



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ - ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση του τρόπου θανάτωσης των ιχθύων στις  
φυσικοχημικές μεταβολές και στο μικροβιακό προφίλ  
αλλοίωσης κατά τη συντήρησή τους υπό διάφορες συνθήκες»

ΠΙΤΣΟΥΛΗ ΕΛΕΝΗ

ΒΟΛΟΣ 2009

**«Επίδραση του Τρόπου Θανάτωσης των Ιχθύων στις Φυσικοχημικές  
Μεταβολές και στο Μικροβιακό Προφίλ Αλλοίωσης κατά τη Συντήρηση  
τους υπό Διάφορες Συνθήκες»**

### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Ιωάννης Μποζιάρης:** Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**
- **Ιωάννης Αρβανιτογιάννης:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Ασφάλεια και Διασφάλιση Ποιότητας Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**
- **Παναγιωτάκη Παναγιώτα:** Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιχθυολογίας - Υδροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το αντικείμενο μελέτης ήταν η επίδραση του τρόπου θανάτωσης των ιχθύων στις φυσικοχημικές μεταβολές και στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης υπό διαφορετικές συνθήκες συντήρησης.

Η πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης απαιτούσε τη βοήθεια και τη συμβολή ορισμένων ανθρώπων τους οποίους εκτιμώ ιδιαίτερα και θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινές μου ευχαριστίες στα πρόσωπά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξή του και το διδακτικό του έργο κατά τη διάρκεια των διαλέξεων του Π.Μ.Σ., καθώς και τον κ. Ι. Αρβανιτογιάννη και την κ. Π. Παναγιωτάκη για τις διορθώσεις τους στη μεταπτυχιακή μου εργασία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η μελέτη των τριών διαφορετικών τρόπων θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι) στις φυσικοχημικές μεταβολές και στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης στη σάρκα των ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*), στη συντήρηση με ψύξη στους 5°C. Πραγματοποιήθηκε πείραμα τριών επαναλήψεων.

Αρχικά μελετήθηκε η μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού με πείραμα τριών επαναλήψεων που διεξήχθη στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Υδροβιολογίας, σε σχέση με τους διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης των ιχθύων και την τυχόν επίδραση αυτών των μεθόδων στη βακτηριακή ανάπτυξη. Οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύθηκαν ήταν η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, οι ψευδομονάδες, οι μικροοργανισμοί που παράγουν υδρόθειο και ο *Brochothrix thermosphacta*.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος έδειξε ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ( $p > 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης και της επίδρασης αυτών στην ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού των ιχθύων. Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* sp., αλλά και των βακτηρίων ικανών να παράγουν υδρόθειο, έφθασαν στο επίπεδο του  $10^8$  cfu/g μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης στους 5°C, ανεξάρτητα από τη μέθοδο θανάτωσης που χρησιμοποιήθηκε. Όσον αφορά τους ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων (Specific Spoilage Organisms SSO's), όπως η *Shewanella putrefaciens*, έφθασαν στο επίπεδο των  $10^8$  cfu/g από τη δεύτερη μέρα αποθήκευσης έως και τη τέταρτη μέρα αποθήκευσης στους 5°C .

Επίσης, στην παρούσα εργασία καταγράφηκε η μεταβολή του pH στη σάρκα των ιχθύων και για τους τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το pH δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης ιχθύων που συντηρήθηκαν στους 5°C. Το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 6,12 έως 6,28 για τη μέθοδο της υποθερμίας, από 6,04 έως 6,19 για τη μέθοδο της ασφυξίας και από 6,09 έως 6,27 για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων ήταν άλλη μια παράμετρος που συμπεριλήφθηκε στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι οι διαφορετικές μέθοδοι θανάτωσης των ιχθύων, εκτός από την ασφυξία δε διαφέρουν σημαντικά ως προς την επίδρασή τους στη σκληρότητα. Η πίεση που εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων για τη μέτρηση της σκληρότητας, πραγματοποιήθηκε με έμβολο σε βάθος 5 mm στη σάρκα των ιχθύων.

Οι διαφορετικές μέθοδοι θανάτωσης των ιχθύων, όπως η υποθερμία, η ασφυξία και το χτύπημα στο κεφάλι, δεν επηρεάζουν σημαντικά το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης και τις φυσικοχημικές μεταβολές των ιχθύων τσιπούρας σε συνθήκες αποθήκευσης στους 5°C.

**Λέξεις κλειδιά:** *Sparus aurata*, μικροβιακή αλλοίωση, φυσικοχημικές μεταβολές, τρόποι θανάτωσης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....   | 7  |
| 1.1 Γενικά.....   | 7  |
| 1.2 Τρόποι θανάτωσης ιχθύων .....   | 9  |
| 1.3 Μεταθανάτιες Μεταβολές .....  | 11 |
| 1.4 Νεκρική ακαμψία.....  | 11 |
| 1.5 Βακτηριολογικές αλλαγές και μικροβιακή ανάπτυξη.....  | 12 |
| 1.6 Ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί (Specific Spoilage Organisms) .....                              | 15 |
| 1.7 Μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας των νωπών αλιευμάτων .....                                    | 18 |
| 1.8 Συντήρηση των αλιευμάτων με ψύξη .....  | 23 |
| 1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....   | 23 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | 24 |
| 2.1 Γενικά.....   | 24 |
| 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός .....   | 24 |
| 2.2.1. Μικροβιολογική ανάλυση.....  | 25 |
| Διαδικασία.....   | 25 |
| Σχήμα 2.4 Επίστρωση του <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε τριβλία με<br>θρεπτικό υλικό STAA. .... | 31 |
| 2.2.2 Μέτρηση του pH .....  | 31 |
| 2.2.3 Μέτρηση της σκληρότητας .....   | 32 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....   | 34 |
| 3.1 Επίδραση των μεθόδων θανάτωσης στην ανάπτυξη της αλλοιωγόνου<br>χλωρίδας.....                   | 34 |
| 3.2. Μεταβολή του pH της σάρκας των ιχθύων .....  | 48 |

