζηλανδίας και το 60 % της Αυστραλίας, διακινείται κάτω από ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>.

1960 : Ο Burg περιγράφει το σύστημα της υποβαρικής πίεσης.

1970s : Εισαγωγή (εμπορικά) της τεχνικής για συσκευασίες λιανικής πώλησης.

1972 : Σχεδιάζεται από την Union Carbide Corporation, κρυογόνο σύστημα ατμόσφαιρας O<sub>2</sub> – N<sub>2</sub> .

1976 : Σχεδιάζεται υποβαρικός περιέκτης αποθήκευσης.

1979 : Εφαρμογή ΤΑ σε κρέας στην Αγγλία.

1981 : Εφαρμογή ΤΑ σε μπέικον, ψάρια, και μαγειρεμένο κρέας και οστρακόδερμα.

### 3.2.4. ΥΛΙΚΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ

Στην τεχνολογία των συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας, πολύ κρίσιμη παράμετρος επιλογής αποτελεί το υλικό συσκευασίας. Έτσι, ο βαθμός στον οποίο λαμβάνει χώρα η τροποποίηση της ατμόσφαιρας εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως η διαπερατότητα του φιλμ σε O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> και υδρατμούς, το πάχος της μεμβράνης, η επιφάνεια της συσκευασίας και ο ελεύθερος όγκος μέσα στη συσκευασία (Oluwafemi et al, 2013). Επίσης, λαμβάνονται υπόψη, η δυνατότητα απρόσκοπτης λειτουργίας της κλειστικής μηχανής, η αξιοπιστία της σφράγισης, η επιθυμία ή όχι ορατότητας του

προϊόντος καθώς και άλλα ειδικά χαρακτηριστικά, όπως η ευκολία του ανοίγματος της συσκευασίας, η δυνατότητα θέρμανσης του προϊόντος μέσα στη συσκευασία του κλπ (Phillips, 1996).

Οι περισσότερες συσκευασίες προϊόντων που προορίζονται για συσκευασία σε ΤΑ, κατασκευάζονται από ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω πολυμερή, ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά :

- Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC).
- Πολυαιθυλένιο τερεφθαλικό (PET).
- Πολυαιθυλένιο (PE).
- Πολυπροπυλένιο (PP).

Αν η χρησιμοποιούμενη μεμβράνη είναι πλήρως διαπερατή, τότε η ατμόσφαιρα μέσα στη συσκευασία σταδιακά θα γίνει ίδια με αυτήν του ατμοσφαιρικού αέρα, ενώ αν είναι ημιδιαπερατή, θα έχει ως αποτέλεσμα μία ισορροπημένη τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Σύμφωνα με τους Rodriguez-Aguilera et al (2011), η σύνθεση της ιδανικής ατμόσφαιρας για κάθε προϊόν, δημιουργείται με τη συσχέτιση της διαπερατότητας του υλικού συσκευασίας με τους ρυθμούς παραγωγής CO<sub>2</sub> – κατανάλωσης O<sub>2</sub> στο συγκεκριμένο προϊόν.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν αναπτυχθεί μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης των συνεπειών των ιδιοτήτων των μεμβρανών, όπως πχ του αριθμού και μεγέθους των μικροπόρων ανά συσκευασία σε σχέση με την επιθυμητή συγκέντρωση των αερίων (Renault et al., 1994). Τέτοια μοντέλα, μπορούν επίσης να καθορίσουν την αποτελεσματικότητα νέων υλικών που αναπτύσσονται (Phillips, 1996).

### **3.2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

Η χρήση της συσκευασίας σε ΤΑ παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, τόσο στον καταναλωτή όσο και στη βιομηχανία τροφίμων (Mastromateo et al 2010, Floros & Mastos, 2005, Phillips, 1996 ).

#### **Πλεονεκτήματα**

Στον καταναλωτή:

- Δεδομένου ότι η συσκευασία σε ΤΑ αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη συντήρηση πολλών τροφίμων, διατηρώντας τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ο καταναλωτής απολαμβάνει «φρέσκα» και «φυσικά» προϊόντα με παρατεταμένη διάρκεια ζωής.
- Παρέχει υψηλή ποιότητα προϊόντος.
- Προκύπτει μικρή ή καθόλου ανάγκη για προσθήκη χημικών συντηρητικών.
- Παρέχει σαφή εικόνα του προϊόντος.

Στη βιομηχανία τροφίμων :

- Μειώνει τις οικονομικές απώλειες, λόγω του αυξημένου χρόνου ζωής.
- Μειώνει τα κόστη μεταφοράς, επιτρέποντας τη μεταφορά σε μακρινούς προορισμούς.
- Οι σφραγισμένες συσκευασίες αποτελούν φραγμό έναντι επιμόλυνσης του προϊόντος.
- Βελτιώνει την παρουσίαση του τροφίμου, επιτρέποντας την ορατότητα του προϊόντος.
- Μειώνει την αφυδάτωση και την επερχόμενη απώλεια βάρους του τροφίμου καθώς και την πρόσληψη ανεπιθύμητων οσμών από το περιβάλλον (Garabal et al, 2010).

### **Μειονεκτήματα**

Στον καταναλωτή :

- Μεγαλύτερο κόστος αγοράς (λόγω αυξημένου κόστους παραγωγής).
- Απαιτείται αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας αποθήκευσης του προϊόντος, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια του προϊόντος.
- Όλα τα πλεονεκτήματα των προϊόντων, χάνονται από τη στιγμή που η συσκευασία θα ανοιχθεί.

Στη βιομηχανία τροφίμων :

- Για κάθε προϊόν απαιτείται διαφορετική αναλογία αερίων.
- Ο απαιτούμενος εξοπλισμός είναι εξειδικευμένος και ακριβός.
- Απαιτεί υψηλό κόστος για αέρια, υλικά συσκευασίας, εξοπλισμό, εκπαίδευση προσωπικού.
- Ο αυξημένος όγκος συσκευασίας οδηγεί σε μεγαλύτερο κόστος λόγω μεγαλύτερων εξόδων μεταφοράς, αλλά και λόγω μεγαλύτερου χώρου έκθεσης.
- Απαιτείται αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας αποθήκευσης του προϊόντος, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια του προϊόντος. Πρέπει να αναφερθεί ότι η συσκευασία ενός τροφίμου σε ΤΑ, σχεδιάζεται για μια συγκεκριμένη σταθερή θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από το ίδιο το τρόφιμο. Έτσι, μια αύξηση στη θερμοκρασία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της εξισορροπημένης ατμόσφαιρας, για την οποία η συσκευασία είχε αρχικά σχεδιαστεί, σε άλλη με διαφορετική αναλογία  $O_2$  και  $CO_2$ , γεγονός που θα είχε αντίθετο αποτέλεσμα στην ποιότητα του τροφίμου, μειώνοντας το χρόνο ζωής του (Rodriguez-Aguilera et al, 2011). Τέλος, η θερμοκρασία αποθήκευσης του προϊόντος πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατό σε χαμηλή θερμοκρασία, επειδή η διαλυτότητα του  $CO_2$ , μειώνεται δραματικά με την αύξηση της θερμοκρασίας (Singh et al, 2012).

### 3.3 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΤΑ

#### 3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα αλιεύματα είναι πολύ ευαλλοίωτα τρόφιμα, εξαιτίας του υψηλού συντελεστή ενεργότητας νερού, του υψηλού pH αμέσως μετά την αλίευσή τους, των μεγάλων ποσοτήτων μη πρωτεϊνικού αζώτου, της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τέλος της παρουσίας αυτολυτικών ενζύμων της σάρκας τους (Günşen et al, 2010). Ο βαθμός της υποβάθμισης της ποιότητάς τους, είναι άμεσα εξαρτώμενος από τη θερμοκρασία τους και μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών. Γενικά, σύμφωνα με τους Sivertsvic et al (2002), ως αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε αλλαγή μετατρέπει το προϊόν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Ειδικά για τα ψάρια και τα οστρακόδερμα, η αλλοίωση είναι αποτέλεσμα αλλαγών που προκαλούνται από την οξείδωση των λιπών, δράσεων αυτολυτικών ενζύμων των ίδιων των τροφίμων, αλλά και μεταβολικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών (Ashie et al, 1996).

Αν και η αλλοίωση είναι συνήθως μικροβιακής αιτιολογίας, σε πολλές περιπτώσεις, χημικές αλλαγές όπως η αυτοοξειδωση και η ενζυματική υδρόλυση των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσουν ορισμένες φορές σε δυσάρεστες οσμές και γεύσεις ενώ σε άλλες περιπτώσεις, η ενζυματική δραστηριότητα στη σάρκα προκαλεί την ανεπιθύμητη αλλοίωση της σάρκας (Huss et al, 1997). Ο βαθμός της επεξεργασίας και ο τρόπος διατήρησης του προϊόντος σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία αποθήκευσης, θα κρίνουν εάν θα επικρατήσει η μικροβιακή ή η χημική αλλοίωση ή θα είναι συνδυασμός και των δύο (Sivertsvic et al, 2002).

Προκειμένου να επιμηκυνθεί ο χρόνος ζωής των αλιευμάτων, αναφέρονται βιβλιογραφικά διάφορες μέθοδοι συντήρησης, μεταξύ των οποίων η αποξήρανση, η κάπνιση, η ψύξη και η κατάψυξη, η αλάτιση, η αλιπάσωση και η κονσερβοποίηση. Ωστόσο, οι χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης και χημικές τεχνικές που στοχεύουν στον έλεγχο της ενεργότητας νερού, καθώς και στην ενζυματική, την οξειδωτική και τη μικροβιακή αλλοίωση, είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία σήμερα (Ghaly et al, 2010).

Όμως, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται ευρεία χρησιμοποίηση της τεχνολογίας συσκευασίας σε ΤΑ σε ψάρια και γενικότερα αλιεύματα. Σύμφωνα με τους Ashie et al (1996), αυτή η ταχεία αύξηση της τεχνολογίας συσκευασίας ΤΑ στα παραπάνω προϊόντα, αποδίδεται σε μια σειρά αλληλένδετων παραγόντων, όπως :

- Ανάπτυξη νέων πολυμερών υλικών συσκευασίας, με υψηλό φραγμό στη μετακίνηση των αερίων.
- Γεωγραφική διεύρυνση της αγοράς με απαίτηση σε προϊόντα με «φρέσκα χαρακτηριστικά».
- Αύξηση του ενεργειακού κόστους που σχετίζεται με την παραγωγή προϊόντων με παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης τροφίμων, όπως πχ της κονσερβοποίησης και της κατάψυξης.
- Ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με τη χρήση πρόσθετων και συντηρητικών ουσιών.



- Ευνοϊκή αντίληψη των καταναλωτών σχετικά με την τεχνολογία συσκευασίας ΤΑ.

Σύμφωνα με τους Ozogul et al (2004), η επιμήκυνση της διάρκειας ζωής αλιευμάτων συσκευασμένων σε ΤΑ, εξαρτάται από την ποιότητα του νωπού προϊόντος, από το μίγμα αερίων, τα υλικά συσκευασίας και από τη θερμοκρασία συντήρησης, το δε ποσοστό αύξησης κυμαίνεται από 0 – 280 %, συγκριτικά με τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ευεργετική δράση της συσκευασίας σε ΤΑ οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία του CO<sub>2</sub>. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παραπάνω δράση παρατηρείται όταν η θερμοκρασία του τροφίμου διατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το CO<sub>2</sub> είναι διαλυτό τόσο στο νερό όσο και στις λιπαρές ουσίες των τροφίμων, η δε διαλυτότητά του αυξάνεται όσο μειώνεται η θερμοκρασία τους. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι ενώ η διαλυτότητα του CO<sub>2</sub> στο νερό στους 0° C είναι 3,38 g CO<sub>2</sub>/kg H<sub>2</sub>O, μειώνεται κατά 50% περίπου (στα 1,73 g CO<sub>2</sub>/kg H<sub>2</sub>O) στους 20° C (Sivertsvic et al, 2002). Η συγκέντρωση του διαλυμένου CO<sub>2</sub> στη σάρκα των ψαριών, εκτός από τη θερμοκρασία συντήρησης, επηρεάζεται επίσης από την αναλογία όγκων αερίου : προϊόντος (Milne & Powell, 2014). Γενικά, για να υπάρξει ένα σημαντικό αποτέλεσμα στη μικροβιακή ανάπτυξη, θα πρέπει η παραπάνω αναλογία να είναι μεγαλύτερη από 2 : 1 (Devlieghere & Debevere, 2000).

Η σύσταση αερίων της ΤΑ είναι επίσης μία σημαντική παράμετρος στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των αλιευμάτων. Η περιεκτικότητα του αερίου μίγματος σε CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> και N<sub>2</sub>, που θα επιλεγεί, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την περιεκτικότητα των αλιευμάτων σε λιπαρά οξέα. Έτσι, γενικότερα σε αλιεύματα με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα χρησιμοποιείται μια ατμόσφαιρα αερίων 30% O<sub>2</sub>/40% CO<sub>2</sub>/30% N<sub>2</sub> (Floros & Matsos, 2005). Αντίθετα, στην περίπτωση των λιπαρών ψαριών καθώς και των καπνιστών αλιευμάτων, συστήνεται κατά τεκμήριο η απομάκρυνση του O<sub>2</sub>, προκειμένου να αποφευχθούν οι οξειδωτικές αντιδράσεις και η τάγγιση (Sivertsvic et al, 2002). Σε αυτές τις περιπτώσεις, προτείνεται σύσταση αερίων 60% CO<sub>2</sub>/40% N<sub>2</sub> (Floros & Matsos, 2005).

Μία άλλη ευεργετική δράση της συσκευασίας σε ΤΑ, είναι η ελάττωση του σχηματισμού μαύρων κηλίδων στα κελύφη οστρακόδερμων (Floros & Matsos, 2005). Οι Sivertsvic et al (2002), αναφέρουν ότι τα οστρακόδερμα διατηρούνται κατά 30% περισσότερο στους 0° C σε ΤΑ, συγκριτικά με άλλες συσκευασίες, αφού καθυστερεί η εμφάνιση των μαύρων κηλίδων.

Όμως, παρά την αντιμικροβιακή δράση του CO<sub>2</sub>, η υψηλή περιεκτικότητά του στο αέριο μίγμα μπορεί να παρουσιάσει ορισμένα προβλήματα. Καθώς το CO<sub>2</sub> απορροφάται από τη σάρκα των ψαριών, μειώνεται το pH της, με επακόλουθο τη μείωση της ικανότητας συγκράτησης ύδατος από τις πρωτεΐνες των μυών. Συνέπεια του παραπάνω είναι η αύξηση της εμφάνισης σταγονιδίων μέσα στη συσκευασία. Επίσης, η διαλυτοποίηση του CO<sub>2</sub> προκαλεί μείωση της πίεσης εντός της συσκευασίας και κατ' επέκταση μπορεί να προκληθεί κατάρρευση της συσκευασίας. Η τοποθέτηση ενός απορροφητικού υποστρώματος μέσα στη συσκευασία και η προσθήκη N<sub>2</sub> στο αέριο μίγμα, μπορούν να λύσουν, αντίστοιχα, τα προαναφερθέντα προβλήματα (Floros & Matsos, 2005).

Επίσης, έχουν αναφερθεί προβλήματα όπως η μεταβολή του χρώματος των πτερυγίων της κοιλιάς, του κερατοειδούς και του δέρματος ολόκληρων ψαριών συσκευασμένων σε περιβάλλον 100% CO<sub>2</sub>, ενώ άλλοι ερευνητές αναφέρουν μεταβολή του χρώματος των βραγχίων σε καφέ και μαλάκυνση της σάρκας φιλέτων ψαριών, λόγω υψηλών συγκεντρώσεων CO<sub>2</sub> (Sivertsvic et al, 2002, Philips, 1996).

Η πληθώρα των ερευνητικών εργασιών στην παγκόσμια βιβλιοθήκη που σχετίζονται με την εφαρμογή της συσκευασίας ΤΑ σε ψάρια και αλιεύματα, καταδεικνύει το ενδιαφέρον τόσο της ερευνητικής κοινότητας όσο και της βιομηχανίας τροφίμων στον τομέα αυτόν.

### 3.3.2 ΨΑΡΙΑ

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλά παραδείγματα που αποδεικνύουν την ευεργετική δράση της συσκευασίας των αλιευμάτων σε ΤΑ. Οι Ozogul et al (2004), διερεύνησαν την επιμήκυνση του χρόνου ζωής σε σαρδέλες (*Sardina pilchardus*) συσκευασμένες σε ΤΑ, σε μίγμα αερίων CO<sub>2</sub> 60% / O<sub>2</sub> 40% (ιδανικό για λιπαρά ψάρια) και διαπίστωσαν ότι το προϊόν ήταν οργανοληπτικά αποδεκτό για 12 ημέρες, σε αντίθεση με τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες, που ήταν οργανοληπτικά αποδεκτό για μόλις 3 ημέρες. Επίσης, στην ίδια έρευνα, βρέθηκε ότι το προϊόν σε ΤΑ είχε χρόνο ζωής 3 ημέρες περισσότερο από το αντίστοιχο που συσκευάστηκε υπό κενό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση της σύστασης του μίγματος αερίων σε παρόμοια έρευνα σε σαρδέλες των Erkan et al (2005). Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω ερευνητές σύγκριναν την επίδραση 2 διαφορετικών συσκευασιών ΤΑ (Α : O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 5%/35%/60% και Β : O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 5%/70%/25%) σε σχέση με τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες κατά τη συντήρηση σαρδελών υπό ψύξη. Στην έρευνα αυτή διαπιστώθηκε ότι το μίγμα αερίων Α δεν επέδρασε καθόλου συγκριτικά με την αερόβια συντήρηση, αφού και τα 2 δείγματα παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά (εκτιμώντας τη γεύση και την οσμή) μέχρι την 5 ημέρα. Αντίθετα, το μίγμα αερίων με τη διπλάσια περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>, κατέστησε το προϊόν αποδεκτό μέχρι και την 7<sup>η</sup> ημέρα.