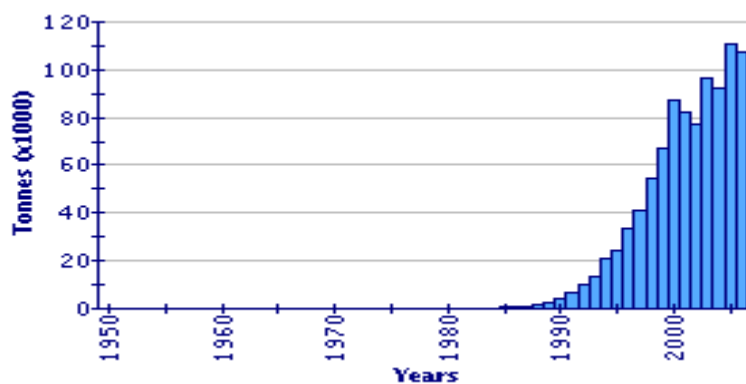
|  |    |
|--|----|
| 3.3. Μέτρηση της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων .....           | 52 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....  | 68 |
| 4.1 Επίδραση των μεθόδων θανάτωσης στη μικροβιακή ανάπτυξη .....   | 68 |
| 4.2 Συντήρηση των ιχθύων υπό ψύξη .....                            | 71 |
| 4.3 Μεταβολή του pH στη σάρκα των ιχθύων .....                     | 74 |
| 4.4 Μεταβολή της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων .....           | 80 |
| 4.5 Μαθηματικό μοντέλο παρουσίασης των δεδομένων ( Baranyi ) ..... | 84 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 86 |
| 5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....                                   | 86 |
| 5.2. Ελληνική βιβλιογραφία.....                                    | 96 |
| 6. ABSTRACT .....  | 97 |



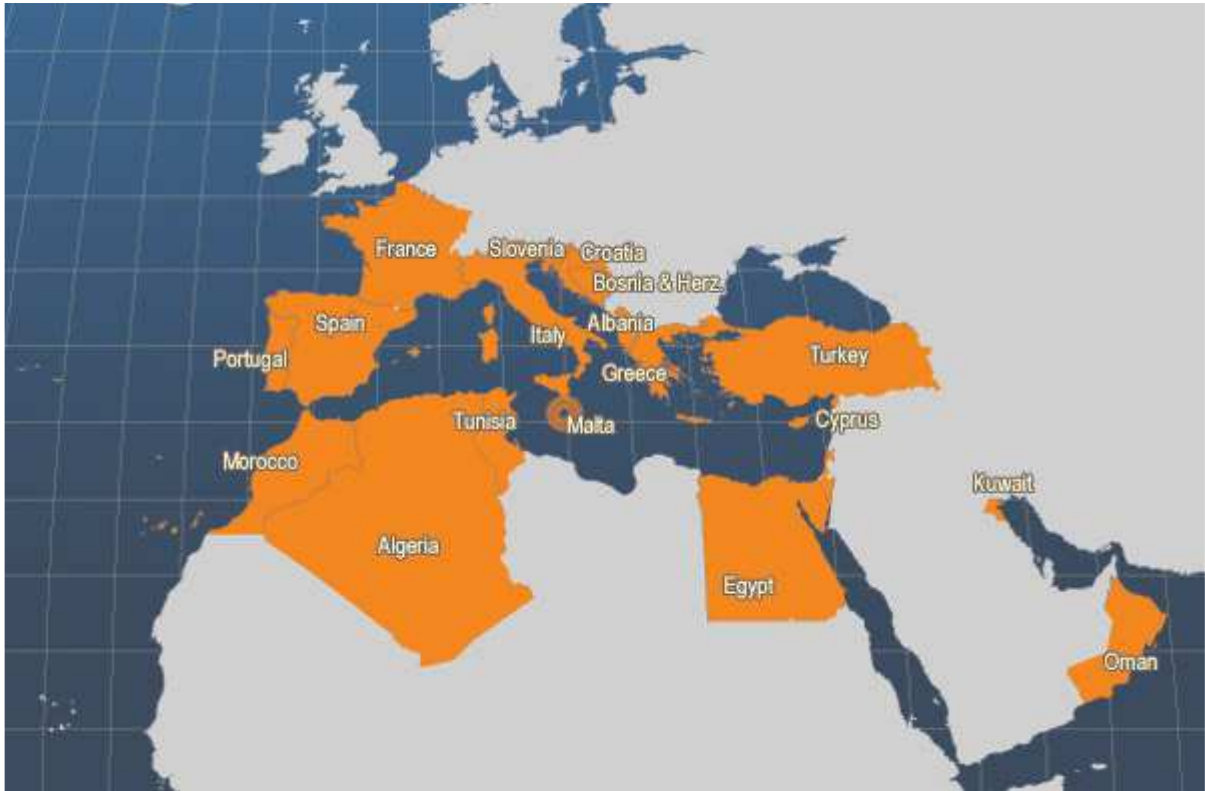
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά

Η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν σημαντικούς κλάδους οικονομικής δραστηριότητας του πρωτογενούς τομέα στη χώρα μας. Η πρώτη υπήρξε παραδοσιακά μια από τις κύριες δραστηριότητες και βασική πηγή εισοδήματος για τους κατοίκους πολλών παράκτιων περιοχών και κυρίως των νησιών μας (Βασιλειάδου, 2003). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η παραγωγή τσιπούρας υδατοκαλλιέργειας *Sparus aurata* από το έτος 1950 μέχρι και το έτος 2002 (FAO, 2002).



[Σχήμα 1.](#) [Παραγωγή τσιπούρας υδατοκαλλιέργειας \*Sparus aurata\*.](#) ( [FAO Fishery Statistic, 2002](#)).



**Εικόνα 1.** Οι κυριότερες χώρες παραγωγής του είδους *Sparus aurata* (FAO Fishery Statistics, 2002).

Η υπεραλίευση των αλιευτικών πεδίων και η συνεχόμενη ρύπανση που υφίσταται το υδάτινο περιβάλλον, σε συνδυασμό με τις συνεχόμενες ανάγκες της κατανάλωσης σε προϊόντα ζωικής προέλευσης υψηλής θρεπτικής και βιολογικής αξίας, συνιστούν τους κυριότερους λόγους που οδηγούν την εκρηκτική ανάπτυξη του κλάδου και προδιαγράφουν το ευοίωνο μέλλον του. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι κυριότερες χώρες παραγωγής του είδους *Sparus aurata*. Στη χώρα μας, η ανάπτυξη οφείλεται, κυρίως, στις ιδανικές γεωμορφολογικές, υδρολογικές και κλιματικές συνθήκες που επικρατούν καθ’

όλη τη διάρκεια του έτους. Η τσιπούρα και το λαβράκι αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής ελληνικής παραγωγής (FAO, 2003a).

### 1.2 Τρόποι θανάτωσης ιχθύων

Σήμερα οι καταναλωτές είναι περισσότερο εξοικειωμένοι με τα ψάρια ελεγχόμενης εκτροφής – ιχθυοκαλλιέργειας και δείχνουν εμπιστοσύνη στο τρόπο παραγωγής και επεξεργασίας τους από ότι τα παλαιότερα χρόνια. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν μέρος πριν και μετά τη θανάτωση είναι τα πιο σημαντικά σημεία για τη μεταχείριση μιας εκτροφής (Wall, 2001). Παρ' όλα αυτά, όσον αφορά τα μεσογειακά είδη, μέχρι τώρα έχει επιδειχθεί σχετικά λίγη δουλειά για τη σωστή μεταχείριση κατά τη θανάτωση. Μια αναφορά του Farm Animal Welfare Council το (1996) για παράδειγμα, παρέχει μια σειρά από συστάσεις για τις διαδικασίες θανάτωσης σχετικά με τα σολομοειδή και τα είδη πέστροφας, ενώ δεν υπάρχουν διαθέσιμες συστάσεις όσον αφορά το λαβράκι και την τσιπούρα.

Για τα περισσότερα εκτρεφόμενα είδη, με σκοπό την εξασφάλιση της καλής μεταχείρισης, οι διαδικασίες πριν τη θανάτωση θα πρέπει να εφαρμόζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μη προκαλείται πόνος, φόβος και γενικότερα συνθήκες που προκαλούν στρες. Πριν τη θανάτωση τα ψάρια πρέπει να μένουν νηστικά για μερικές μέρες και να συλλέγονται ακριβώς την στιγμή που θα θανατωθούν. Ο συνωστισμός των ψαριών πριν τη συλλογή πρέπει να μην υφίσταται σε μεγάλο βαθμό, έτσι ώστε να μη δημιουργείται έντονο στρες ([Poli et al., 2005](#)).

Η εκτεταμένη κατανάλωση ενέργειας λόγω των κινήσεων κατά τη θανάτωση οδηγεί σε μια γρήγορη κατανάλωση των αποθεμάτων ενέργειας, δηλαδή της ATP, την αύξηση του επιπέδου του γαλακτικού οξέως στη σάρκα των ψαριών με συνέπεια τη ρύθμιση του pH σε επίπεδα που να επιφέρουν τη νεκρική ακαμψία. Επομένως, τα ζώα που καταπονούνται κατά τη θανάτωση έρχονται στη φάση της νεκρικής ακαμψίας πολύ γρήγορα (Erikson [et al.](#), 1997), και τα φιλέτα τους επηρεάζονται δυσμενώς, εξαιτίας της υφής της σάρκας (Robb [et al.](#), 2000).

Επίσης, το στρες που προκαλείται πριν τη θανάτωση εκθέτει τη σάρκα των ψαριών στην οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), τα οποία μπορούν να καταλήξουν στη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί σημαντικές μεταβολές στα νουκλεοτιδικά οξέα, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια (Jenner, 1994). Σαν αποτέλεσμα, η θρεπτική αξία των φιλέτων των ψαριών μειώνεται μετά τη θανάτωση, εξαιτίας της φθοράς της υφής και της υποβάθμισης της γεύσης του προϊόντος λόγω της υποβάθμισης και της απώλειας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Waagb [et al.](#), 1993).