Σε μελέτη των Arkoudelos et al (2007), σχετικά με τη συσκευασία χελιών (*Anguilla Anguilla*) σε ΤΑ σύστασης CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> : 40%/30%/30% και συντήρηση στους 0° C, διαπιστώθηκε ότι παρατάθηκε ο χρόνος ζωής του τροφίμου από 7 σε 18 ημέρες. Επίσης, οι Pastoriza et al (1998), διαπίστωσαν αύξηση του χρόνου ζωής φιλέτων μπακαλιάρου (*Merluccius merluccius*), όταν συντηρήθηκαν σε ΤΑ σύστασης CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> : 50%/45%/5%, κατά 7 ημέρες συγκριτικά με την αερόβια συντήρησή τους, λαμβάνοντας υπόψη τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου.

Ευρεία είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση στην εφαρμογή της συσκευασίας σε ΤΑ στην περίπτωση φιλέτων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Διάφοροι ερευνητές διαπίστωσαν την αύξηση του χρόνου ζωής φιλέτων λαβρακιού και ολόκληρων ψαριών από 4 – 6 ημέρες σε αερόβιες συνθήκες μέχρι και σε 14 ημέρες (Provincial et al, 2010, Kostaki et al, 2009).

Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην Ελλάδα σε φιλέτα ξιφία και σε κολιούς, τα

αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των παραπάνω τροφίμων σε συνθήκες ΤΑ συγκριτικά με αερόβια συντήρηση, αλλά και από τη συσκευασία υπό κενό. Έτσι, οι Pantazi et al (2007), διαπίστωσαν αύξηση του χρόνου ζωής φιλέτων ξιφία, κατά 4 – 5 ημέρες σε συντήρηση υπό συνθήκες ψύξης, ενώ οι Stamatis & Arkoudelos (2007), επιμήκυναν το χρόνο ζωής κολιών κατά 3 – 4 ημέρες. Σημειώνεται, ακόμη, ότι και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, τα δείγματα σε συσκευασία ΤΑ ήταν οργανοληπτικά αποδεκτά για περισσότερο χρόνο συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συσκευασία υπό κενό.

Τέλος, σε έρευνα των Goulas & Kontominas (2007a), διαπιστώθηκε διπλασιασμός του χρόνου ζωής κολιών σε ΤΑ απουσία  $O_2$  σε σχέση με άλλους που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες (20 – 21 ημέρες συγκριτικά με 11 ημέρες). Ωστόσο, η προσθήκη  $O_2$  και η αντικατάσταση του  $CO_2$  κατά 20% , προκάλεσε μεν αύξηση του χρόνου ζωής, αλλά κατά 50% συγκριτικά με τις αερόβιες συνθήκες.

### 3.3.3 ΚΕΦΑΛΟΠΟΔΑ – ΟΣΤΡΑΚΟΕΙΔΗ – ΓΑΣΤΕΡΟΠΟΔΑ

Εκτός, όμως από την εφαρμογή συσκευασίας ΤΑ σε ψάρια, τα τελευταία χρόνια αξιολογούνται και τα αποτελέσματα της εφαρμογής της σε άλλα αλιεύματα, όπως πχ κεφαλόποδα, οστρακοειδή, γαστερόποδα κλπ.

Έτσι, οι Gornic et al (2013), διερευνώντας το καταλληλότερο μίγμα αερίων για συσκευασία αστακού σε ΤΑ, κατέληξαν ότι, υπό συνθήκες ψύξης ( $1^\circ C$ ), η διάρκεια ζωής τους παρατείνεται από 6,5 σε 13 ημέρες, όταν χρησιμοποιηθεί ατμόσφαιρα  $CO_2/N_2/O_2$  80%/10%/10%. Το αποτέλεσμα της έρευνας θεωρείται εξαιρετικά σημαντικό, δεδομένου του κόστους λιανικής πώλησης του συγκεκριμένου προϊόντος.

Οι Arvanitoyiannis et al (2011), μελετώντας τη μικροβιολογική κατάσταση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά γαρίδων συσκευασμένων σε ΤΑ, κάτω από δύο διαφορετικά μίγματα αερίων (MAP A :  $CO_2/N_2$  60%/40% και MAP B  $CO_2/N_2/O_2$  5,1%/92,9%/2%), κατά τη διάρκεια συντήρησης 5 ημερών στους  $3^\circ C$ , διαπίστωσαν ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων σε ΤΑ δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ήταν όμως σημαντικά διαφορετικά από το μάρτυρα.

Σε διερεύνηση του χρόνου ζωής θράψαλων συσκευασμένων σε ΤΑ, που μελέτησαν οι Bouletis et al (2014), χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά μίγματα αερίων (MAP 1 :  $CO_2/N_2$  20%/80%, MAP 2 :  $CO_2/N_2$  50%/50% και MAP 3 :  $CO_2/N_2$  70%/30%) , μελέτησαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις μικροβιολογικές παραμέτρους των δειγμάτων. Η μελέτη κατέδειξε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (10 ημέρες) στα θράψαλα που συσκευάστηκαν στο MAP 3, έξι ημέρες παραπάνω από ότι στο μάρτυρα ενώ στις συσκευασίες MAP 1 και MAP 2, ο χρόνος ζωής σύμφωνα με τα οργανοληπτικά κριτήρια που τέθηκαν ήταν 6 και 8 ημέρες αντίστοιχα. Τα μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν, προκάλεσαν ωστόσο διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά (συνεκτικότητα, χρώμα) στα δείγματα.

Μεγάλο είναι επίσης το ενδιαφέρον της βιομηχανίας αλλά και της επιστημονικής κοινότητας για τη διατήρηση σε ΤΑ μυδιών. Σε μελέτη των Goulas et al (2004),

διαπιστώθηκε παράταση του χρόνου ζωής σάρκας μυδιών μέχρι και 15 ημέρες, όταν συσκευάστηκαν σε διάφορα μίγματα αερίων, τη στιγμή που οι μάρτυρες (αερόβια συντήρηση) δεν ήταν αποδεκτοί από την 6<sup>η</sup> κιόλας ημέρα. Επίσης, σε παρόμοια έρευνα του Goulas (2008), σε ίδιο τρόφιμο, παρατηρήθηκε διπλασιασμός περίπου του χρόνου ζωής των μυδιών σε σχέση με την αερόβια συντήρηση, όταν συσκευάστηκαν σε ΤΑ σύστασης 60% CO<sub>2</sub>/20% N<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> (από 5 – 6 ημέρες σε 10 – 11) και συντηρήθηκαν υπό ψύξη. Επίσης σε σάρκα μυδιών, σε έρευνα των Caglac et al (2008), διαπιστώθηκε η ευεργετική δράση του CO<sub>2</sub>, αφού επιμηκύνθηκε ο χρόνος ζωής των μυδιών κατά 7 ημέρες.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη των Pastoriza et al (2004), οι οποίοι τροποποίησαν την ατμόσφαιρα συντήρησης ζωντανών μυδιών, αμέσως μετά την περισυλλογή τους από το χώρο καλλιέργειας, με σκοπό την παράταση του χρόνου ζωής τους. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι σε ατμόσφαιρα 75% O<sub>2</sub> / 25% N<sub>2</sub>, τα μύδια παρέμειναν ζωντανά για 48 – 72 ώρες επιπλέον, συγκριτικά με τις κείμενες εμπορικές πρακτικές αποθήκευσης. Όπως ήταν αναμενόμενο, στην παρούσα εργασία δε χρησιμοποιήθηκε CO<sub>2</sub> στο μίγμα αερίων, δεδομένου ότι το τελευταίο προκαλεί θάνατο των δίθυρων μαλακίων.

### **3.3.4 ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ**

Η συσκευασία ΤΑ βρίσκει εφαρμογή, εκτός από νωπά, και σε αλιεύματα τα οποία έχουν υποστεί διάφορες μορφές μεταποίησης. Η συσκευασία μαριναρισμένου γαύρου σε ΤΑ προκάλεσε την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του προϊόντος κατά 4 μήνες συγκριτικά με δείγματα τα οποία συντηρήθηκαν υπό κενό (7 μήνες), σύμφωνα με τους Gunsen et al (2010).

Τέλος, η διατήρηση σε ΤΑ (80% CO<sub>2</sub>/20% N<sub>2</sub>) μαγειρεμένων καραβίδων, προκάλεσε την αύξηση του χρόνου διατηρησιμότητας από δύο εβδομάδες σε αερόβιες συνθήκες σε τρεις. Μάλιστα, όπως αναφέρεται, τα επίπεδα της αμμωνίας ήταν σταθερά στη συσκευασία σε ΤΑ, ενώ στον αέρα, αυξήθηκαν κατακόρυφα (Stammen et al, 1990). Παρομοίως, οι Sivertsvik et al (1997), αναφέρουν ότι ατμόσφαιρες πλούσιες σε CO<sub>2</sub> βρέθηκε να αυξάνουν τη διάρκεια ζωής ολόκληρων μαγειρεμένων γαρίδων, μέχρι και 200 % σε σύγκριση με γαρίδες που αποθηκεύονται στον πάγο σε αερόβιες συνθήκες.

### **3.3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑ ΣΤΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ**

Η μέτρηση του ολικού πτητικού αζώτου χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης αλλοίωσης των αλιευμάτων που συντηρούνται στον πάγο, σε αερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, σε αλιεύματα τα οποία συντηρούνται σε συσκευασίες ΤΑ, ο υπόψη δείκτης παραμένει σε χαμηλές τιμές, ακόμη και όταν η οργανοληπτική αξιολόγηση κρίνει το προϊόν αλλοιωμένο. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει κάποιος διαφορετικός μηχανισμός αλλοίωσης σε περιβάλλον CO<sub>2</sub> και ότι ο προσδιορισμός του παραπάνω δείκτη δεν είναι κατάλληλος για τρόφιμα συσκευασμένα σε ΤΑ (Sivertsvik et al, 2002). Άλλοι ερευνητές

(Handumrongkul & Silva, 1994) αναφέρουν ότι και ο προσδιορισμός της τιμής K δεν είναι κατάλληλος για αλιεύματα σε ΤΑ, προτείνοντας εναλλακτικά την υιοθέτηση ενός τροποποιημένου δείκτη K, ο οποίος προκύπτει χωρίς να συμπεριληφθεί στο γινόμενο η συγκέντρωση της ινολίνης.

Σχετικά με τον ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό (Specific Spoilage Organism – SSO) των αλιευμάτων που συσκευάζονται και συντηρούνται σε ΤΑ, διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την κυριαρχία του. Η θερμοκρασία (εύκρατα – τροπικά) και το είδος (θαλάσσιο – γλυκό) του νερού, το είδος του αλιεύματος και η σύσταση του αέριου μίγματος της συσκευασίας, είναι οι κυριότεροι παράγοντες. Ο συνηθέστερος μικροοργανισμός που αναλαμβάνει το ρόλο του SSO στα αλιεύματα που συντηρούνται σε ΤΑ είναι το *Photobacterium phosphoreum* ενώ άλλοι μικροοργανισμοί που αναφέρονται συχνά είναι οξυγαλακτικά και ΤΜΑΟ – αναγωγικά βακτήρια (Gram & Huss, 1996). Τέλος, άλλοι ερευνητές αναφέρουν ως SSO τη *Shewanella putrefaciens* (Sivertsvik et al, 2002).

### 3.3.6. ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Τα ψάρια και τα οστρακοειδή αποτελούν φορείς μικροοργανισμών, οι οποίοι κατά τεκμήριο προέρχονται είτε από το φυσικό περιβάλλον που ζουν και φέρονται σε αυτά (πχ *Clostridium botulinum*, *Vibrio* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*), είτε έχουν ως αποθήκη τον άνθρωπο και μεταδίδονται κατά τους διάφορους χειρισμούς (πχ *Salmonella* spp, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*). Η συσκευασία σε ΤΑ συνήθως δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών και δεν αυξάνουν παραπάνω τον κίνδυνο από *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* και *Vibrio parahaemolyticus*, συγκριτικά με την αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες (Sivertsvik et al, 2002).

Το σημαντικότερο πρόβλημα που μπορεί να προκύψει κατά την αποθήκευση αλιευμάτων σε συσκευασία ΤΑ, είναι η εκβλάστηση σπόρων *Cl. botulinum* και η παραγωγή νευροτοξίνης. Το πρόβλημα γίνεται εντονότερο, στις περιπτώσεις που το αέριο μίγμα δεν περιέχει O<sub>2</sub>. Ακόμη και αν η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου είναι μικρότερη των 4° C, υπάρχει θεωρητικά πιθανότητα παραγωγής τοξίνης από το *Cl. botulinum* type E καθώς και από μη πρωτεολυτικά στελέχη των τύπων B και F, τα οποία μπορεί να μην προκαλέσουν εμφανή αλλοίωση του προϊόντος (Philips, 1996). Έτσι, είναι πολλές οι αναφορές, οι οποίες σημειώνουν ότι η παραγωγή τοξίνης *Cl. botulinum* παράγεται πριν από την απόρριψη του προϊόντος λόγω μεταβολής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι το O<sub>2</sub> προστίθονταν στο μίγμα αερίων, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος της ανάπτυξης των παθογόνων αναερόβιων βακτηρίων. Σήμερα, αναγνωρίζεται γενικά ότι η ανάπτυξη του *Cl. botulinum* στα τρόφιμα δεν εξαρτάται από τον ολικό αποκλεισμό του O<sub>2</sub> αλλά και ούτε η προσθήκη O<sub>2</sub> ως αέριο συσκευασίας εξασφαλίζει ότι αποτρέπεται η ανάπτυξή του. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ασφαλέστερη μέθοδος συσκευασίας από πλευράς τοξινογένεσης είναι το μίγμα αερίων να περιέχει ίσες ποσότητες O<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> (Sivertsvik et al, 2002).

Στο πνεύμα της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών, η οποία δε συστήνει τη συσκευασία ΤΑ για νωπά ψάρια, μέχρι η ασφάλεια του τροφίμου να εξασφαλιστεί (Stammen et al, 1990) και δεδομένης της αδυναμίας χρήσης  $O_2$  σε τόσο μεγάλες ποσότητες, θα πρέπει η ασφάλεια του προϊόντος να ανατεθεί σε άλλους περιοριστικούς παράγοντες. Η τεχνολογία των εμποδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αντιμικροβιακές ουσίες χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για 2 κυρίως λόγους :

- Να ελέγξουν τις φυσικές διεργασίες αλλοίωσης (διατηρησιμότητα τροφίμων).
- Να αποτρέψουν και να ελέγξουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου των παθογόνων (ασφάλεια τροφίμων).

Στην προσπάθεια αυτή, χρησιμοποιούνται, εκτός από διάφορες χημικές ουσίες, άλλες φυσικές αντιβακτηριακές ουσίες, που μπορεί να είναι ζωικής, βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης (Tajkarimi et al, 2010).

Παρά τις βελτιώσεις στα διάφορα στάδια παραγωγής, επεξεργασίας και μεταποίησης η ασφάλεια των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί θέμα μεγάλης σημασίας για τη Δημόσια Υγεία, αφού ακόμη και στις αναπτυγμένες χώρες, μεγάλο ποσοστό πληθυσμού προσβάλλεται από κάποιο τροφιμογενές νόσημα (WHO, 2002). Δεδομένης της σκοπιμότητας χρήσης νέων μεθόδων με «πράσινο χαρακτήρα», στην ασφάλεια των τροφίμων, μία δυνατότητα είναι η χρήση των αιθέριων ελαίων ως αντιβακτηριακά πρόσθετα (Burt, 2004).

Τα αιθέρια έλαια (ΑΕ) είναι αρωματικές πτητικές ουσίες, οι οποίες είναι διαλυτές στην αλκοόλη, λιγότερο διαλυτές στο νερό και αποτελούνται από μίγμα εστέρων, αλδεϋδών, κετονών και τερπενίων. Η ονομασία φαίνεται να χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ελβετό γιατρό Paracelsus von Hohenheim, το 16ο αιώνα, ο οποίος ονόμασε το δραστικό συστατικό ενός φαρμάκου *Quinta essential* (Σολωμάκος, 2007).

### 4.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Βότανα και μπαχαρικά χρησιμοποιούνταν από τα αρχαία χρόνια, όχι τόσο ως συντηρητικές ουσίες, αλλά ως αρωματικά πρόσθετα. Αρχαιολόγοι, έφεραν στο φως αποδεικτικά στοιχεία, σχετικά με τη χρήση φύλλων φυτών ως αρωματικά κρέατος 50.000 χρόνια π.Χ. καθώς και στην οينوποιία από το 2.300 π.Χ. Ο μέγας Αλέξανδρος, κατά την εκστρατεία του στην Ασία το 330 π.Χ., μεταξύ των άλλων, υιοθέτησε και διέδωσε βότανα και μπαχαρικά μεταξύ των Περσών, των Ινδών και των Ελλήνων. Το εμπόριο των βοτάνων άνθισε κατά το 2ο αιώνα μ.Χ. στους εμπορικούς «Δρόμους του Μεταξιού», μεταξύ Ανατολής και Δύσης, ενώ νεότερα αρχεία αναφέρουν τη χρήση τους ως φαρμακευτικές ουσίες στην αρχαία Αίγυπτο και Ασσηνία καθώς και ως συντηρητικά τροφίμων στην Αρχαία Ελλάδα και στη Ρώμη. Στο Μεσαίωνα τα βότανα και τα μπαχαρικά συνεχίστηκαν να χρησιμοποιούνται ως αρωματικά, συντηρητικά τροφίμων και για ιατρικούς σκοπούς, ενώ τέλος, από το 1800 μ.Χ. αναπτύχθηκε εμπορικό

ενδιαφέρον και αυξήθηκε η παραγωγή και η ζήτηση των προϊόντων στον Ευρωπαϊκό χώρο (Kaefer & Milner, 2008).

Οι πρώτες επιστημονικές μελέτες σχετικά με τη συντηρητική ικανότητα των μπαχαρικών, η οποία περιέγραψε την αντιβακτηριακή δράση του ελαίου κανέλας κατά των σπόρων *Bacillus anthracis*, αναφέρεται στη δεκαετία του 1880 (Tajkarimi et al, 2010).

Σήμερα, τα βότανα και τα φυτά χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία των τροφίμων (Nychas & Skandamis, 2003). Εκτός από τα τρόφιμα, τα ΑΕ βρίσκουν εφαρμογή στους τομείς της κοσμετολογίας, αρωματοποιίας, ποτοποιίας, φαρμακευτικής και ιατρικής και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε καλλυντικά αρώματα, αποσμητικά, απορρυπαντικά, στοματικά αντισηπτικά διαλύματα και οδοντόκρεμες (Valero, 2003).

### 4.3 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Τα βότανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα σε διάφορες μορφές, όπως αποξηραμένα ή τριμμένα φύλλα και άνθη, εκχυλίσματα με διάφορους διαλύτες ή αιθέρια έλαια. Προέρχονται από φυτικές πρώτες ύλες, που μπορεί να είναι λουλούδια, μπουμπούκια, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, φλοιός, βότανα, ξύλα, φρούτα και ρίζες.

Τα εμπορικά φυτικής προέλευσης αιθέρια έλαια, παράγονται κυρίως με τη μέθοδο της απόσταξης με ατμό (steam distillation – SD) ή με υδρατμούς (hydro distillation – HD). Ωστόσο άλλες εναλλακτικές μέθοδοι που μπορεί να χρησιμοποιηθούν, όπως πχ η μέθοδος υπερκρίσιμης εκχύλισης (supercritical fluid extraction), φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα (Mahmoud et al, 2004).

Σύμφωνα με τους Mahmoud et al (2004), η αντιμικροβιακή δράση των ΑΕ εκδηλώνεται με τους παρακάτω τρόπους :

- Παρεμβαίνουν στη λειτουργία της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας αύξηση της διαπερατότητας και απώλεια κυτταρικών συστατικών.
- Αλλοιώνουν ποικιλία ενζυμικών συστημάτων μεταξύ των οποίων εκείνα τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας του κυττάρου και στη σύνθεση δομικών συστατικών.
- Καταστρέφουν / αδρανοποιούν γενετικό υλικό.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ΑΕ και των συστατικών τους, είναι η υδροφοβικότητά τους. Λόγω αυτής, βοηθείται η διείσδυση στα λιπίδια της βακτηριακής μεμβράνης και στα μιτοχόνδρια, διαταράσσονται οι δομές και γίνονται περισσότερο διαπερατά, με αποτέλεσμα την απώλεια των ιόντων και άλλων κυτταρικών περιεχομένων (Burt, 2004). Η δράση των ΑΕ εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Έτσι, σε μικρές συγκεντρώσεις, αναστέλλονται τα ένζυμα που σχετίζονται με τη παραγωγή ενέργειας. Αν και η απώλεια μιας συγκεκριμένης ποσότητας μπορεί να είναι ανεκτή από το κύτταρο, χωρίς απώλεια της βιωσιμότητάς του, περαιτέρω απώλεια



κυτταρικών στοιχείων ή κρίσιμων μορίων, μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. Είναι αβέβαιο αν η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης είναι ανάλογη ποσοτικά με την ποσότητα του δραστικού συστατικού στο οποίο το κύτταρο εκτίθεται ή το αποτέλεσμα είναι τέτοιο που μόλις προκληθεί μικροτραυματισμός ακολουθεί η καταστροφή του κυττάρου (Nychas & Skandamis, 2003). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί πριν από τη λύση του κυττάρου (Burt, 2004).

Ο τρόπος δράσης διαφέρει μεταξύ των διαφόρων συστατικών των ΑΕ. Σχετικά με τα συστατικά των διαφόρων ΑΕ έχει δημοσιευτεί πλήθος μελετών. Η λεπτομερής ανάλυση επιτυγχάνεται με αέρια χρωματογραφία και με φασματομετρία μάζας. Έτσι, τα αιθέρια έλαια μπορεί να αποτελούνται από περισσότερα από 60 μεμονωμένα συστατικά, τα κύρια από αυτά όμως θα αποτελούν το 85 % του συνόλου, ενώ τα υπόλοιπα θα απαντώνται σε ίχνη. Τα φαινολικά συστατικά, όπως θυμόλη, καρβακρόλη κλπ είναι εκείνα στα οποία οφείλεται κυρίως η αντιβακτηριακή δράση των ΑΕ. Ωστόσο, πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι και τα συστατικά σε ίχνη παίζουν ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση των ΑΕ (Burt, 2004). Η χημική σύνθεση των ΑΕ η οποία δημιουργεί τα ανασταλτικά φαινόμενα, οφείλεται πιθανώς στην παρουσία του αρωματικού δακτυλίου, που περιέχει πολικές χαρακτηριστικές ομάδες (Mahmoud et al, 2004).

Πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η χημική σύνθεση των ΑΕ των φυτών δεν είναι σταθερή και ίδια, αλλά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι το κλίμα και η γεωγραφική θέση της περιοχής, η εποχή του έτους, η περίοδος και το στάδιο συγκομιδής καθώς και η τεχνική με την οποία παρασκευάζεται (Baydar et al, 2004). Γενικά, όπως αναφέρει η Burt (2004), η ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση των ΑΕ εμφανίζεται σε βότανα τα οποία συλλέγονται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την άνθισή τους.

Σύμφωνα με τους Baydar et al (2004), η αντιμικροβιακή δράση των ΑΕ εκτός από τους παράγοντες που σχετίζονται με το ίδιο το ΑΕ (είδος, σύνθεση και συγκέντρωση των συστατικών του) επηρεάζεται και από παράγοντες όπως το μικροοργανισμό στόχο και το πληθυσμό του στο τρόφιμο καθώς και το είδος του τροφίμου (επεξεργασία που υφίστανται, συνθήκες διατήρησης κλπ).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τη διερεύνηση της δράσης των ΑΕ, αναφέρουν ότι είναι περισσότερο ενεργά κατά των Gram – θετικών μικροοργανισμών από ότι των Gram – αρνητικών, τόσο για τα αλλοιογόνα όσο και για τα παθογόνα βακτήρια. Το επιπλέον λιποπολυσακχαριδιτικό στρώμα των Gram – αρνητικών, φαίνεται να αποτελεί φραγμό στη διάχυση των υδρόφοβων συστατικών (Burt, 2004). Ωστόσο, σε μελέτη 50 εμπορικά διαθέσιμων ΑΕ εναντίον 25 διαφορετικών γενών, δε διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ Gram – θετικών και αρνητικών βακτηρίων (Deans & Ritchie, 1987).

Η αντιμικροβιακή δράση των ΑΕ έχει καταδειχθεί εδώ και πολλά χρόνια. Για τον προσδιορισμό της, έχουν δοκιμαστεί πολλά μοντέλα τροφίμων έναντι μικροοργανισμών που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα όπως *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Baydar et al, 2003, Marino et al 2001, Dorman & Deans, 2000). Πέρα, όμως από τα μοντέλα τροφίμων,

πολλαπλές έρευνες υλοποιήθηκαν και σε διάφορα τρόφιμα, όπως ταραμοσαλάτα (Koutsoumanis et al, 1999), ημιαποβουτυρωμένο γάλα (Karatzas et al, 2001), μοτσαρέλα (Vrinda Menon & Garg, 2001) και άλλα μαλακά τυριά (Mendoza – Yepes et al, 1997), γιαούρτι (Bayoumi, 1992), φιλέτα μπακαλιάρου και σολωμού (Mejlholm & Dalgaard, 2002), φιλέτα κρέατος (Tsigarida et al, 2000), κιμάς (Skandamis & Nychas, 2001), κ.α.

Υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών ουσιών ή πρωτεϊνών στα τρόφιμα, προστατεύουν τα βακτήρια από τη δράση των ΑΕ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ΑΕ διαλύονται στη λιπαρή φάση του τροφίμου, με αποτέλεσμα να παραμένει λιγότερη διαθέσιμη ποσότητα για να δράσει στην υδάτινη φάση που βρίσκονται τα βακτήρια (Mejlholm and Dalgaard, 2002). Αντίθετα, οι υδατάνθρακες δε φαίνεται να διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο κατά των βακτηρίων. Τέλος, η υψηλή συγκέντρωση νερού και τα επίπεδα αλατιού, διευκολύνουν τη δράση των ΑΕ (Shelef, 1983).

Ακόμη, σε τρόφιμα με χαμηλό pH, αυξάνεται επιπλέον ο υδρόβοφος χαρακτήρας των ΑΕ, με αποτέλεσμα να επιτείνεται η διάλυσή τους στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών – στόχων και κατά συνέπεια η δράση τους εναντίον αυτών (Juven et al, 1994).

Τέλος, όσον αφορά την επίδραση της ατμόσφαιρας, η αντιβακτηριακή δράση των ΑΕ φαίνεται να επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Η προφανής εξήγηση είναι ότι η περιορισμένη παρουσία του, προκαλεί λιγότερες οξειδωτικές αλλαγές στο ΑΕ. Επίσης, αναφέρεται ότι τα κύτταρα γίνονται περισσότερο ευαίσθητα στην τοξική δράση του ΑΕ, εξαιτίας του ότι η παραγωγή ενέργειας ακολουθεί την αναερόβια οδό (Paster et al, 1990). Σε έρευνα των Skandamis & Nychas (2001), διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών καθυστέρησε και ότι οι τελικοί πληθυσμοί κατεστάλησαν όταν βόειος κιμάς συσκευάστηκε σε συνθήκες TA (30% O<sub>2</sub>), σε σχέση με δείγματα που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες.

Σημαντική επίσης, είναι και η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα αιθέρια έλαια, όπως περιγράφουν αναλυτικά οι Amorati et al (2013). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα συστατικά των ΑΕ, βελτιώνουν την οξειδωτική σταθερότητα νωπού ή προμαγειρεμένου κρέατος κοτόπουλου, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη, όταν προηγηθεί προσθήκη των ΑΕ στο σιτηρέσιο των πτηνών (Botsoglou et al, 2003).

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός φυτών, βοτάνων και μπαχαρικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων. Οι Tajkarimi et al (2010), αναφέρουν ότι υπάρχουν περισσότερα από 1.340 φυτά με αντιμικροβιακά συστατικά και πάνω από 30.000 συστατικά τα οποία έχουν απομονωθεί και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων. Μεταξύ αυτών, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι το θυμάρι, η ρίγανη, το φασκόμηλο, η μέντα, η κανέλα κ.α.

#### **4.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ**

Μεταξύ των ΑΕ, η ρίγανη, ένα χαρακτηριστικό αρωματικό φυτό της μεσογειακής

κουζίνας, χρησιμοποιείται ευρύτατα τόσο σε ωμά όσο και σε μαγειρεμένα τρόφιμα, προσδίδοντας ένα ξεχωριστό αλλά ευχάριστο άρωμα και γεύση. Το ΑΕ ρίγανης έχει μελετηθεί για την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση του σε διάφορα είδη ή μοντέλα τροφίμων (Goulas & Kontominas, 2007b).

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, γένος *Origanum*. Το γένος αυτό περιλαμβάνει 38 είδη εκ των οποίων τα περισσότερα απαντούν στη Μεσόγειο. Στην Ελλάδα, η πιο γνωστή ρίγανη είναι εκείνη που ταξινομείται ως *Origanum vulgare* spp *hirtum* (Solomakos & Govaris, 2004).

Χημικές αναλύσεις του ΑΕ ρίγανης έχουν δείξει ότι αποτελείται από περισσότερο από 30 χημικές ουσίες (Σολωμάκος, 2007). Τα κύρια συστατικά του είναι οι φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη (Govaris et al, 2010), η περιεκτικότητα των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 78 – 85 %. Επίσης, ως άλλα κύρια συστατικά αναφέρονται οι υδρογονάνθρακες γ – τερπινένιο (5 %) και το π – κυμένιο (7 %), (Σολωμάκος, 2007), οι οποίες είναι οι πρόδρομες ουσίες αντίστοιχα της θυμόλης και της καρβακρόλης (Burt, 2004). Εκτός, όμως, από τις φαινολικές ουσίες και τους υδρογονάνθρακες, απαντώνται και άλλες ουσίες, όπως αλκοόλες και εστέρες σε ποσοστό 1,5 % περίπου (Σολωμάκος, 2007). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι ουσίες σε μικρές συγκεντρώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση, πιθανόν εξαιτίας συνεργού αποτελέσματος μεταξύ άλλων συστατικών (Paster, 1995).

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, το ΑΕ ρίγανης είναι δραστικό κατά ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου Gram – αρνητικών αλλά κυρίως Gram – θετικών (Mexis et al, 2009). Ο τρόπος δράσης των δύο παραπάνω κύριων φαινολικών συστατικών, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Η δομή της θυμόλης είναι παρόμοια με αυτήν της καρβακρόλης, με μόνη διαφορά τη διαφορετική θέση της υδροξυλικής ομάδας στο φαινολικό δακτύλιο. Και οι δύο ουσίες φαίνεται να επιδρούν στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, κάνοντάς την πιο διαπερατή. Επίσης, διαλύοντας την εξωτερική μεμβράνη των Gram – αρνητικών βακτηρίων, απελευθερώνουν λιποπολυσακχαρίτες και αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε ATP (Burt, 2004).

Σχετικά με τη βιολογική δράση του π – κυμενίου, όπως αναφέρει η Burt (2004), η ουσία αυτή δεν εμφανίζει αποτελεσματική αντιβακτηριακή δράση από μόνη της. Εξαιτίας, όμως, της υδροφοβικότητας του μορίου, προκαλεί διόγκωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι προκαλεί η καρβακρόλη. Έτσι, όπως αποδείχθηκε σε *vitro* μελέτες κατά του *B. cereus*, η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στο να ενσωματωθεί στην κυτταροπλασματική διπλοστοιβάδα του μικροοργανισμού, διευκολύνει πιθανότατα τη μεταφορά της καρβακρόλης σε όλη την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

#### **4.4.1 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ**

Η αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης έχει δοκιμαστεί ποικιλοτρόπως τόσο σε μοντέλα τροφίμων (*in vitro*), όσο και σε διάφορα είδη τροφίμων. Οι Baydar et al (2004), δοκίμασαν την αντιμικροβιακή δράση 2 διαφορετικών ΑΕ ρίγανης με τη μέθοδο της

διάχυσης δίσκων (disc diffusion method) και διαπίστωσαν τη δράση τους κατά δυνητικά παθογόνων και μη βακτηρίων. Επίσης, οι Burt & Reinders (2003), διαπίστωσαν την αντιμικροβιακή δράση του ΑΕ ρίγανης κατά της *E. coli* O157 : H7, με χρήση χρωματομετρικών δοκιμών μικροαραίωσης (microdillution colorimetric assays). Τέλος, η Ντόντου (2013), πειραματίστηκε με την in vitro ανάσχεση του *V. parahaemolyticus*, χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις ΑΕ ρίγανης σε θρεπτικό ζωμό TSB με προσθήκη 2% NaCl. Από τη μελέτη της προέκυψε ότι συγκέντρωση 0,4 % ΑΕ ρίγανης μείωσε τους πληθυσμούς του παθογόνου σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα από τη 2<sup>η</sup> μέχρι την 18<sup>η</sup> ώρα επώασης, ενώ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,6% , οι πληθυσμοί του παθογόνου παρέμειναν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της επώασης των 32 ωρών.

Εκτός όμως από την in vitro δράση του ΑΕ ρίγανης κατά παθογόνων, σημαντικό είναι το αποτέλεσμα που βρέθηκε από τους Mejlholm & Dalgaard (2002), κατά του *Photobacterium phosphoreum*, του κύριου ειδικού αλλοιογόνου μικροοργανισμού, των αλιευμάτων που συντηρούνται σε συνθήκες ΤΑ. Συγκεκριμένα, το ΑΕ ρίγανης, μαζί με το έλαιο κανέλας, παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση κατά του παραπάνω μικροοργανισμού, τόσο στους 2<sup>ο</sup> C όσο και στους 15<sup>ο</sup> C.