Οι μέθοδοι θανάτωσης πρέπει να ανταποκρίνονται σε μια γρήγορη και μη αναστρέψιμη απώλεια των αισθήσεων. Ο ιδανικός τρόπος θανάτωσης πρέπει να είναι εύκολος, να τηρεί την ορθή υγιεινή και να προκαλεί την ελάχιστη δυνατή καταπόνηση. Όταν τα ψάρια θανατώνονται γρήγορα, το στρες μπορεί να μειωθεί, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της καλής μεταχείρισης και της ποιότητας (Ottera [et al.](#), 2001). Η μικρή κατανάλωση ενέργειας κατά τη θανάτωση έχει αναφερθεί ότι επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μεθόδων

θανάτωσης οι οποίοι αφήνουν το ψάρι αμέσως αναίσθητο, όπως το κάρφωμα του εγκεφάλου με ένα αιχμηρό αντικείμενο, ένα χτύπημα στο κεφάλι και η καταστροφή του νωτιαίου μυελού (Mochizuki and Sato, 1994).

### 1.3 Μεταθανάτιες Μεταβολές

Στις μεταθανάτιες μεταβολές κυριαρχούν τα αυτολυτικά φαινόμενα, η οξειδωση και η υδρόλυση των λιπιδίων και η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός διαφόρων βακτηρίων (Βασιλειάδου, 2003). Στην αλλοίωση των αλιευμάτων λαμβάνουν χώρα φαινόμενα που αφορούν τη μικροβιακή δραστηριότητα, τις χημικές αντιδράσεις υποβάθμισης αλλά και την ενζυμική δραστηριότητα. Το ποσοστό συνεισφοράς του κάθε μηχανισμού στη συνολική αλλοίωση εξαρτάται από το κυρίως από το είδος του αλιεύματος, τον τύπο του προϊόντος (νωπό, επεξεργασμένο κλπ) και τις συνθήκες αποθήκευσης (αερόβια ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό κλπ). Έτσι για τους νωπούς ιχθύες με σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής, η αλλοίωση οφείλεται κυρίως σε βακτηριακή δραστηριότητα. Η συνεισφορά της χημικής οξειδωσης των λιπιδίων στη συνολική αλλοίωση είναι μεγαλύτερη στα λιπαρά από ότι στα άπαχα ψάρια (Μποζιάρης, 2008).

### 1.4 Νεκρική ακαμψία

Με τη μείωση της συγκέντρωσης της ATP κάτω από ένα ορισμένο, χαμηλό, κρίσιμο επίπεδο, η οριακή τιμή του οποίου ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης, και με την πτώση του pH στην κατώτερη τιμή επέρχεται η νεκρική ακαμψία, κατά την οποία οι μυς βρίσκονται σε διαρκή σύσπαση και το σώμα του ψαριού γίνεται άκαμπτο. Ο χρόνος που μεσολαβεί

από το θάνατο των ψαριών μέχρι την εμφάνιση της νεκρικής ακαμψίας και η χρονική της διάρκεια ποικίλλουν ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών και επηρεάζονται από τα αποθέματα γλυκογόνου (η καταπόνηση κατά τη σύλληψη τους τα εξαντλεί), το μέγεθος τους, τη θερμοκρασία συντήρησης και τους χειρισμούς που υφίσταται το προϊόν (Foegeding *et al.*, 1996). Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά της θερμοκρασίας του νερού απ' όπου προέρχονται τα ψάρια και εκείνη της συντήρησης τους, τόσο πιο σύντομος είναι ο χρόνος της έναρξης της νεκρικής ακαμψίας μετά το θάνατο τους και αντίστροφα (FAO, 2003b). Οι μεγαλύτερες αλλαγές συμβαίνουν με την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας. Αμέσως μετά το θάνατο η σάρκα είναι απόλυτα χαλαρή και ελαστική, για μερικές ώρες μέχρι οι μύς να συσπαστούν. Όταν η σάρκα έπειτα γίνει σκληρή και δύσκαμπτη ολόκληρο το σώμα γίνεται άκαμπτο και το ψάρι είναι πλέον στη φάση της νεκρικής ακαμψίας. Αυτό το στάδιο διαρκεί περίπου μια μέρα και έπειτα η νεκρική ακαμψία λύεται. Το τέλος της νεκρικής ακαμψίας κάνει τους μύς χαλαρούς και πλαδαρούς, αλλά όχι τόσο ελαστικούς όπως πριν. Ο δείκτης έναρξης και λήξης της νεκρικής ακαμψίας διαφέρει από είδος σε είδος και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, από τις μεταχειρίσεις, από το μέγεθος του ψαριού και γενικότερα από τις φυσικές συνθήκες του ψαριού.

### 1.5 Βακτηριολογικές αλλαγές και μικροβιακή ανάπτυξη

Στην εξωτερική επιφάνεια των ζωντανών ψαριών, στα βράγχια και στο πεπτικό τους σύστημα ανευρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί, η είσοδος των οποίων στη σάρκα αποτρέπεται από τη φυσική άμυνα του οργανισμού τους. Μετά το θάνατο των ψαριών, οι μικροοργανισμοί αυτοί (ή ένζυμά τους)

εισέρχονται και διαχέονται στη σάρκα, όπου αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται αρχικά με αργούς και στη συνέχεια με έντονους ρυθμούς. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ανεπιθύμητες αλλαγές της οσμής, της γεύσης και της εμφάνισης των υπό ψύξη ψαριών, με συνέπεια την ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωση του προϊόντος.