Η in vivo μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αποτελεί πιο αξιόπιστη τεχνική, αφού η δράση των υπεύθυνων παραγόντων, μπορεί να ανασταλεί από εν γένει ουσίες των τροφίμων, ελαττώνοντας έτσι, την αποτελεσματικότητα του ΑΕ (Mastromateo et al, 2010). Πολλά είναι τα παραδείγματα από τη διεθνή βιβλιογραφία προσθήκης ριγανέλαιου σε τρόφιμα, με σκοπό την αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος ή τη διερεύνηση καταστολής παθογόνων βακτηρίων.

Οι Govaris et al (2010), διαπίστωσαν ότι ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,6% είχε τόσο αντιμικροβιακή δράση κατά της *S. Enteritidis*, όσο και βελτίωση του χρόνου ζωής αλλά και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όταν προστέθηκε σε κιμά πρόβειου κρέατος. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν οι Skandamis et al (2002). Προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε μοσχαρίσιο φιλέτο σε συγκέντρωση 0,8 % προκάλεσε την αρχική μείωση του πληθυσμού της *S. Typhimurium* κατά 1 – 2 log, σε αντίθεση με τα δείγματα στα οποία δεν προστέθηκε ΑΕ, όπου ο παθογόνος μικροοργανισμός επέζησε χωρίς μείωση του πληθυσμού του.

Σε μελέτη των Koutsoumanis et al (1999), σε ταραμοσαλάτα, η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1 και 2% είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού *S. Enteritidis* σε 1 log cfu/g από 8 log cfu/g που είχε αρχικά ενοφθαλμιστεί κατά τη συντήρηση του προϊόντος σε θερμοκρασία 20<sup>ο</sup> C για 16 ημέρες. Επίσης, το ΑΕ ρίγανης αναστέλλει αποτελεσματικά, σύμφωνα με τους Skandamis & Nychas (2000), την *E. coli* O 157:H7, όταν προστεθεί σε μελιτζανοσαλάτα σε συγκέντρωση 7 – 21 μl/g.

Το ΑΕ ρίγανης επέδειξε αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes*, όταν ενοφθαλμίστηκε σε πληθυσμούς 3,5 log cfu/g σε κιμά βόειου κρέατος (Tsigarida et al., 2000). Τέλος, σημαντική είναι η διαπίστωση των Ismael et al (1990), σύμφωνα με τους οποίους το ΑΕ ρίγανης προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του *Cl. botulinum*.

#### 4.4.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ

Σύμφωνα με τους Amorati et al (2013), ως αντιοξειδωτικές ουσίες ορίζονται εκείνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να καθυστερούν την οξείδωση ενός οξειδώμενου υλικού, ακόμη κι όταν χρησιμοποιείται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με το υλικό που πρόκειται να προστατευτεί. Η ρίγανη αποτελεί μια φυσική αντιοξειδωτική ουσία (Kokkini 1994; Exarchou et al, 2002).

Έχει βρεθεί σε πολλές μελέτες, ότι η χορήγηση του ΑΕ της ρίγανης με την τροφή σε πτηνά βρέθηκε να προστατεύει το λίπος του κρέατος από την οξείδωση κατά τη διάρκεια συντήρησης του κρέατος στην ψύξη ή την κατάψυξη (Govaris et al., 2004; Papageorgiou et al., 2003; Botsoglou et al, 2002;2003). Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών με την τροφή στα ζώα αποδείχθηκε ότι είναι μια πολύ καλή τεχνική για την απορρόφηση και την ενσωμάτωση των ουσιών αυτών στις μεμβράνες των κυττάρων των ιστών, όπου δρουν εμποδίζοντας την οξείδωση (Botsoglou et al., 2002).

Οι Capecka et al (2005), προσδιόρισαν τη συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα ΑΕ ρίγανης, χρησιμοποιώντας την τεχνική των Toivonen και Sweeney (1998). Ο δείκτης της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης, που για το ΑΕ ρίγανης βρέθηκε 95%, προσδιόριζε την εκατοστιαία αναλογία της αναστολής της υπεροξειδωσης λινολεϊκού οξέος που προκαλούνταν από τα εκχυλίσματα φυτών σε σχέση με την αντίστοιχη από άλλο μίγμα – μάρτυρα αντίδρασης.

Τέλος, αναφέρεται ότι ενώ οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης οφείλονται κυρίως στις φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη που περιέχει, κι άλλα συστατικά, συνεπικουρούν στο μέγιστο αποτέλεσμα, όπως το ροσμαρινικό οξύ, το π – κυμένιο κλπ (Σολωμάκος, 2007).

#### 4.4.3 ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ

Το ΑΕ της ρίγανης αναφέρεται επίσης ότι παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιμυκητιακή δράση. Δρα ανασταλτικά κατά των μυκήτων *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Penicillium* spp (Venturini et al, 2002), ενώ φαίνεται να περιορίζει σημαντικά την παραγωγή των μυκοτοξινών και ειδικότερα των αφλατοξινών στα τρόφιμα. Τέλος, όταν το ΑΕ ρίγανης προστέθηκε σε συγκέντρωση 2 μl/ml ανέστειλε πλήρως in vitro την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και περιόρισε την παραγωγή αφλατοξινών (El-Baroty, 1997). Επίσης, αναφέρεται ότι το ριγανέλαιο σε συγκεντρώσεις 250 – 400 mg/ml, αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium digitatum*, ενώ σε συγκέντρωση 250 mg / ml, αναστέλλει την σπορογονία των κονιδίων του (Holey & Patel, 2005).

Η αντιμυκητιακή δράση του οφείλεται στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλικής ομάδας των φαινολικών συστατικών με ενεργά σημεία των ενζύμων στόχων των μυκήτων (Daferera et al., 2000).

## 4.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ

Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών στη βιβλιογραφία σχετικά με την αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση του ΑΕ ρίγανης και την επακόλουθη αύξηση του χρόνου ζωής διαφόρων τροφίμων, λιγοστά είναι τα δεδομένα της δράσης του σε αλιεύματα (Goulas & Kontominas, 2007b). Όμως, τα τελευταία 15 χρόνια παρουσιάζεται μία αύξηση του ενδιαφέροντος της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας αλλά και της βιομηχανίας τροφίμων στη χρήση φυσικών αντιβακτηριακών ουσιών, συνέπεια της ανάλογης επιθυμίας και τάσης των καταναλωτών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση των ΑΕ περιορίζεται εξαιτίας του δυνατού αρώματος και της γεύσης τους, που επηρεάζει τα τρόφιμα. Για το λόγο αυτό, πολλές φορές η συντηρητική ικανότητα τους μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων παράλληλα με άλλες τεχνολογίες, όπως πχ με συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλή δόση ακτινοβολήσης και με συσκευασία σε ΤΑ (Mexis et al, 2009).

Οι Mexis et al (2009), διαπίστωσαν διπλασιασμό του χρόνου ζωής φιλέτων πέστροφας συντηρημένων σε αερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία ψύξης. Το προϊόν με το ΑΕ σε συγκέντρωση 0,4 %, παρέμεινε οργανοληπτικά αποδεκτό μέχρι την 7 – 8<sup>η</sup> ημέρα, ενώ ο μάρτυρας απορρίφθηκε την 4<sup>η</sup> ημέρα. Διπλασιασμό του χρόνου ζωής (από 5 – 6 ημέρες σε 10 – 11), διαπιστώθηκε επίσης από τους Giatrakou et al (2008), όταν φιλέτα ξιφία ενοφθαλμίστηκαν με ΑΕ ρίγανης συγκέντρωσης 0,1 %, συγκριτικά με αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Παρομοίως, οι Mahmoud et al (2004), διαπίστωσαν την αντιβακτηριακή δράση των 2 κύριων συστατικών του ΑΕ ρίγανης σε φιλέτα κυπρίνου. Η εμφάνιση των φιλέτων σε διάλυμα 1 % καρβακρόλης και θυμόλης, προκάλεσε καθυστέρηση της βακτηριακής ανάπτυξης και επέκταση του χρόνου ζωής από 4 σε 12 ημέρες, όταν συντηρήθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (5° C) και σε αερόβιες συνθήκες.

Οι Atrea et al (2009), διαπίστωσαν ότι χταπόδια συσκευασμένα υπό κενό διατηρήθηκαν κατά 8 και 17 ημέρες περισσότερο σε θερμοκρασία 4° C, όταν έγινε προσθήκη 0,2 και 0,4 % ΑΕ ρίγανης, αντίστοιχα.

Σε έρευνα των Goulas & Kontominas (2007b), αλατισμένα φιλέτα τσιπούρας, συσκευασμένα σε συνθήκες ΤΑ (40% CO<sub>2</sub> / 30% O<sub>2</sub> / 30% N<sub>2</sub>) και συντηρημένα υπό ψύξη, παρέτειναν το χρόνο ζωής τους κατά 5 – 6 ημέρες, όταν προστέθηκε 0,8 % ΑΕ ρίγανης, διατηρώντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους μέχρι 33 ημέρες (συγκριτικά με 27 – 28 ημέρες χωρίς ΑΕ). Επίσης, σε φιλέτα μπακαλιάρου παρατάθηκε ο χρόνος ζωής σε συσκευασία ΤΑ (60% CO<sub>2</sub> / 40% N<sub>2</sub>) από 11 – 12 ημέρες σε 21 – 26, όταν έγινε προσθήκη ριγανέλαιου σε συγκέντρωση 0,05 %, μειώνοντας δραστικά τους πληθυσμούς του *P. phosphoreum* (Mejlholm & Dalgaard, 2002).

Ακόμη, η συνδυαστική δράση συσκευασίας ΤΑ και προσθήκης ΑΕ ρίγανης σε επίπεδα 0,2 και 0,4 %, δοκιμάστηκε σε αλατισμένα φιλέτα πέστροφας. Τα δείγματα με την

προσθήκη 0,2 % ΑΕ ρίγανης, διατηρήθηκαν 7 – 8 ημέρες περισσότερο στους 4° C συγκριτικά με τα δείγματα χωρίς προσθήκη ριγανέλαιου. Οι ερευνητές διαπίστωσαν επίσης ότι η συγκέντρωση 0,4 % ΑΕ ρίγανης, αποδείχθηκε ακατάλληλη για το υπόψη τρόφιμο, λόγω της ισχυρής οσμής, όπως καταδείχθηκε κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση (Pyrgotou et al, 2010).

Η αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης μελετήθηκε, επίσης, από τους Giatrakou et al (2008), σε φιλέτα ξιφία. Οι ερευνητές, πρόσθεσαν 0,1 % του παραπάνω συστατικού και διαπίστωσαν, βασισμένοι σε μικροβιολογικά κριτήρια και οργανοληπτική αξιολόγηση, ότι η διάρκεια ζωής των φιλέτων αυξήθηκε από 5 – 6 ημέρες σε 10 – 11 , όταν συντηρήθηκε σε αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 4° C. Στην ίδια έρευνα ελέγχθηκε η συνεργός δράση του ΑΕ με τη συσκευασία σε ΤΑ (50% CO<sub>2</sub> / 5 % O<sub>2</sub> / 45 % N<sub>2</sub>). Η αξιολόγηση έδειξε ότι η ΤΑ παρέτεινε το χρόνο ζωής μόλις κατά 2 – 3 ημέρες, κρίνοντας μη αποδεκτά τα δείγματα την 14<sup>η</sup> ημέρα.

## 4.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ

Μεγάλος αριθμός συστατικών των ΑΕ έχει καταγραφεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για χρήση ως αρωματικές ύλες στα τρόφιμα, τα οποία θεωρείται ότι δεν παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Σύμφωνα με τους ισχύοντες Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) (ΕΚ 1565/2000, ΕΚ 622/2002), για να καταγραφεί μια νέα ουσία στους επίσημους καταλόγους των αρωματικών ουσιών, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν τοξικολογικές και μεταβολικές μελέτες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και δαπανηρές. Μεταξύ αυτών των ουσιών συμπεριλαμβάνονται η καρβακρόλη και η θυμόλη, ενώ κάποιες άλλες ουσίες, όπως η εστραγκόλη και η μεθυλική ευγενόλη, έχουν διαγραφεί από τη σχετική λίστα της ΕΕ, εξαιτίας της γενοτοξικότητάς τους (Burt, 2004).

Οι ουσίες οι οποίες θα εγκριθούν από την ΕΕ, θα εμφανιστούν αυτόματα στον κατάλογο EAFUS (Everything Added to Food in the US'), πράγμα που σημαίνει ότι ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – FDA), έχει κατατάξει τις ουσίες αυτές ως πρόσθετα τροφίμων ή ως γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (Generally Recognised As Safe – GRAS) (Σολωμάκος, 2007).

Η θυμόλη και η καρβακρόλη, αν και *in vitro* φαίνεται να εμφανίζουν ήπια προς μέτρια τοξική επίδραση σε κυτταρικό επίπεδο, *in vivo* φαίνεται να μην εμφανίζουν σημαντικό πρόβλημα. Έτσι, στις ΗΠΑ, τόσο η καρβακρόλη, όσο και τα βότανα και καρυκεύματα που την περιέχουν, έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS, από τους ειδικούς εκπαιδευμένους δοκιμαστές του Οργανισμού Παρασκευαστών Αρωμάτων και Εκχυλισμάτων (Ultee, 2000).

Συνίσταται λοιπόν, να πραγματοποιούνται περισσότερο ασφαλείς και πιο ενδεδειγμένες μελέτες, σε περίπτωση που τα ΑΕ χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε μεγαλύτερες από τις παρούσες συγκεντρώσεις (Burt, 2004).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μύδια καλλιέργειας (*Mytilus galloprovincialis*) από την περιοχή του Μακρύγιαλου (Περιφερειακή Ενότητα Πιερίας), αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του ΠΘ, υπό ψύξη.

Η παρασκευή των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τους (Caglac et al, 2008). Έτσι, κατά την παραλαβή εξετάστηκε η νωπότητα και βιωσιμότητά τους. Τα νεκρά μύδια απομακρύνθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα εκπλύθηκαν και αφαιρέθηκε η σάρκα τους με τη χρήση στείρου νυστεριού.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκαφίδια (16 x 20,5 x 4,8 cm) (UBRT, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passirana di Rho, Italy) και τοποθετήθηκαν 200 g σάρκας μυδιών/σκαφίδιο. Όλα τα δείγματα σφραγίστηκαν σε κλειστική μηχανή (model TSM105 Food tech, Minipack-torre S.p.A., Dalmine, Italy) με πλαστικό φιλμ (OPET, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passirana di Rho, Italy).

Για την επίτευξη του σκοπού του πειράματος, δημιουργήθηκαν 2 ομάδες δειγμάτων :

- Ομάδα Α : Μικροβιολογικές εξετάσεις
- Ομάδα Β : Οργανοληπτικός έλεγχος

Κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες περιελάμβανε τις εξής 4 παρτίδες δειγμάτων :

- Παρτίδα Α : Συσκευασία σε συνθήκες ΤΑ σύνθεσης 70% CO<sub>2</sub> και 30% N<sub>2</sub> χωρίς προσθήκη ΑΕ ρίγανης (MAP CON).
- Παρτίδα Β : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες, χωρίς προσθήκη ΑΕ ρίγανης (AIR CON).
- Παρτίδα Γ : Συσκευασία σε συνθήκες ΤΑ σύνθεσης 70% CO<sub>2</sub> και 30% N<sub>2</sub> με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% (MAP OR).
- Παρτίδα Δ : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% (AIR OR).

Το ΑΕ ρίγανης που χρησιμοποιήθηκε για τους πειραματισμούς, ήταν εμπορικό σκεύασμα, της εταιρείας ΕΚΟΦΑΡΜ ΕΛΛΑΣ ΑΒΕΕ (Κιλκίς). Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,2 % (v/wt) της ποσότητας του τροφίμου. Η συγκέντρωση αυτή



προσδιορίστηκε σε προηγούμενο προκαταρκτικό πείραμα και βρέθηκε να είναι η μέγιστη που ήταν οργανοληπτικά αποδεκτή στα μύδια.

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του ΑΕ ρίγανης και της συσκευασίας σε ΤΑ, στα δείγματα της Ομάδας Α ενοφθαλμίστηκε *V. parahaemolyticus* σε πληθυσμούς περίπου 4 log cfu/g σάρκας μυδιών. Πρέπει να επισημανθεί ότι στα δείγματα της ομάδας Β που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του οργανοληπτικού ελέγχου δεν έγινε ενοφθαλμισμός του παθογόνου μικροοργανισμού.

Τέλος, όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $4 \pm 1^\circ \text{C}$ , μέχρι την ημέρα απόρριψης των δειγμάτων των αντίστοιχων παρτίδων, ύστερα από τον οργανοληπτικό έλεγχο.

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις των δειγμάτων όλων των παρτίδων της ομάδας Α πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΠΘ, ενώ ο οργανοληπτικός έλεγχος υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ.

## 5.2 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η οργανοληπτική εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν καθημερινά κατά την διάρκεια της συντήρησής τους στους  $4^\circ \text{C}$ . Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από 7μελή ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Σε κάθε ημέρα οργανοληπτικού ελέγχου ζητούνταν από τους δοκιμαστές να αξιολογήσουν την οσμή και τη γενική αποδοχή σε νωπά και θερμικά επεξεργασμένα μύδια και επιπλέον τη γεύση στα θερμικά επεξεργασμένα.