Ορισμένα είδη ψαριών, όπως η γλώσσα, περιέχουν στη βλέννα που καλύπτει το δέρμα τους, μηχανισμούς (π.χ. λυσοζύμες) που μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο δέρμα τους (Davis, 1995). Μετά τη σύλληψη και κατά τη συντήρησή τους τα ψάρια μπορεί να επιμολυνθούν με μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο νερό τους περιβάλλον (Davis, 1995) γεγονός που αποτρέπεται με τους σωστούς χειρισμούς και τη τήρηση των απαραίτητων συνθηκών υγιεινής (Connell, 1990).

Τα βακτήρια που φυσιολογικά συναντώνται στα ψάρια είναι συνήθως:

- Gram-αρνητικά: αερόβια, κυρίως ψυχρότροφα και ψυχρόφιλα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* και *Flavobacterium*, αλλά και μέλη της οικογένειας Cytophagaceae (*Flexibacter* sp.) και προαιρετικά αναερόβια, όπως είναι τα είδη του γένους *Aeromonas* και μέλη της οικογένειας Vibrionaceae (*Vibrio* και *Photobacterium*).
- Gram-θετικά όπως εκείνα των γενών *Micrococcus*, *Clostridium* και *Bacillus* spp. (FAO, 2003α).

Η κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα στα ζωντανά ψάρια αντανakλά εκείνη του βιοτόπου τους. Στα ψάρια που προέρχονται από κρύα και μέσης θερμοκρασίας νερά επικρατούν τα Gram αρνητικά βακτήρια, ενώ σε εκείνα που προέρχονται από θερμά νερά υπάρχει μεγάλη αναλογία Gram θετικών

βακτηρίων. Η *Aeromonas* sp. ανευρίσκεται κυρίως στα ψάρια γλυκών, κρύων νερών, ενώ κάποια άλλα βακτήρια όπως είναι τα *Vibrio*, *Photobacterium* και *Shewanella* απαιτούν νάτριο για την ανάπτυξη τους και αποτελούν την τυπική μικροβιακή χλωρίδα των θαλάσσιων νερών. Κάποια στελέχη της *Shewanella putrefaciens* μπορούν να απομονωθούν και στα γλυκά νερά. Σε ρυπασμένα νερά ανευρίσκονται υψηλοί αριθμοί βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (π.χ. *Escherichia coli*). Η μικροβιακή χλωρίδα που προκαλεί αλλοιώσεις των ψαριών κατά τη συντήρησή τους επηρεάζεται επίσης από το περιβάλλον όπου αυτοί συντηρούνται. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ψαριών με πάγο ή υπό ψύξη, η μεσόφιλη χλωρίδα υπερκαλύπτεται από τα ψυχρότροφα βακτήρια που αναπτύσσονται αρχικά στα βράγχια, το δέρμα και την εξωτερική βλέννα.

Η δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών γίνεται αντιληπτή την 7η ημέρα συντήρησης των ψαριών με πάγο (Hanna, 1992). Οι αρχικές χαρακτηριστικές οσμές και γεύσεις αλλοίωσης οφείλονται στη χρησιμοποίηση από τα μικρόβια σχετικά μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και κυρίως μη πρωτεϊνικών αζωτούχων ουσιών που περιέχονται στους ιστούς των ψαριών, όπως είναι τα αμινοξέα, μικρά πεπτίδια και ειδικά για τα θαλάσσια τελεόστεα ψάρια το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης ΤΜΑΟ (Davis, 1995). Η διάσπαση των πρωτεϊνών δεν συνεισφέρει ουσιαστικά στο σχηματισμό ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων του ψαριού μέχρις ότου η αλλοίωση έχει προχωρήσει αρκετά.

Η πιο χαρακτηριστική οσμή βακτηριακής αλλοίωσης στα θαλάσσια και ευρύαλα τελεόστεα ψάρια οφείλεται στη διάσπαση του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (ΤΜΑΟ), μιας άοσμης ουσίας που χρησιμοποιείται από



μερικούς αερόβιους μικροοργανισμούς ως πηγή οξυγόνου (Davis, 1995). Αρχικό προϊόν διάσπασης του είναι η τριμεθυλαμίνη (TMA) που από μόνη της προσδίδει στο τρόφιμο αμμωνιακή οσμή, ενώ σε συνδυασμό με λιπαρές ουσίες προσδίδει την έντονη οσμή «ψαριού». Η *Shewanella putrefaciens* είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του μεγαλύτερου ποσοστού του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης TMAO σε TMA (Hanna, 1992). Επίσης, τα περισσότερα εντεροβακτηριοειδή, με ελάχιστες εξαιρέσεις (*Shigella spp.*, κ.ά.) είναι ικανά να διασπάσουν το TMAO σε τριμεθυλαμίνη (TMA) (Alur *et al.*, 1995).