Δείγμα μυδιών παρουσιάστηκε μεμονωμένα σε κάθε δοκιμαστή (20 g περίπου για τον καθένα), σε πλαστικό πιάτο, καλυμμένα με αλουμινόχαρτο, σε τυχαία σειρά, κωδικοποιημένα με τριψήφιους αριθμούς. Παράλληλα, παρουσιάστηκαν στους δοκιμαστές δείγματα μυδιών που διατηρούνταν στην κατάψυξη ( $-30^\circ \text{C}$ ), μετά την απόψυξη τους σε θερμοκρασία δωματίου, ως δείγματα αναφοράς.

Η θερμική επεξεργασία των εξεταζόμενων δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Masniyom et al (2012). Πιο αναλυτικά, τα δείγματα, τυλιγμένα σε φύλλο αλουμινίου, μαγειρεύτηκαν σε ατμό μέχρι η θερμοκρασία του πυρήνα τους να φτάσει τους  $70^\circ \text{C}$ . Στη συνέχεια, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να κρυώσουν και παρουσιάστηκαν στους κριτές για αξιολόγηση σε θερμοκρασία περίπου  $25 - 28^\circ \text{C}$ .

Για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε 9βάθμια κλίμακα (από το 1 έως το 9), σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Mailgaad et al, (1999). Οι χαρακτηρισμοί που αντιστοιχούσαν στον κάθε βαθμό της χρησιμοποιηθείσας κλίμακας ήταν από Εξαιρετικά ευχάριστο (9) έως Εξαιρετικά δυσάρεστο (1).

Το δείγμα θεωρούνταν ως μη αποδεκτό, όταν λάμβανε αποτέλεσμα  $< 5$ , έστω και για ένα οργανοληπτικό χαρακτηριστικό, τουλάχιστον από το 50% των κριτών.

Η οργανοληπτική εξέταση χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί το χρονικό σημείο στο οποίο τα δείγματα δεν θα είναι πλέον αποδεκτά. Την ημέρα όπου τα δείγματα αξιολογούνταν ως μη αποδεκτά κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο, ήταν η τελευταία που γίνονταν μικροβιολογικές εξετάσεις στη συγκεκριμένη παρτίδα δειγμάτων.

### 5.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στα δείγματα των παρτίδων της ομάδας Α, πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές εξετάσεις την ημέρα 0 και στη συνέχεια κάθε 2 ημέρες, μέχρι την απόρριψη των δειγμάτων κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο, για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των *Enterobacteriaceae* (EB), των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria – LAB) και του *V. parahaemolyticus*.

Την ημέρα 0 πραγματοποιήθηκε επιπλέον μικροβιολογικός έλεγχος των μυδιών, ώστε να καθοριστεί η κατάσταση της πρώτης ύλης. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των *Enterobacteriaceae* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επίσης, στην πρώτη ύλη έγινε ανίχνευση για παρουσία *Vibrio* spp, σύμφωνα με τη πρότυπη μέθοδο ISO 21872 – 1 : 2007.

Σε κάθε δειγματοληψία, ποσότητα 25 g σάρκας μυδιών από κάθε παρτίδα δειγμάτων ζυγίζονταν 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, γινόνταν δε ενοφθαλμισμός σε διπλά τρυβλία.

#### OMX – Ψυχρόφιλα βακτήρια

Ο προσδιορισμός της OMX και των ψυχρόφιλων βακτηρίων, 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.

### **Οξυγαλακτικά βακτήρια**

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar – LAB M), με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου της επιστιβάδευσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα, ανεξαρτήτου μεγέθους και σχήματος, ύστερα από επώαση στους  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  για  $72 \pm 3$  ώρες.

### ***V. parahaemolyticus***

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εκλεκτικού θρεπτικού υλικού Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS agar – LAB M), με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Από την αρχική και την επόμενη δεκαδική αραίωση, μεταφέρονταν ποσότητα 0,1 ml σε 1 τρυβλίο TCBS agar.

Ύστερα από επώαση 18 – 24 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  $4 \pm 1^\circ \text{C}$ .

## **5.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

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 6 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 6.1 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου, τα δείγματα AIRCON παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη. Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν σε συμφωνία με μελέτες άλλων ερευνητών σε μύδια. Συγκεκριμένα, οι Masniyom et al (2012), σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πράσινα μύδια (*Perna viridis*), αναφέρουν ότι τα δείγματα σάρκας μυδιών που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 4° C, παρέμειναν αποδεκτά μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Ομοίως, ο Goulas (2008) βρήκε ότι σάρκα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) που συντηρήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες ήταν οργανοληπτικά αποδεκτή μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη. Οι Caglac et al (2008) αναφέρουν ότι τα μύδια σε αερόβιες συνθήκες από την 5<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη ήταν μη αποδεκτά οργανοληπτικά.

Τα μύδια που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (AIROR) παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4° C. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται από την Ντόντου (2013) για σάρκα μυδιών που συντηρήθηκε σε αερόβιες συνθήκες για 14 ημέρες στην ψύξη. Οι Harpaz et al (2003), παρατήρησαν ότι η προσθήκη 0,05 % ΑΕ θυμαριού ή/και ρίγανης αύξησε τη διάρκεια ζωής ασιατικών λαβρακιών (*Lates calcarifer*) από 12 ημέρες που ήταν στα δείγματα χωρίς την προσθήκη ΑΕ, σε 33 ημέρες κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε συνθήκες ΤΑ χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (MAPCON) παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι την 13<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης τους στην ψύξη. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται από τους Caglac et al (2008). Συγκεκριμένα, μύδια τα οποία συσκευάστηκαν σε συνθήκες ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 65% - N<sub>2</sub> : 35%) και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία ψύξης, παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 12<sup>η</sup> ημέρα.

Τέλος, ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε ότι η συσκευασία των δειγμάτων σε ΤΑ με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2%, παρέτεινε το χρόνο διάρκειας ζωής τους, κατά 12 ημέρες σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ κατά 6 και 5 ημέρες σε σχέση με τα δείγματα που προστέθηκε μόνο το ΑΕ ρίγανης ή συσκευάστηκαν μόνο σε συνθήκες ΤΑ, αντίστοιχα. Έτσι, τα δείγματα παρέμειναν αποδεκτά μέχρι και την 18<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στην ψύξη. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για τη συνεργό δράση της συσκευασίας σε ΤΑ και της προσθήκης ΑΕ ρίγανης σε μύδια. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άλλο είδος αλιευμάτων (αλατισμένα φιλέτα πέστροφας), συσκευασμένα σε ΤΑ, διαπιστώθηκε σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, μία παράταση του χρόνου ζωής τους κατά 7 – 8 ημέρες, όταν προστέθηκε ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2 % (Pyrgotou et al, 2010).

## 6.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι πληθυσμοί για την OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των εντεροβακτηρίων, του *V. parahaemolyticus* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, στις 4 διαφορετικές παρτίδες δειγμάτων μυδιών (AIRCON, AIROR, MAPCON και MAPOR), παρουσιάζονται στα διαγράμματα 2 έως 6.

Ο αρχικός πληθυσμός για την OMX, τα ψυχρόφιλα βακτήρια και τα *Enterobacteriaceae* στα δείγματα, ήταν περίπου 4, 3,3 και 2,2 log cfu/g αντίστοιχα. Η μικροβιολογική κατάσταση της πρώτης ύλης ανταποκρίνεται στην καλή ποιότητα σύμφωνα με τα κριτήρια που καθορίζονται από τον ICMSF (1986). Οι μικροβιακοί πληθυσμοί της πρώτης ύλης, βρέθηκαν να είναι παρόμοιοι, με τους αντίστοιχους πληθυσμούς δειγμάτων μυδιών, σε άλλες έρευνες (Masniyom et al. 2012, Caglac et al, 2008, Goulas 2008, Goulas et al, 2004, Pastoriza et al, 2004).

### 6.2.1 AIRCON

Οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* στους μάρτυρες εμφάνισαν ανάπτυξη στη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Οι αρχικοί πληθυσμοί της OMX (4 log cfu/g), των ψυχρόφιλων βακτηρίων (3,3 log cfu/g), των οξυγαλακτικών βακτηρίων (3,1 log cfu/g) και των εντεροβακτηρίων (2,2 log cfu/g) βρίσκονται σε συμφωνία με αυτούς που αναφέρονται από άλλους ερευνητές σε μύδια 1 ημέρα μετά από την συλλογή τους (Caglac et al. 2008, Goulas et al. 2004, Goulas 2008, Masniyom et al. 2012). Έτσι, οι αρχικοί πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων στους μάρτυρες αναπτύχθηκαν και έφθασαν τους 7,6 log cfu/g, 6,5 log cfu/g, 5,7 log cfu/g και 4,3 log cfu/g στην 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στην ψύξη, αντίστοιχα. Μετά την 8<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης των μαρτύρων στους 4 °C σταμάτησε η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, αφού δεν ήταν αποδεκτά κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων των μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε την 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους έδειξε ότι οι πληθυσμοί της OMX ήταν μεγαλύτεροι από 7 log cfu/g που θεωρείται το ανώτερο όριο αποδοχής των αλιευμάτων (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF 1986).

Τέλος, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* στα δείγματα AIRCON δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ( $P < 0.05$ ) μεταβολή κατά το παραπάνω χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, την 6<sup>η</sup> ημέρα, καταμετρήθηκαν πληθυσμοί της τάξης των 3,5 log cfu/g. 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.

### 6.2.2 AIOR

Οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των *Enterobacteriaceae*, του *V. parahaemolyticus* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% παρουσιάζονται στα διαγράμματα 2 έως 6, αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2%) οι αρχικοί πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* μειώθηκαν κατά 0,1 – 0,4 log cfu/g τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 7,3, 6,3 και 4,7 log cfu/g, αντίστοιχα στο τέλος της συντήρησης (14<sup>η</sup> ημέρα).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, οι αντίστοιχοι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* που καταμετρήθηκαν από τη Ντόντου (2013) την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης της σάρκας μυδιών σε αερόβιες συνθήκες με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2%, ήταν περίπου 7, 6,5 και 3,1 log cfu/g, αντίστοιχα.

Οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* στα μύδια που προστέθηκε το αιθέριο έλαιο (0,2%) παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης, από τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μικρός αριθμός αναφορών σχετικά με τη δράση ΑΕ ρίγανης σε μύδια. Ωστόσο, παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης, αναφέρονται σε μελέτες άλλων ερευνητών σε διάφορα αλιεύματα. Οι Mexis et al (2009), αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,4% σε φιλέτα πέστροφας (*Onchorynchus mykiss*) που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, παρουσίασε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερους ( $P < 0.05$ ) πληθυσμούς για την OMX και τα *Enterobacteriaceae* σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4° C. Ομοίως, οι Atrea et al (2009), μελετώντας την επίδραση προσθήκης ΑΕ ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,2% και 0,4% σε χταπόδι (*Octopus vulgaris*) που συσκευάστηκε υπό κενό, διαπίστωσε την ανάπτυξη σημαντικά χαμηλότερων ( $P < 0,05$ ) πληθυσμών OMX και *Enterobacteriaceae* σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη.

Ακόμη, οι Giatrakou et al (2008), μελετώντας τη δράση του ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1%, σε φιλέτα ξιφία (*Xiphias gladius*), διαπίστωσε επίσης, στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότερους πληθυσμούς OMX και εντεροβακτηριοειδών σε αερόβιες συνθήκες, σε σχέση με το μάρτυρα.

Η αντιμικροβιακή δράση του ΑΕ ρίγανης, όπως αναφέρθηκε, οφείλεται στα φαινολικά συστατικά που περιέχει, και κυρίως τη θυμόλη και την καρβακρόλη. Ο αντιμικροβιακός μηχανισμός δράσης τους, αποδίδεται στην προσβολή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της, την

απώλεια ζωτικών συστατικών και ιόντων και τέλος τη λύση του κυττάρου (Burt, 2004). Έτσι, διάφοροι ερευνητές μελέτησαν την απευθείας δράση των φαινολικών συστατικών. Οι Mahmoud et al (2004), διαπίστωσαν ότι η εμφάνιση φιλέτων κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) σε διάλυμα φαινολικών συστατικών καρβακρόλης και θυμόλης, συγκέντρωσης 1 %, παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εμφανίζοντας σημαντικά χαμηλότερους ( $P < 0,05$ ) πληθυσμούς OMX, συγκριτικά με τους μάρτυρες σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων, τόσο στους 5 όσο και στους 10° C.

Παρόμοια αποτελέσματα έχει δείξει η δράση κι άλλων ΑΕ που προστέθηκαν σε αλιεύματα. Σε μελέτη που διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης κουρκούμης και λεμονόχορτου σε συγκέντρωση 0,5% σε πράσινα μύδια (*Perna viridis*) κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες, διαπιστώθηκε ότι στα δείγματα των μυδιών με την προσθήκη των ΑΕ, οι πληθυσμοί της OMX και των ψυχρόφιλων βακτηρίων παρέμειναν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι σε σχέση με τους μάρτυρες καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4° C (Masniyom et al, 2012).

Οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα AIROR, τη 14<sup>η</sup> ημέρα που κρίθηκαν οργανοληπτικά μη αποδεκτά, έφτασε τους 6,1 log cfu/g. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης των δειγμάτων, οι πληθυσμοί στα δείγματα AIRCON και AIROR δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ). Η ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη δράση του ΑΕ ρίγανης, οφείλεται στην ικανότητά τους να αναγεννούν ATP από άλλες πηγές. Επίσης, είναι πιθανό ότι η μεγάλη ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών, μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη ικανότητα να ανταπεξέρχονται σε συνθήκες οσμωτικού στρες και να ανταποκρίνονται πιο αποτελεσματικά στη διαταραχή των ιόντων K, που προκαλείται από διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες (Holley & Pattel, 2005).

Τα αποτελέσματα μας σχετικά με τη επίδραση του ΑΕ ρίγανης στα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα άλλων ερευνητών. Οι Giatrakou et al (2008), διαπίστωσαν ότι οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φιλέτα ξιφία που διατηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες με την προσθήκη 0,1 % ΑΕ ρίγανης δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τους μάρτυρες. Επίσης, σε μελέτη των Kykkidou et al (2009), σχετικά με την αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ θυμαριού, τα φαινολικά συστατικά του οποίου είναι ίδια με αυτά του ΑΕ ρίγανης, σε φιλέτα ξιφία (*Xiphias gladius*), διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες υπό ψύξη με την προσθήκη ΑΕ, δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τους μάρτυρες (αερόβια συντήρηση χωρίς προσθήκη ΑΕ θυμαριού).

Το ΑΕ ρίγανης παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus*. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 5, ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου μειώθηκε δραστικά από τη 2<sup>η</sup> κιόλας ημέρα συντήρησης σε επίπεδα μικρότερα των 10 cfu/g σάρκας. Το ίδιο ισχυρό αντιμικροβιακό αποτέλεσμα του ΑΕ ρίγανης σε μύδια, στη συγκέντρωση του 0,2 %, παρατήρησε η Ντόντου (2013). Οι Lin et al (2005), διαπίστωσαν την αντιβακτηριακή δράση φαινολικών συστατικών ρίγανης (0,1 mg / ml) κατά του *V. parahaemolyticus*, σε φιλέτα μπακαλιάρου κατά 0,5 log cfu / g, σε 8 ημέρες. Η διαφορά αυτή ενδεχομένως να οφείλεται είτε στη χαμηλότερη συγκέντρωση του ΑΕ που χρησιμοποιήθηκε, είτε στο γεγονός ότι η υψηλή λιποπεριεκτικότητα του ψαριού λειτούργησε προστατευτικά στο βακτήριο.

Ο προστατευτικός ρόλος της λιπαρής φάσης οφείλεται αφενός μεν στο ότι το λίπος μπορεί προστατεύσει τα βακτήρια, αφετέρου σε στο γεγονός ότι μέρος του αντιμικροβιακού παράγοντα μπορεί να απορροφηθεί, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστική συγκέντρωσή του και επομένως η αποτελεσματικότητά του κατά των βακτηρίων στην υδάτινη φάση (Holley & Patten, 2005).

Ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ΑΕ ρίγανης κατά του *V. parahaemolyticus*, διαπιστώθηκε in vitro από τον Bauchat (1976). Μάλιστα, το ΑΕ ρίγανης έδειξε τη μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση σε σύγκριση με ΑΕ άλλων φυτών (θυμαριού και δάφνης), η οποία ήταν μάλιστα δοσοεξαρτώμενη.