#### 1.6 Ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί (Specific Spoilage Organisms)

Η αλλοίωση των ψαριών και των προϊόντων τους είναι αποτέλεσμα των δυσάρεστων οσμών και γεύσεων που προκαλούνται από τη μεταβολική δράση των βακτηρίων (Gram and Huss, 1996). Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για την ποιοτική ασφάλεια των ιχθύων επικεντρώνεται στα μαθηματικά μοντέλα έτσι ώστε να παρατηρηθεί και να προβλεφθεί η βακτηριακή συμπεριφορά. Τα μοντέλα βακτηριακής ανάπτυξης χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την επίδραση των διαφορετικών θερμοκρασιών σε συνάρτηση με το χρόνο στη διάρκεια συντήρησης των ιχθύων στην αλυσίδα παραγωγής και διανομής τους (Koutsoumanis *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά η χρήση ενός μοντέλου η οποία προβλέπει ακριβώς την ανάπτυξη σε ένα φάσμα συνθηκών, μπορεί συχνά να είναι παραπλανητική για τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι παίζουν ρόλο κάποιοι εσωτερικοί και εξωτερικοί παράγοντες, διότι κάθε προϊόν έχει τη δική του αλλοιωγόνα μικροχλωρίδα και σαν συνέπεια ένα μοντέλο μικροβιακής ανάπτυξης είναι εφαρμόσιμο σε ένα περιορισμένο φάσμα, το οποίο προσδιορίζεται

από τη προέλευση του είδους, το τύπο του προϊόντος και τις συνθήκες αποθήκευσης. Αν και με σκοπό να επιτευχθεί η ακριβής πρόβλεψη της διάρκειας ζωής, είναι απαραίτητο να επιλεγθεί και να εφαρμοστεί ένα μικροβιακό μοντέλο το οποίο να αφορά αποκλειστικά την αλλοίωση του προϊόντος που μελετούμε, (Dalgaard, 1995) λαμβάνοντας υπόψη ότι η μόνη απαίτηση για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής του προϊόντος είναι να συλλεχθούν πληροφορίες για :

- 1) τους ειδικούς αλλοιωγόνους οργανισμούς (SSO's), δηλαδή για τους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση,
- 2) τον τομέα αλλοίωσης, δηλαδή το εύρος των περιβαλλοντικών συνθηκών στους οποίους ένας αλλοιωγόνος οργανισμός είναι υπεύθυνος για αλλοίωση και
- 3) το επίπεδο αλλοίωσης, δηλαδή ο πληθυσμός των αλλοιωγόνων στο επίπεδο του οποίου συντελείται αλλοίωση.

Αν προσδιορισθούν οι SSO's και η συγκέντρωση του πληθυσμού των βακτηρίων τότε μπορεί εύκολα να προβλεφθεί με τη χρήση ενός από τα υπάρχοντα μοντέλα ανάπτυξης αλλοιωγόνων οργανισμών το μέγεθος της αλλοίωσης. ( Dalgaard *et al.*, 1997b).

Το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Αποτελεί σημαντικό πληθυσμό των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του κρέατος και των προϊόντων του, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες ή σε κενό αέρος σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι περιστασιακά ο επικρατέστερος μικροοργανισμός. Είναι υπεύθυνος για κάποιες οσμές οι οποίες σηματοδοτούν την αλλοίωση σε συσκευασία κενού προϊόντων κρέατος. Παρόλο που ο

*Brocothrix thermosphacta* δεν είναι παθογόνο βακτήριο, είναι ένας αλλοιωγόνος μικροοργανισμός, ο οποίος αναπτύσσεται σε μια μεγάλη ποικιλία κρεάτων και των προϊόντων τους και παράγουν δύσοσμες μεταβολικές οσμές και κάνουν τα προϊόντα μη αποδεκτά από τους καταναλωτές.

Κάποια είδη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και η *P. fragi*, παράγουν φρουτώδεις οσμές, ενώ τα είδη του γένους *Moraxella spp.* παράγουν οσμή μούχλας (Hanna, 1992). Τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella*, στην τελική φάση που οδηγεί στην απόρριψη του προϊόντος, αποτελούν το 80% της ολικής χλωρίδας (Davis, 1995). Τα ψυχρότροφα αυτά βακτήρια είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραγωγή των ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων αλλοίωσης, οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι εκείνες των θειωδών (Sulphides) (Hanna, 1992). Ταχεία ανάπτυξη της αποκρουστικής οσμής υδρόθειου σε συγκεκριμένα σημεία του ψαριού παρατηρείται και στις περιπτώσεις δημιουργίας ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αναερόβιων μικροοργανισμών (μεγάλος αριθμός ψαριών μέσα σε περιέκτη ή ψυκτικό χώρο, χρήση περιεκτών από ξύλο κατ' εξακολούθηση) (Connell, 1990). Τα προϊόντα αυτά απορρίπτονται ως ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση.

Γενικά, η ακολουθία αλλαγών της οσμής και της γεύσης των ψαριών που οφείλονται στις ενώσεις που δημιουργούνται από τη μικροβιακή δραστηριότητα στη σάρκα τους είναι υπόξινες λαδιού ή φρουτώδεις αρχικά, μεταλλικές, θειώδεις ή ελαστικού στη συνέχεια και τέλος, στο στάδιο της σήψης, αμμωνίας και κοπράνων. Μια ταυτόχρονη ακολουθία αλλαγών παρατηρείται στην οσμή

των βραγχίων και των εσωτερικών κοιλοτήτων του σώματος των ψαριών (Connell, 1990) που είναι πιο έντονες από εκείνες της σάρκας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξαιρετικοί δείκτες του βαθμού αλλοίωσης των ψαριών.

### 1.7 Μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας των νωπών αλιευμάτων

Η φρεσκότητα (ή νωπότητα) είναι το πιο σημαντικό κριτήριο το οποίο καθορίζει και έχει άμεση σχέση με τη ποιότητα των ψαριών. Η απώλεια της φρεσκότητας ακολουθείται από την αλλοίωση, η οποία είναι ένας σύνθετος συνδυασμός από μικροβιολογικές, κυρίως, αλλά και χημικές ή/και φυσικές διεργασίες (Barat, 2008). Η γρήγορη αλλοίωση που επέρχεται στα ψάρια, είναι ένα πρόβλημα το οποίο δεν έχει επιλυθεί μέχρι και σήμερα.