### 6.2.3 MAPCON

Τα δείγματα μυδιών σε συσκευασία σε ΤΑ χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης, παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 13<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης (14<sup>η</sup> ημέρα) έδειξαν ότι οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων βακτηρίων, των *Enterobacteriaceae* και των οξυγαλακτικών, ήταν περίπου 7, 6,1, 6 και 6,2 log cfu/g. Σε μελέτη των Goulas et al (2005), οι οποίοι δοκίμασαν την επίδραση διαφόρων συνθηκών ΤΑ, διαπιστώθηκε ότι σε παρεμφερή με της παρούσα εργασία σύνθεση αερίων (CO<sub>2</sub> : 80% - N<sub>2</sub> : 20%), τα μύδια παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι την 14<sup>η</sup> – 15<sup>η</sup> ημέρα, ενώ οι πληθυσμοί της OMX, των εντεροβακτηριοειδών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, την ημέρα της απόρριψης, βρέθηκαν να είναι παρόμοιοι και συγκεκριμένα  $7 \pm 0,3$ , 5 έως  $6,2$  και  $5,2 \pm 0,2$  log cfu / g, αντίστοιχα. Επίσης, σε μελέτη των Caglac et al (2008), διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος ζωής μυδιών σε ΤΑ σύνθεσης CO<sub>2</sub> : 80% - N<sub>2</sub> : 20%, το προϊόν παρέμεινε οργανοληπτικά αποδεκτό μέχρι την 12<sup>η</sup> ημέρα, οι δε πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν αντίστοιχα 6,80, 6,78 και 5,42 log cfu / g.

Οι πληθυσμοί της OMX και των ψυχρόφιλων βακτηρίων στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε ΤΑ στην ψύξη, ήταν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι από τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, συγκριτικά με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στην ψύξη. Την ίδια αντιμικροβιακή δράση διαπίστωσαν κι άλλοι ερευνητές κατά τη συντήρηση αλιευμάτων (μύδια, γαρίδες, καλαμάρια, ρέγγες, σαρδέλες) σε ΤΑ παρόμοιας σύνθεσης (Bouletis et al, 2014, Caglac et al, 2008, Goulas et al, 2004, Ozogul et al, 2004, Arvanitoyiannis et al, 2001, Ozogul et al, 2000, κ.α).

Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανασταλτική επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του CO<sub>2</sub>, στη μικροβιακή ανάπτυξη, των αερόβιων, των ψυχρόφιλων και των Gram αρνητικών βακτηρίων, εξαιτίας της επιμήκυνσης της φάσης προσαρμογής, αλλά και μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης (Sivertsvik et al. 2002, Ozogul et al, 2000, Devere and Boskou 1996). Ο κυριότερος μηχανισμός δράσης της συσκευασίας σε ΤΑ, είναι η τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του τροφίμου με αντικατάσταση μέρους του O<sub>2</sub> με το CO<sub>2</sub>. Έτσι, καθυστερεί η αλλοίωση των αλιευμάτων τόσο επιδρώντας στη μικροβιακή ανάπτυξη όσο και στην οξείδωση των λιπαρών οξέων.



Από την άλλη, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στην επίδραση του CO<sub>2</sub>, σύμφωνα με τους Caglac et al (2008). Ανάλογα στην παρούσα εργασία, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ), μεταξύ των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων AIRCON και MAPCON. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν από τους Goulas et al (2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε CO<sub>2</sub>. Παράλληλα η παραγωγή βακτηριοσινών και γαλακτικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αφενός ερμηνεύει την αναστολή της ανάπτυξης των άλλων βακτηρίων, αφετέρου συμβάλλει στην επικράτησή τους κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων (Goulas et al, 2008). Έτσι, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα μυδιών MAPCON, δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τους μάρτυρες (AIRCON) στους 4° C, από τη 2<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησής τους.

Ομοίως, οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* φάνηκε να μην επηρεάζονται σημαντικά ( $P > 0,05$ ) κατά τη συντήρηση των δειγμάτων σε TA. Ανάλογα, οι Bouletis et al (2014), διαπίστωσαν ότι οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* σε δείγματα θράψαλων που συσκευάστηκαν σε TA ίδιας σύνθεσης με τη δική μας έρευνα, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ), παρά μόνο τη 10<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους υπό ψύξη.

Τα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, λόγω της υποχρεωτικά αναερόβιας και παράλληλα ψυχρότροφης φύσης τους, μπορούν να αναπτύσσονται σε τρόφιμα διατηρημένα υπό ψύξη σε σημαντικούς πληθυσμούς, ανεξαρτήτως της συσκευασίας των τροφίμων (αερόβια συντήρηση, συντήρηση υπό κενό, συντήρηση σε TA), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε συνθήκες TA οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* (4 log cfu/g) παρουσίασαν μείωση κατά 0,8 log cfu/g τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στην ψύξη. Στη συνέχεια, οι πληθυσμοί του παθογόνου παρέμειναν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς των μαρτύρων AIRCON μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C. Τη 14<sup>η</sup> ημέρα οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* στα δείγματα MAPCON βρέθηκαν 2,3 log cfu/g. Σε συμφωνία με τη δική μας μελέτη, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε μελέτη των Provincial et al (2013), μειώθηκαν κατά τη συντήρηση φιλέτων τσιπούρας συσκευασμένων σε TA (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%), όταν συντηρήθηκαν υπό ψύξη (0 και 4° C).

Συγκρίνοντας την επίδραση της TA στα δείγματα MAPCON με την αντίστοιχη δράση του ΑΕ ρίγανης στα δείγματα AIROR, διαπιστώνουμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ), στους πληθυσμούς της OMX, των ψυχρόφιλων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αντίθετα, οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* και του *V. parahaemolyticus*, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) στα παραπάνω δείγματα, αναδεικνύοντας τη σημαντική αντιμικροβιακή δράση του ΑΕ ρίγανης.

#### 6.2.4 MAPOR

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση, τα δείγματα μυδιών σε TA με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (MAPOR), παρέμειναν αποδεκτά μέχρι και την 18<sup>η</sup> ημέρα

συντήρησης στους 4° C, 12 ημέρες περισσότερο από τους μάρτυρες. Την ημέρα απόρριψης (20<sup>η</sup> ημέρα), οι πληθυσμοί της OMX και των ψυχρόφιλων βακτηρίων βρέθηκαν 6,81 και 6,01 log cfu / g, αντίστοιχα, ενώ των *Enterobacteriaceae* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ήταν 4,87 και 6,2 log cfu/g, αντίστοιχα,. Ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού στα υπόψη δείγματα, μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα από τη 2<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης τους υπό ψύξη.

Όλοι οι μικροβιακοί πληθυσμοί των δειγμάτων MAPOR, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0,05$ ), συγκριτικά με τους μάρτυρες (AIRCON), μέχρι την ημέρα απόρριψης των τελευταίων. Επίσης, οι πληθυσμοί της OMX των δειγμάτων MAPOR ήταν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους για την OMX των δειγμάτων AIOR από την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και από αυτούς των δειγμάτων MAPCON, από τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, υπό ψύξη. Ακόμη, οι πληθυσμοί των ψυχρόφιλων βακτηρίων στα δείγματα MAPOR βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι από τους πληθυσμούς των ψυχρόφιλων βακτηρίων των δειγμάτων AIOR και MAPCON, από την 4<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα.

Όσον αφορά τους πληθυσμούς των *Enterobacteriaceae* επιβεβαιώθηκε η αντιμικροβιακή δράση του ΑΕ ρίγανης και η ουδέτερη στάση της ΤΑ, αφού οι πληθυσμοί τους στα δείγματα MAPOR ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0,05$ ) από τους αντίστοιχους των δειγμάτων MAPCON, κάτι που δε διαπιστώθηκε συγκριτικά με τα δείγματα AIOR, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων.

Τέλος, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0,05$ ) στα δείγματα MAPOR, από την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στη θερμοκρασία 0 – 4° C, σε σχέση με τα δείγματα AIOR – MAPCON.

Στα δείγματα MAPOR οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* (4 log cfu/g) παρουσίασαν μείωση σε επίπεδα μικρότερα των 10 cfu/g σάρκας από τη 2<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη, όπως και στα δείγματα AIOR. Οι πληθυσμοί του παθογόνου παρέμειναν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς των δειγμάτων MAPCON, ενώ δε διέφεραν από τους αντίστοιχους των δειγμάτων AIOR.

Η συνεργός δράση συσκευασίας σε ΤΑ και προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε μύδια, δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές πειραματίστηκαν στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής διαφόρων αλιευμάτων, εφαρμόζοντας τη θεωρία των εμποδίων (hurdle technology), χρησιμοποιώντας συσκευασία ΤΑ και χρήση φυσικών αντιβακτηριακών ουσιών.

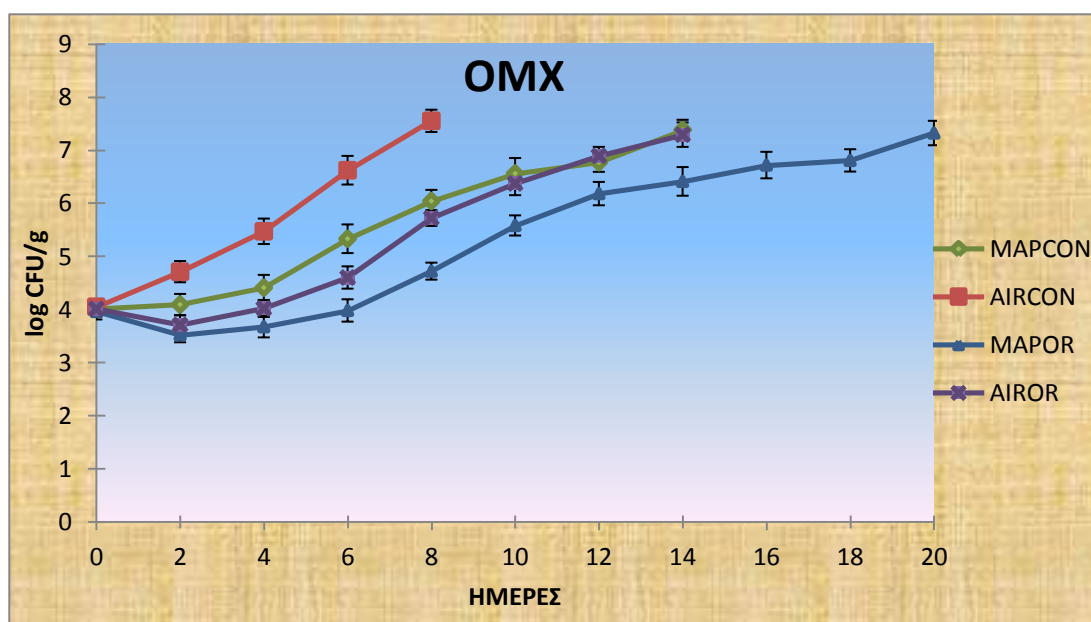
Φιλέτα ξιφία που συντηρήθηκαν σε συνθήκες ΤΑ με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1 %, διατηρήθηκαν 8 – 9 ημέρες περισσότερο σε συνθήκες ψύξης σε σύγκριση με τους μάρτυρες (αερόβια συντήρηση χωρίς ΑΕ) και μόλις 1 ημέρα παραπάνω συγκριτικά με τη συσκευασία στις ίδιες συνθήκες ΤΑ (5% O<sub>2</sub> / 50% CO<sub>2</sub> / 45% N<sub>2</sub>), χωρίς την προσθήκη ΑΕ ρίγανης (Giatrakou et al, 2008). Αντίθετα, οι Pyrgotou et al (2010), που συσκεύασαν αλατισμένα φιλέτα πέστροφας σε συνθήκες ΤΑ 5% O<sub>2</sub> / 45% CO<sub>2</sub> / 50 % N<sub>2</sub>, με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2%, διαπίστωσαν μεγαλύτερη επιμήκυνση του χρόνου ζωής, σε σύγκριση με τη συσκευασία σε ΤΑ, ίδιας σύνθεσης. Συγκεκριμένα, το ΑΕ ρίγανης, προκάλεσε αύξηση του χρόνου ζωής από 13 – 14 ημέρες σε 21 ημέρες, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικά

χαμηλότερους πληθυσμούς ( $P < 0,05$ ) *Enterobacteriaceae*, OMX και οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Οι Goulas & Kontominas (2007), διερευνώντας τη συνεργό δράση φυσικών αντιβακτηριακών ουσιών και συσκευασίας ΤΑ, πρόσθεσαν σε αλατισμένα φιλέτα τσιπούρας, ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,4 %. Η σύνθεση των αερίων της ΤΑ καθορίστηκε σε 40% CO<sub>2</sub>/30% O<sub>2</sub>/30% N<sub>2</sub>. Οι ερευνητές διαπίστωσαν, βασισμένοι σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές παραμέτρους, ότι η προσθήκη του ΑΕ προκάλεσε αύξηση του χρόνου ζωής των φιλέτων κατά 5 – 6 ημέρες, κρίνοντας τα αποδεκτά μέχρι την 33<sup>η</sup> ημέρα.

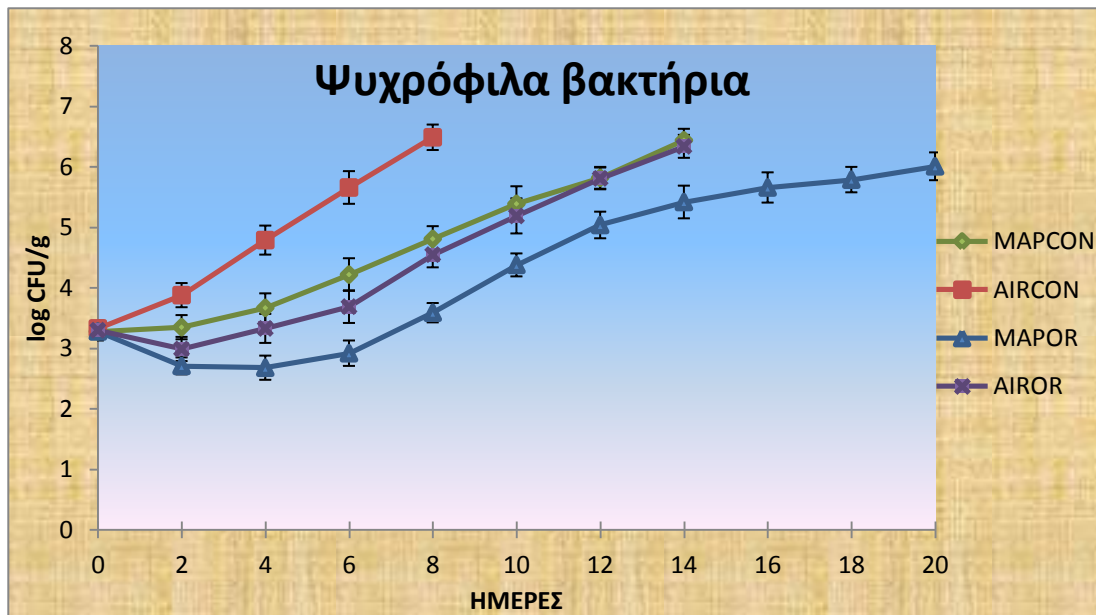
Οι Mejlholm & Dalgaard (2002), διαπίστωσαν ότι ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,05 %, μείωσε την ανάπτυξη του *P. phosphoreum* σε φιλέτα μπακαλιάρου, προκαλώντας αύξηση του χρόνου ζωής τους από 11 – 12 ημέρες σε 21 – 26 ημέρες, όταν συντηρηθούν στους 2° C και σε συσκευασία ΤΑ 60 % CO<sub>2</sub> / 40 % N<sub>2</sub>.

Τέλος, η συσκευασία σε ΤΑ λευκών γαρίδων Ατλαντικού (*Litopenaeus vannamei*) σε συνδυασμό με την προηγούμενη εμφύσησή τους σε εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (1 g / l), προκάλεσε την ανάπτυξη στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότερων πληθυσμών ψυχρόφιλων και οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και εντεροβακτηριοειδών, στο τέλος του χρόνου συντήρησης των 10 ημερών (Nirmal & Benjacul, 2005).

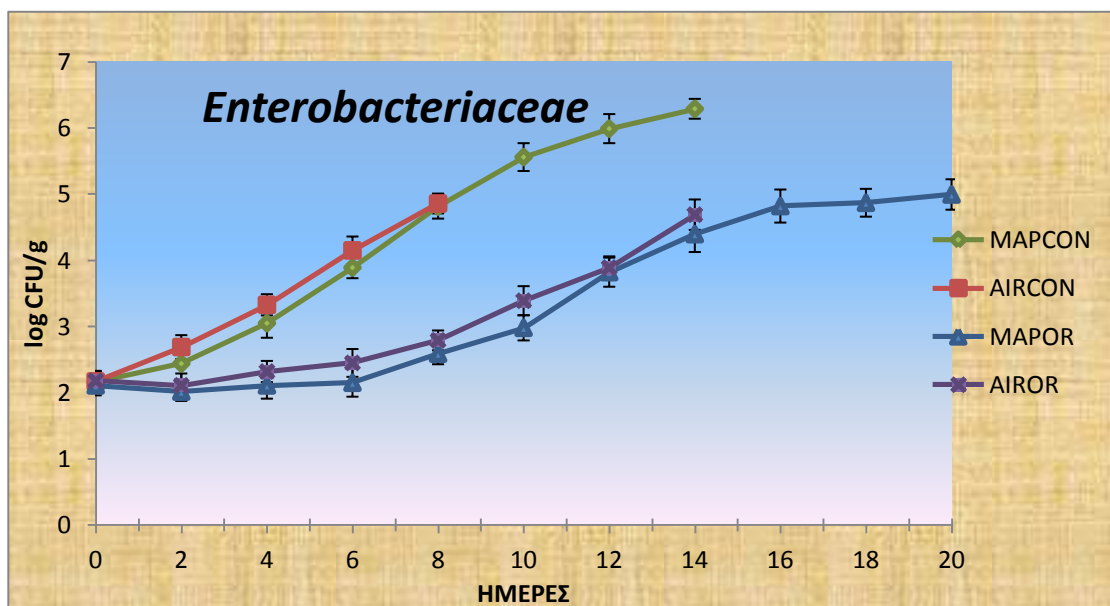


**Διάγραμμα 2 :** Μεταβολή των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), σε δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη.

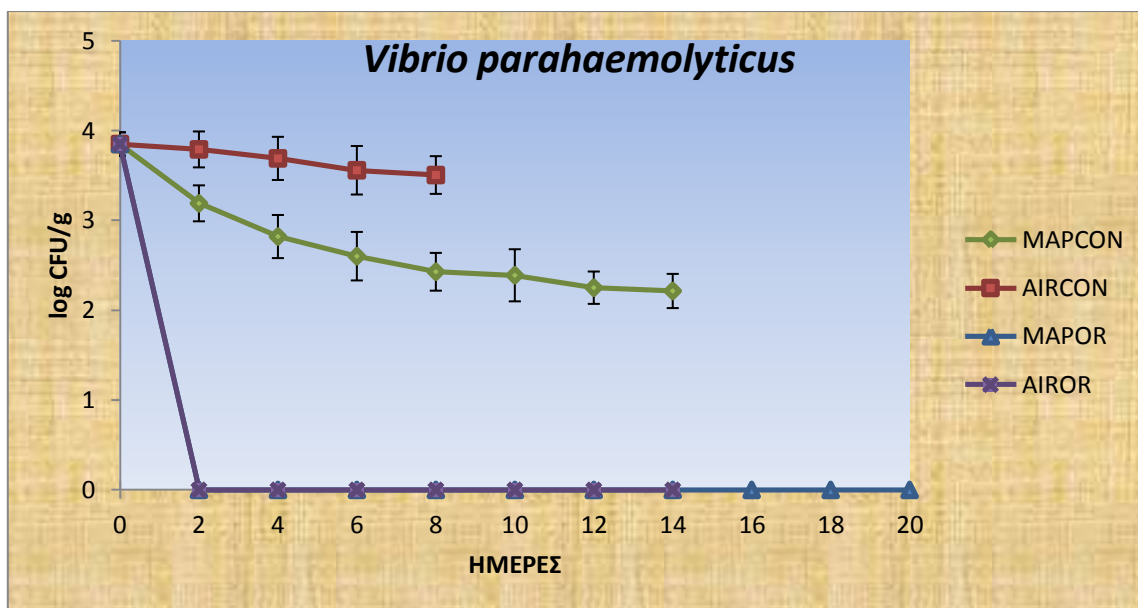
AIRCON : Αερόβιες συνθήκες χωρίς ΑΕ ρίγανης, AIROR : Αερόβιες συνθήκες με ΑΕ ρίγανης 0,2%, MAPCON : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) χωρίς ΑΕ ρίγανης, MAPOR : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) με ΑΕ ρίγανης



**Διάγραμμα 3 :** Μεταβολή των πληθυσμών των Ψυχρόφιλων βακτηρίων, σε δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη. AIRCON : Αερόβιες συνθήκες χωρίς ΑΕ ρίγανης, AIROR : Αερόβιες συνθήκες με ΑΕ ρίγανης 0,2%, MAPCON : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) χωρίς ΑΕ ρίγανης, MAPOR : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) με ΑΕ ρίγανης



**Διάγραμμα 4 :** Μεταβολή των πληθυσμών των *Enterobacteriaceae*, σε δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη. AIRCON : Αερόβιες συνθήκες χωρίς ΑΕ ρίγανης, AIROR : Αερόβιες συνθήκες με ΑΕ ρίγανης 0,2%, MAPCON : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) χωρίς ΑΕ ρίγανης, MAPOR : Συσκευασία σε ΤΑ (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) με ΑΕ ρίγανης



**Διάγραμμα 5 :** Μεταβολή των πληθυσμών του *V. parahaemolyticus*, σε δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη. AIRCON : Αερόβιες συνθήκες χωρίς ΑΕ ρίγανης, AIROR : Αερόβιες συνθήκες με ΑΕ ρίγανης 0,2%, MAPCON : Συσκευασία σε TA (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) χωρίς ΑΕ ρίγανης, MAPOR : Συσκευασία σε TA (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) με ΑΕ ρίγανης



**Διάγραμμα 6 :** Μεταβολή των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη. AIRCON : Αερόβιες συνθήκες χωρίς ΑΕ ρίγανης, AIROR : Αερόβιες συνθήκες με ΑΕ ρίγανης 0,2%, MAPCON : Συσκευασία σε TA (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) χωρίς ΑΕ ρίγανης, MAPOR : Συσκευασία σε TA (CO<sub>2</sub> : 70% - N<sub>2</sub> : 30%) με ΑΕ ρίγανης

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας θα μπορούσαν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα :

Τα δείγματα μυδιών που συντηρήθηκαν σε συνθήκες ΤΑ (CO<sub>2</sub> 70 % / N<sub>2</sub> 30 %) με την προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2%, παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και τη 18<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4° C, δηλαδή 12, 5 και 4 ημέρες περισσότερες από ότι τα δείγματα AIRCON, AIOR και MAPCON αντίστοιχα.

Βρέθηκε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2% κατά του *V. parahaemolyticus*. Έτσι, στα δείγματα μειώθηκε ο πληθυσμός του παθογόνου σε μη ανιχνεύσιμους πληθυσμούς από τη 2<sup>η</sup> ημέρα, τόσο σε αερόβιες συνθήκες όσο και σε συνδυασμό με τη συσκευασία σε συνθήκες ΤΑ.

Παρομοίως, διαπιστώθηκε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,2 % κατά των *Enterobacteriaceae* σε αερόβιες συνθήκες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν σχετικά ανθεκτικά στη δράση του ΑΕ ρίγανης, προκαλώντας μικρή μείωση των πληθυσμών τους.

Η συσκευασία της σάρκας μυδιών σε ΤΑ (MAPCON) παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus*. Έτσι, οι πληθυσμοί του παθογόνου στα δείγματα MAPCON παρέμειναν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότεροι από τους μάρτυρες από τη 2<sup>η</sup> ημέρα ως και το τέλος της συντήρησης στην ψύξη (14<sup>η</sup> ημέρα).

Δε διαπιστώθηκε αντιβακτηριακή δράση της συσκευασίας σε ΤΑ κατά των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Οι πληθυσμοί της OMX και των ψυχρόφιλων βακτηρίων στα δείγματα AIOR & MAPCON βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0,05$ ) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων AIRCON από τη 2η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησής τους, ενώ οι ίδιοι πληθυσμοί δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων.

Διαπιστώθηκε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση του ΑΕ ρίγανης κατά του *V. parahaemolyticus*, στα δείγματα MAPOR, μειώνοντας τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού από τη 2<sup>η</sup> κιόλας ημέρα.

Η OMX των δειγμάτων MAPOR βρέθηκε σε στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) χαμηλότερους πληθυσμούς από την OMX τόσο των δειγμάτων AIOR (από την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης) όσο και των δειγμάτων MAPCON, (από τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης) υπό ψύξη.

Οι πληθυσμοί των ψυχρόφιλων βακτηρίων των δειγμάτων MAPOR βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι από τους πληθυσμούς των ψυχρόφιλων βακτηρίων των δειγμάτων AIOR και MAPCON, από την 4<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα.

Οι πληθυσμοί της OMX, των ψυχρόφιλων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα MAPOR ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι ( $P < 0,05$ ), από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων AIRCON από την 2<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους.

Διαπιστώθηκε η συνεργός δράση του ΑΕ ρίγανης και της συσκευασίας σε ΤΑ, όπως προέκυψε τόσο από την επιμήκυνση του χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης των δειγμάτων κατά 5 και 6 ημέρες, από τη δράση του κάθε παράγοντα, μεμονωμένα, όσο και από την ανάπτυξη των μικροβιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 8.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Amorati R., Foti M., Valgimigli L., (2013)** «*Antioxidant Activity of Essential Oils*», **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61 : 10835 – 10847.
2. **Andrews LS. Park DL, Chen YP (2000)**, «*Low temperature pasteurization to reduce the risk of vibrio infections from raw shell-stock oysters*», **Food Additives and Contaminants**, 19 (7) : 787 – 791
3. **Anonymous (2012)**, «*Μύδια*», *Αλγεία και Υδατοκαλλιέργεια στην Ευρώπη*, αρ 59, Δεκ 2012.
4. **Ansaruzzaman M., Lucas M., Deen J., Bhuiyan N., Wang X., Safa A, Sultana., Chowdhury A., Nair BG., Sack A., Lorenz von Seidlein, Puri M., Mohammad A., Chaignat C., Clemens J., Barreto A. (2005)**, «*Pandemic Serovars (O3: K6 and O4:K68) of Vibrio parahaemolyticus Associated with Diarrhea in Mozambique: Spread of the Pandemic into the African Continent*», **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (6) : 2559 – 2562
5. **Arkoudelos J. Stamatis N., Samaras F., (2007)** «*Quality attributes of farmed eel (Anguilla anguilla) stored under air, vacuum and modified atmosphere packaging at 0° C*», **Food Microbiology**, 24 : 728 – 735
6. **Arvanitoyannis I., Konstantellia V., Bouletis A., Papaloucas C, (2011)** «*Study of changes in physicochemical and microbiological characteristics of shrimps (Melicertus kerathurus) stored under modified atmosphere packaging* », **Anaerobe**, 17 : 292 – 294
7. **Ashie N. A., Smith J. P., Simpson B. K. Haard N (1996)** «*Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish*» **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 36 (1&2) : 87 – 121
8. **Atrea I., Papavergou A., Amvrosiadis I., Savvaidis I.N., (2009)** «*Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (Octopus vulgaris) from the Aegean Sea stored at 4° C*», **Food Microbiology**, 26 : 166 – 172
9. **Baert L., Debevere J, Uyttendaele M. (2009)**, «*The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses*», **International Journal of Food Microbiology**, 131 : 83 – 94
10. **Baker – Austin C., Stockley L., Rangdale R., Martinez – Urtazza J., (2010)**, «*Environmentak occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus : a European perspective*», **Environmental Microbiology Rep**, 2 : 7 – 18
11. **Ballamoole K., Pendru R., Devananda D., Vijay K. Moleyur N., Iddya K., Indrani K. (2011)** «*Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in seafood*», **International Journal of Food Microbiology**, 145 : 244–249
12. **Bauer A., Østensvik Ø., Florvåg M., Ørmen Ø Rørvik M. (2006)**, «*Occurrence of Vibrio parahaemolyticus, V. cholerae, and V. vulnificus in Norwegian Blue Mussels (Mytilus edulis)*», **Applied and Environmental Microbiology**, 72 (4) : 3058 – 3061



13. Baydar H. Sagdic O., Ozkan G, Karadogan T. (2004) «Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey», **Food Control** 15 : 169 – 172
14. Bayoumi, S., (1992). «Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yogurt». **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel** 14 : 21– 26.
15. 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
16. Botsoglou N., Yannakopoulos A., Fletouris D., Tserveni – Gousi A., Fortomaris P. (1997), «Effect of Dietary Thyme on the Oxidative Stability of Egg – Yolk» **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45 (10) : 3711– 3716
17. Botsoglou N., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Spais A.B. (2002) «The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage» **Meat Science**, 62 : 259 – 265
18. Botsoglou N., Grigoropoulou S.H., Botsoglou E., Govaris A., Papageorgiou G. (2003) «The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage» **Meat Science**, 65 : 1193 – 1200
19. Bouletis D. Achilleas, Arvanitoyannis S. Ioannis, Hadjichristodoulou C., Neofitou C., Sakkomitrou M., Kolokythopoulou F., (2014) «The effect of modified atmosphere packaging on the microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of broadtail squid (*Illex coindetii*)» **International Journal of Food Science and Technology**, 88 : 308 – 316
20. Broberg C.A., Calder T.J., Orth K., (2011) «*Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants», **Microbes and Infection**, 13 : 992 – 1001
21. Burt S.A., Reinders R.D., (2003). «Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7». **Letters in Applied Microbiology** 36 : 162–167
22. Burt S. (2004) «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review», **International Journal of Food Microbiology**, 94 : 223 – 253.
23. Caglak E., Cakli S., Kilinc B. (2008), «Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging», **European Food and Research Technology**, 226 : 1293– 1299
24. Capecka E., Mareczek A., Leja M. (2005) «Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species» **Food Chemistry** 93 : 223 – 226
25. Chiou CS, Hsu SY, Chiou SI, Wang TK, Chao CS (2000), «*Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999». **Journal of Clinical Microbiology**, 38 : 4621 – 4625
26. Cutter C.N. (2002) «Microbial control by packaging: A review» **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 42 (2) : 151 – 161
27. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., (2000). «GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*». **Journal of Agriculture Food Chemistry** 48, 2576–2581

28. De Paola A., Hopkins L., Peeler J., Wentz B., McPhearson R., (1990), «Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US Coastal Waters and Oysters», **Applied and Environmental Microbiology**, 56 (8) : 2299 – 1299
29. Deans S.G. , Ritchie G., (1987) «Antibacterial properties of plant essential oils», **International Journal of Food Microbiology**, 5 : 165-180
30. Debevere J., Boskou G. (1996), «Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets» **International Journal of Food Microbiology** 31 : 221 – 229
31. Devlieghere F., Debevere J. (2000), «Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria» **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, 33, 531 – 537
32. Di Pinto A., Terio V., Di Pinto P., Colao V. Tantillo G. (2012) «Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay» **Letters in Applied Microbiology** 54 : 494 – 498
33. Dorman H.M J., Deans S.G. (2005) «Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils», **Journal of Applied Microbiology**, 98 : 752 – 760
34. 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
35. Duncan PF (2003), *Aquaculture of Commercially Important Molluscs and Crustaceans*, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Elsevier Science and Technology Books, pp 5245 – 5251
36. Erkan N., Ozden O., Alakavuk D., Yildirim Y., Inugur M. (2006) «Spoilage and shelf life of sardines (*Sardina pilchardus*) packed in modified atmosphere», **Eur Food Res Technol**, 222: 667–673
37. 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
38. Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D(2002). «Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and Summer savory». **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50 : 5294 – 5299
39. Farber, J.M. (1991). «Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere packaging – a review». **Journal of Food Protection**, 54 : 58–70
40. Floros J.D. & Matsos K.I (2005), Introduction to modified atmosphere packaging. In : *Innovations in Food Packaging*, (Ed. Han J.), pp 159 – 172, Food Science and Technology, International Series.
41. Garabal J. I. , Rodriguez-Alonso P., Franco D., Centeno J. A. (2010) «Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: Effects of storage under vacuum and different modified atmospheres» **Journal of Dairy Science**, 93 : 1868 – 1881
42. García K., Torres R., Uribe P., Hernandez C., Rioseco L., Romero J., Espejo R. (2009), « Dynamics of Clinical and Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Strains during Seafood-Related Summer Diarrhea Outbreaks in Southern Chile)», **Applied and Environmental Microbiology**, 75 (23) : 7482 – 7487
43. Genigeorgis, C. (1985). «Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish». **International Journal of Food Microbiology**, 1 : 237–251.

44. **Giatrakou V., Kykkidou S., Papavergou A., Kontominas M., Savvaidis I. (2008)** «*Potential of Oregano Essential Oil and MAP to Extend the Shelf Life of Fresh Swordfish: A Comparative Study with Ice Storage*» **Journal of Food Science** 73 (4) : 167 – 173
45. **Gornik S., Albalat A., Theethakaew C., Neil D, (2013)** , «*Shelf life extension of whole Norway lobster *Nephrops norvegicus* using modified atmosphere packaging*» **International Journal of Food Microbiology** 167 : 369 – 377
46. **Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P. (2010)** «*The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage*» **International Journal of Food Microbiology**, 137 : 175–180
47. **Goulas A.E., Chouliara I., Nessi E., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2005)**, «*Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging*» **Journal of Applied Microbiology**, 98 : 752 – 760.
48. **Goulas A., Kontominas M., (2007a)**, «*Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf-life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes*», **Eur Food Res Technol** 224: 545 – 553
49. **Goulas A., Kontominas M. (2007b)**, «*Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes*» **Food Chemistry** 100 : 287 – 296
50. **Goulas A.E. (2008)**, «*Combined Effect of Chill Storage and Modified Atmosphere Packaging on Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) Preservation*» **Packaging Technology and Science**, 21 : 247 – 255
51. **Gosling E. M., (2003)**. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Oxford; Malden, MA: Fishing News Books
52. **Gram L., Huss H., (1996)**, «*Microbiological spoilage of fish and fish products*» **International Journal of Food Microbiology** 33 121 – 137
53. **Gudmundsson E., Asche F., Nielson M., (2006)**, *Revenue distribution through the seafood value chain*, FAO technical paper 1019.
54. **Günşen U., Özcan A., Aydın Ali (2010)** «*Determination of Some Quality Criteria of Cold Stored Marinated Anchovy under Vacuum and Modified Atmosphere Conditions*» **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 11: 233 – 242
55. **International commission on microbiological specifications for foods (1986)**. *Sampling plans for fish and shellfish*. In ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications Vol. 2 (2nd edn), ed. ICMSF. Toronto, Canada: University of Toronto Press
56. **Interstate Shellfish Sanitation Conference, 2011** «*Guide for the control of Molluscan Shellfish, Revision 2009*».
57. **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)**
58. **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

59. **Han J (2005)**, New technologies in food packaging : overview. In : *Innovations in Food Packaging* (Ed. Han J.), pp 3 – 11, Food Science and Technology, International Series.
60. **Han J (2005)**, Antimicrobial packaging systems. In : *Innovations in Food Packaging*, (Ed. Han J.), pp 80 – 107, Food Science and Technology, International Series.
61. **Hara-Kudo Y. Takatori K (2011)** «Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections» **Epidemiol. Infect.** (2011), 139 : 1505 – 1510.
62. **Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003)**. «Effects of herbal essential oils used to extend the shelf-life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*)». **Journal of Food Protection**, 66 : 410–417.
63. **Holley R., Patel D., (2005)**, «Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials» **Food Microbiology** 22 : 273 – 292
64. **Honda, T., Chearskul, S., Takeda, Y. Miwatani, T. (1980)**. «Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*». **Journal of Clinical Microbiology**, 11 : 600 – 603.
65. **Honda, T., Ni, Y., Yoh, M., Miwatani, T., (1989)**. «Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* and application of the antibodies for enzyme linked immunosorbent assay». **Medical Microbiology and Immunology** 178 : 245–253.
66. **Huss, H.H., Dalgaard, P. & Gram, L. (1997)**. Microbiology of fish and fish products. In: *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality* (edited by J.B. Luten, T. Børresen & J. Oehlenschläger). pp. 413 – 430. Amsterdam: Elsevier.
67. **Jay et al (2005)**, *Modern Food Microbiology* (Seventh Edition), Food Science Text Series, pp 109 – 120, 354 – 370, 657 – 661.
68. **Johnston MD, Brown MH (2002)**. «An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing». **Journal of Applied Microbiology**, 92 : 1066 – 1077.
69. **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.
70. **Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., (1994)**. «Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.» **Journal of Applied Bacteriology** 76 : 626– 631
71. **Ismael, A.A., Pierson, M.D., (1990)**. «Effect of sodium nitrite and oregano oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork». **Journal of Food Protection** 53 (11) : 958– 960.
72. **Kaefer C., Milner J. (2008)**, «The role of herbs and spices in cancer prevention» **Journal of Nutritional Biochemistry** 19 : 347–361
73. **Karagiannis D., Vatsos I.N., Theodoridis A., Angelidis P, (2013)** « Effect of culture system on the prevalence of parasites of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819)», **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 64 (2) : 113 – 122

74. **Karakoltsidis P., Zotos A., Constantinides S. (1995)**, «*Composition of the Commercially Important Mediterranean Finfish, Crustaceans and Molluscs*», **Journal of Food Composition and Analysis**, 8 : 258 – 273.
75. **Karatzas, A.K., Kets, E.P.W., Smid, E.J., Bennik, M.H.J., (2001)**. «*The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A*». **Journal of Applied Microbiology** 90 : 463– 469.
76. **Kaysner CA (1999)**, *Shellfish (Molluscs and Crustaceans)/Contamination and Spoilage*, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Elsevier Science and Technology Books, pp 2001 - 2007
77. **Kim Y., Lee S., Hwang I., Yoon K. (2012)**, «*Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat*», **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 9 : 4662 – 4675
78. **Kiriazi – Papadopoulou A., Vareltzis K. (2003)**, «*Development of suitable technology for the canning of smoked Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in tomatoe juice*», **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 54 (2) : 131 – 139
79. **Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I., Kontominas M. (2009)**, «*Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets*» **Food Microbiology** 26 : 475–482
80. **Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K., Nychas, G.-J.E., (1999)**. «*A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial*». **International Journal of Food Microbiology** 49 : 63– 74.
81. **Kromhout D, Bosschieter EB, Lezenne CC (1985)** «*The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease*». **New England Journal of Medicine** 312 : 1205 – 1209
82. **Kural, A.G., Shearer, A.E.H., Kingsley, D.H., Chen, H., (2008)**. «*Conditions for high pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters*». **International Journal of Food Microbiology** 127 : 1 – 5.
83. **Kykkidou S., Giatrakou V., Papavergou A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2009)** «*Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4° C*» **Food Chemistry** 115 : 169–175
84. **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.
85. **Lin Y. T., Labbe R. G., Shetty K. (2005)** «*Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid*», **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 6 : 453 – 458
86. **Mahmoud B., Yamazaki K., Miyashita K., Shik S., Dong-Suk C., Suzuk T. (2004)** «*Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds*», **Food Microbiology** 21 : 657 – 666
87. **Mailgaard, M, Civille, GV, Carr, BT. (1999)**. *Sensory Evaluation Techniques*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press LLC.

88. Marino M., Bersani C., Comi G. (2001) «Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae». **International Journal of Food Microbiology**, 67 : 187 – 195
89. Martinez-Urtaza J., Simental L., Velasco D., DePaola A., Ishibashi M., Nakaguchi Y. , Nishibuchi M., Carrera-Flores D., Rey-Alvarez C., Pousa A. (2005), «Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe», **Emerging Infectious Diseases** , 11 (8) , 1319 – 1320
90. Martinez-Urtaza J., Bowers JC, Trinanes J., DePaola A., (2010), «Clinical anomalies and increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses», **Food Research International**, 43 : 1780 – 1790
91. Masniyom P., Benjama O., Maneesr J.,(2012), «Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*)» **International Journal of Food Science and Technology** , 47 : 1079–1085
92. Mastromatteo M., Conte A., Del Nobile M.A. (2010) «Combined Use of Modified Atmosphere Packaging and Natural Compounds for Food Preservation», **Food Engineering Rev**, 2 : 28 – 38
93. Mastromateo M., Incoronato A.L., Conte A., Del Nobile M.A. «Shelf life of reduced pork back-fat content sausages as affected by antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging», **International Journal of Food Microbiology** 2011 ; 150 : 1 – 7
94. McMillin K.W. (2008), «Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat», **Meat Science**, 80 : 43–65
95. Mejlholm, O., Dalgaard, P., (2002). «Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products». **Letters in Applied Microbiology** 34 : 27– 31.
96. Mendoza-Yepes, M.J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., Marin-Iniesta, F., (1997) «Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) en Spanish soft cheese». **Journal of Food Safety** 17 : 47– 55.
97. Mexis S.F., Chouliara E, Kontominas M.G. (2009) «Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C» **Food Microbiology** 26 : 598–605
98. Miles D., Ross T., Olley J., McMeekin T, (1997), «Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*», **International Journal of Food Microbiology**, 38 : 133 – 142
99. Milne D., Powell S. (2014) «Limited microbial growth in Atlantic salmon packed in a modified atmosphere» **Food Control** 42 : 29 – 33
100. Nair GB, Ramamurthi 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.
101. Niimi AJ (2004), Role of container vessel in the introduction of exotic species, **Mar Poll Bull** 49 : 778 – 782
102. Nilesh Prakash Nirmal, Soottawat Benjakul (2011) «Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage» **International Journal of Food Microbiology**, 149 247–253

103. Nordstrom J., Vickery L., Blackstone G., Murray S., De Paola A., (2007), «Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters», **Applied and Environmental Microbiology**, 73 (18) : 5840 – 5847.
104. Nychas G. & Skandamis P. (2003), Antimicrobials from herbs and spices In : *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*, (Ed. Roller Sibel), Woodhead Publishing Limited pp 176 – 200.
105. Oluwafemi J., Pramod V., Mahajan & Fahad Al-Julanda Al-Said & Umezuruike L. (2013) «Modified Atmosphere Packaging Technology of Fresh and Fresh-cut Produce and the Microbial Consequences—A Review» **Food Bioprocess Technology** 6 : 303 – 329
106. Ottaviani D., Leoni F., Serra R., Serracca L., Decastelli L., Rocchegiani E., Massini L., Canonico C., Talevi G., Carraturo A. (2012). «Non toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* Strains Causing Acute Gastroenteritis». **Journal of Clinical Microbiology**, 50 (12) : 4141– 4143.
107. Ozogul F., Taylor K., Quantick P., Ozogul Y. (2000) «Chemical, microbiological and sensory evaluation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack» **Food Chemistry** 71 : 267 – 273
108. Ozogul F, Polata A., Ozogul Y. (2004) «The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*)», **Food Chemistry** 85 : 49–57
109. Paarup T, Sanchez J.A., Pelaez C., Moral A. (2002) «Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4° C» **International Journal of Food Microbiology**; 74 : 1 – 12
110. Pantazi D, Papavergou A., Pournis N., Kontominas M., Savvaidis I., (2008) «Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes» **Food Microbiology** 25 : 136 – 143
111. Paster, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., Ravid, U., (1990). «Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria». **Letters in Applied Microbiology** 11 : 33 – 37
112. Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J. , Cabo M. (1998) «Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*)», **Food Chemistry**, 61 (1/2), 23 – 28.
113. Pastoriza L., Bernardez M., Sampedro G., Cabo M., Herrera J. (2004), «Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated», **European Food Research Technology**, 218 : 415 – 419
114. Phillips A. Carol « Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce» **International Journal of Food Science and Technology** 1996 ; 31 : 463 – 479
115. Pomykala R., Michalski M, Jozwik A., Osek J., (2012), « Microbiological and marine biotoxins contamination of raw bivalve molluscs commercially available in Poland», **Bull Vet Inst Pulawy**, 56 : 563 – 568

116. Provincial L., Gil M., Guillen E., Alonso V., Roncales P., Beltran, J. (2010) «Effect of modified atmosphere packaging using different CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets» **International Journal of Food Science and Technology**, 45 : 1828 – 1836.
117. Provincial L, Guillén E., Alonso V., Gil M., Roncalés P., Beltrán J. (2013), «Survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* in sea bream (*Sparus aurata*) fillets packaged under enriched CO<sub>2</sub> modified atmospheres» **International Journal of Food Microbiology**, 166 : 141 – 147.
118. Pyrgotou N., Giatrakou V., Ntzimani A., Savvaidis I. (2010), «Quality Assessment of Salted, Modified Atmosphere Packaged Rainbow Trout under Treatment with Oregano Essential Oil» **Journal of Food Science** 75 (7) : 406 – 411
119. Ramamurthy T & Nair GB (2014), *Vibrio parahaemolyticus* in Encyclopedia of Food Safety, (Ed. Motarjemi Y.), pp. 554 – 563.
120. Renault, P., Houal, L., Jacquemin, G. & Chambroy, Y. (1994). «Gas-exchange in modified atmosphere packaging: experimental results with strawberries». **International Journal of Food Science and Technology**, 29, 379 – 394
121. Rodriguez-Aguilera R., Oliveira J.C., Montanez J.C., Mahajan P.V. (2011), «Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of mould surface-ripened cheese: Part II varying storage temperature» **LWT Food Science and Technology** 44 : 337 – 342
122. 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
123. 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
124. Seed (1969), The ecology of *Mytilus edulis* Lamellibranchata on exposed rocky shores, 11: growth and mortality. *Oecologia*. p 317- 356
125. Shelef, L.A. (1983) «Antimicrobial effects of spices». **Journal of Food Safety** 6 : 29-44.
126. Singh R. K. & Singh N (2005), Quality of packaged foods. In : *Innovations in Food Packaging*, (Ed. Han J), pp 24 – 44, Food Science and Technology, International Series.
127. Singh P., Wani A.A. KarimA.A., Langowskii H.R. (2012). «The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review», **International Journal of Dairy Technology**, 65 (2) : 161 – 177
128. Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes T.J (2002), «A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety» **International Journal of Food Science and Technology** 37 : 107 – 127



129. Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., (2000) «Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations». **Applied and Environmental Microbiology** 66 (4) : 1646–1653.
130. Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., (2001). «Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres» **Journal of Applied Microbiology** 91 : 1011 – 1022.
131. Skandamis P., Tsigarida E., Nychas and G.-J. E. (2002) «The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5° C under aerobic, VP/MAP conditions», **Food Microbiology**, 19 : 97 – 103
132. Solomakos N., Govaris A., (2004) «Oregano, thyme and sage, as natural additives to foods», **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 55 (1) : 75 – 81
133. Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. (2008) « The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage » **Meat Science**, 80 : 159 – 166
134. Solomakos N., Pexara A., Govaris A. (2012), «*Vibrio parahaemolyticus* in seafood – associated outbreaks», **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 63 (1) : 54 – 62
135. Stamatis N., Arkoudelos J. (2007), «Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging» **Food Control** 18 : 292 – 300
136. Stammen K., Gerdes D., Caporaso F., Martin R. (1990) «Modified atmosphere packaging of seafood» **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 29 : 5, 301 – 331
137. Su Yi-Cheng, Liu C. (2007), «*Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety», **Food Microbiology**, 24 : 549–558
138. Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. (2010) «Antimicrobial herb and spice compounds in food» **Food Control** 21 : 1199 – 1218
139. Theodorou JA, Viaene J, Sorgeloos P, Tzovenis I (2011), «Production and Marketing Trends of the Cultured Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819, in Greece». **Journal of Shellfish Research**, 30 : 859 – 874.
140. Thompson, C.A., Vanderzant, C (1976), «Effect of processing, distribution and storage on *Vibrio parahaemolyticus* and bacterial counts of oysters (*Crassostrea virginica*)», **Journal of Food Science**, 41: 123 – 127.
141. Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.-J.E., (2000). «Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5° C. **Journal of Applied Microbiology** 89 : 901–909.
142. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ (2000), «Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol.» **Archives of Microbiology**, 174 : 233 – 238.
143. Valero M, Salmeron MC (2003) «Antibacterial activity of essential oils against *Bacillus cereus*». **Ints Food Microbial.** 85 : 73-81
144. Vaught KC (1989), A classification of the living mollusca. R T Abbot and KS Boss (Editors). American Malacologists Inc

145. Velasquez-Roman J., Leon-Sicairos N., Flores-Villasenor H., Vilafana-Rauda S., Canizalez-Roman A., (2012), «Association of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Present in the Coastal Environment of Northwest Mexico with Cases of Recurrent Diarrhea between 2004 and 2010 », **Applied and Environmental Microbiology**, 78 (6) : 1794 – 1803
146. Venturini M.E., Blanco D., Oria R. (2002) «In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*». **J. Food Prot.**, 65 : 834 – 839
147. Vrinda Menon, K., Garg, S.R., (2001). «Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese». **Food Microbiology** 18 : 647– 650.
148. Wang, S., Levin, R.E., (2004). «Quantitative determination of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction». **Food Biotechnology** 18 : 279– 287.
149. WHO, (2002) *Food safety and foodborne illness*. World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.
150. Xi D., Liu C., Su Yi-Cheng (2012) «Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats» **Food Control**, 25 : 368 – 373
151. Yang Z., Jiao X., Zhou X., Cao G., Fang W., Gu R., (2008) «Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China», **International Journal of Food Microbiology**, 125 : 279 – 285.
152. Yang L., Zhan L., Han H., Gao H., Guo Z., Qin C., Yang R., Liu X., Zhou D. (2010), «The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*», **International Journal of Food Microbiology**, 137 : 49–54.
153. Yokohama Y. (1985), Materials in Packaging. In: *Package Design in Japan*, Vol. 1 (S. Hashimoto,ed), pp 113 – 115. Rickyo-sha Publishing, Tokyo, Japan

## 8.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

154. Βαρελτζής Κυριάκος (1999). Ποιοτικός Έλεγχος και Τεχνολογία Αλιευμάτων. ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ, σελ.141 – 144.
155. Ε.Κ. 2232 της 28<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 1996, «Θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τις αρωματικές ύλες που χρησιμοποιούνται ή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν εντός ή επί των τροφίμων», **Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης**
156. Ε.Κ. 1565 της 18<sup>ης</sup> Ιουλίου 2000, «Θέσπιση μέτρων έγκρισης ενός προγράμματος αξιολόγησης σε εφαρμογή του κανονισμού ΕΚ 2232/1996 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.», **Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης**
157. Ε.Κ. 1441 της 5<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2007, «Τροποποίηση του ΕΚ 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα», **Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης**
158. Λαζαρίδου – Δημητριάδου Μαρία (1992). Γενική Ζωολογία. ΓΙΑΧΟΥΔΗ, σελ.164 – 178.
159. Μουρατίδου Θεώνη (2005), «Μελέτη της συσσώρευσης του οκαδαϊκού οξέος σε μύδια καλλιέργειών (*Mytilus galloprovincialis*) στο φυσικό τους περιβάλλον», **Διδακτορική διατριβή**, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη

160. **Μπλούκας, Ι.Γ. (2004).** *Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων*. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.
161. **Ντόντου Ιωάννα.** «Μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μύδια κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη και κατά του *Vibrio parahaemolyticus*», **Διπλωματική εργασία**, ΠΜΣ «Υδατοκαλλιέργειες – Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών», Κτηνιατρική Σχολή ΠΘ, Καρδίτσα, 2013.
162. **Παπουτσόγλου Σωφρόνιος (1985).** Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες. ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ, σελ.469 – 470.
163. **Σολωμάκος Νικόλαος (2007),** «Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων βοτάνων και της νισίνης σε βόειο κρέας», **Διδακτορική διατριβή**, Κτηνιατρική Σχολή ΠΘ, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Καρδίτσα.
164. **Συμεωνίδης Χρήστος (2010),** «Διερεύνηση μεθόδων εντατικής καλλιέργειας Λεπιδοβράγχιων (Δίθυρα μαλάκια)», **Διδακτορική διατριβή**, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Ιχθυολογίας, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, Θεσσαλονίκη.

### 8.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

165. <http://www.fao.org/fishery/species/3277/en-11/03/2014>
166. <http://www.rasff.com>