Ο όρος «ποιότητα» στα ψάρια αναφέρεται συνήθως στην αισθητική εμφάνιση, στη φρεσκότητα ή στο βαθμό αλλοίωσης τον οποίο έχουν υποστεί από το χρόνο. Μπορεί επίσης να αφορά την ασφάλεια ποιότητας όπως να είναι απαλλαγμένα από βακτήρια, παράσιτα ή χημικές ουσίες (FAO, 2003a). Η φρεσκότητα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας όταν αναφερόμαστε στη ποιότητα του νωπού ψαριού. Παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες χημικές και φυσικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της φρεσκότητας, οι κυριότεροι ποιοτικοί παράγοντες για το ψάρι παραμένουν να είναι το άρωμα, η γεύση, η υφή και γενικότερα οι οργανοληπτικοί παράγοντες. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ψαριού είναι τα κυριότερα στοιχεία για την ικανοποίηση του καταναλωτή (Reineccius, 1990). Για την εκτίμηση της ποιότητας και της φρεσκότητας των αλιευμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί ποσοστά της συγκέντρωσης της ATP και της απώλειας της (Handumrongkul *et al.*, 1994). Οι

αναλογίες της νουκλεοτιδικής υποβάθμισης διαφέρουν από το ένα είδος στο άλλο (Chiba et al., 1991). Η ποιοτική υποβάθμιση της σάρκας των ψαριών αρχίζει από τη στιγμή της σύλληψης τους και εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος, τη θρεπτική τους κατάσταση και κυρίως τη λιποπεριεκτικότητα τους, το υδάτινο περιβάλλον διαβίωσης τους, τη μέθοδο αλιείας τους ή τις συνθήκες συλλογής τους, τους χειρισμούς τους οποίους υφίστανται μετά τη σύλληψη τους και τις συνθήκες συντήρησής τους (Βαρελτζής, 1999).

Γενικά για την ποιοτική αξιολόγηση των αλιευμάτων χρησιμοποιούνται :

#### Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος αφορά στην αξιολόγηση της εμφάνισης και της οσμής των νωπών αλιευμάτων, καθώς και του αρώματος, της γεύσης και της δομαιοσθησίας μετά την έψησή τους (Βαρελτζής, 1999). Επιστημονικά η διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί σε τρία βήματα. Ανίχνευση ενός ερεθίσματος από τα ανθρώπινα αισθητήρια όργανα, αξιολόγηση και ερμηνεία από μια διεργασία μέσω των αισθήσεων και στη συνέχεια το αποτέλεσμα του βαθμολογητή στα ερεθίσματα.

#### Μηχανικές και φυσικές μέθοδοι

Χρησιμοποιούνται μηχανικές και φυσικοί μέθοδοι για τη μέτρηση του σχήματος και του μεγέθους των αλιευμάτων, την εκτίμηση της δομαιοσθησίας (texture) των ψαριών ή του «σουρίμι», της σκληρότητας του κελύφους κάποιων καρκινοειδών (π.χ. καβούρι), του χρώματος των αλιευμάτων νωπών και επεξεργασμένων, κ.τ.λ.

Για την ποιοτική αξιολόγηση των νωπών ψαριών με τις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι μηχανικού εξοπλισμού και πολλά είδη οργάνων. Μερικά από αυτά είναι:

- ηλεκτρονικοί υπολογιστές, εφοδιασμένοι με ειδικά προγράμματα για την ταξινόμηση των ψαριών κατά βάρος, την αναγνώριση ορισμένων ειδών αλιευμάτων, την εξέταση φιλέτων για τυχόν σφάλματα και τη βαθμολόγησή τους σύμφωνα με τα δεδομένα της κάθε περίπτωσης,
- μηχανήματα για το διαχωρισμό των θηλυκών από τα αρσενικά άτομα (για τη ρέγγα),
- συσκευές για την εκτίμηση του βαθμού νωπότητας,
- αυτόματες ή ημιαυτόματες συσκευές για γρήγορη μέτρηση της υγρασίας και του λίπους των ψαριών για βιομηχανικούς σκοπούς (Connell, 1990, Βαρελιτζής, 1997).

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των μεθόδων προσδιορισμού της νωπότητας των ψαριών είναι η αποφυγή πρόκλησης βλάβης στα εξεταζόμενα δείγματα (μη καταστροφικές μέθοδοι). Οι μέθοδοι που σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως αναφέρονται στη συνέχεια.

- 1) Η μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης (R) και της χωρητικότητας (C) του δέρματος και των υποκείμενων ιστών των ψαριών.
- 2) Δείκτες χρόνου-θερμοκρασίας (Time – Temperature Indicators: TTIs).
- 3) Η αξιολόγηση των μεταβολών της μικροδομής της σάρκας των ψαριών.

- 4) Η χρησιμοποίηση φασματοσκοπίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (Near – Infrared Spectroscopy – NIR).
- 5) Η μέτρηση της δομαιοσθησίας (texture) - συνεκτικότητας της σάρκας των αλιευμάτων.
- 6) Η μέτρηση του χρώματος των αλιευμάτων.

Φυσικοχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ενεργού οξύτητας (pH) της και του ΣΕΥ της σάρκας των νωπών ψαριών και άλλων ειδών αλιευμάτων

Αποτελεί το δείκτη της επιδεκτικότητας ενός τροφίμου και υπόκειται σε βιοχημικές και χημικές μεταβολές αλλά και στη μικροβιακή δραστηριότητα στο συγκεκριμένο προϊόν (Horner, 1992).

Χημικές και Βιοχημικές μέθοδοι

Οι χημικές αναλύσεις αφορούν στον προσδιορισμό της υγρασίας, της τέφρας, των ολικών πρωτεϊνών, των ολικών λιπαρών ουσιών και του χλωριούχου νατρίου, με μεθόδους κατά ISO ή που προτείνονται από οργανισμούς όπως ο AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ή η ALPHA (American Public Health Association). Οι βιοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στον προσδιορισμό συγκεκριμένων ουσιών που παράγονται από τη δράση ενδογενών ενζύμων ή ορισμένων βακτηρίων στα συστατικά της σάρκας των αλιευμάτων.

### Μικροβιολογικές μέθοδοι

Πρόκειται για την εκτίμηση της μικροβιολογικής κατάστασης των αλιευμάτων και για μετρήσεις του μικροβιακού φορτίου των ψαριών που βρίσκονται σε άμεση συσχέτιση με τη νωπότητά τους ή των πληθυσμών παθογόνων βακτηρίων που δίνουν μια εικόνα της τήρησης των συνθηκών υγιεινής σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων, από τη στιγμή της σύλληψης ή συλλογής τους έως την πώληση τους. Ως δείκτες χρησιμοποιούνται:

- η Ολική Αερόβια Χλωρίδα των ψαριών, η οποία έχει υψηλή συσχέτιση με το χρόνο συντήρησης των ψαριών υπό ψύξη και με την οργανοληπτική τους ποιότητα
- ορισμένες ομάδες βακτηρίων που ορίζονται ως «ειδικοί οργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις» (Specific Spoilage Organisms - SSO), στις οποίες περιλαμβάνονται τα βακτήρια *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas spp.*, κ.ά. (Βαρελιτζής, 1999, FAO, 2003α, b).
- Τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* (Harrigan, 2002).

#### 1.8 Συντήρηση των αλιευμάτων με ψύξη

Η συντήρηση των αλιευμάτων με ψύξη επιμηκύνει την υψηλής ποιότητας διάρκεια ζωής τους (*High Quality Life – HQL*) που μπορεί να ορισθεί ως η διάρκεια ζωής του προϊόντος προς διάθεση του στον καταναλωτή (*shelf-life*), κατά το χρονικό διάστημα της οποίας αυτό διατηρεί



την ανώτερη ποιότητα του. Η διάρκεια ζωής (shelf-life) των υπό ψύξη αλιευμάτων *ποικίλλει από είδος σε είδος*.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος συντήρησης των ψαριών και άλλων αλιευμάτων υπό ψύξη είναι η χρήση πάγου σε νιφάδες (flakes) (Βαρελιτζής 1999; Connell et al., 1990)

Η άνοδος του pH που παρατηρείται κατά τη διάρκεια συντήρησης των ψαριών υπό ψύξη οφείλεται στη βαθμιαία συγκέντρωση πτητικών βάσεων που προέρχονται από τη βακτηριακή δράση επί των ελεύθερων αμινοξέων αρχικά και των πρωτεϊνών στη συνέχεια, καθώς και επί του μη πρωτεϊνικού αζώτου (Alur *et al.*, 1995).

### 1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης των ιχθύων τσιπούρας και οι φυσικοχημικές μεταβολές που υφίσταται με τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης και αποθήκευση με ψύξη στους 5°C. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναμένεται να αποδειχτούν χρήσιμα σε κλάδους οι οποίοι ασχολούνται με τη ποιότητα των νωπών αλιευμάτων, όπως ιχθυοκαλλιέργειες και βιομηχανίες επεξεργασίας και μεταποίησης αλιευμάτων.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Γενικά

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών τρόπων θανάτωσης του είδους *Sparus aurata*:

- στο μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης,
- στις μεταβολές του pH και
- στη μεταβολή της σκληρότητας της σάρκας κατά την αποθήκευσή της στους 5°C.

### 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Οι μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις. Η προμήθεια των ιχθύων έγινε από την καθετοποιημένη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας Μπιτσάκος Α.Ε., που λειτουργεί στη περιοχή της Λάρυμνα του νομού Φθιώτιδος. Αμέσως μετά την εξαλίευση των ιχθύων ακολούθησε η θανάτωση τους με 3 διαφορετικούς τρόπους. Το ένα τρίτο θανατώθηκε με τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι (με τη βοήθεια ενός αιχμηρού αντικειμένου), ένα τρίτο θανατώθηκε με τη μέθοδο της ασφυξίας (παρέμειναν έξω από το νερό-μέθοδος αλιέων) και το τελευταίο τρίτο θανατώθηκε με τη μέθοδο του παγωμένου νερού (μέθοδος θανάτωσης την μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας-υποθερμία). Τα ψάρια συσκευάστηκαν σε κιβώτια με πάγο, ανά κατηγορία θανάτωσης και μεταφέρθηκαν μέσα σε χρονικό διάστημα τριών ωρών στο εργαστήριο μικροβιολογίας όπου και αποθηκεύθηκαν στους 5°C. Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με την άφιξη των ιχθύων στο εργαστήριο. Κάθε επανάληψη αποτελούνταν από 30 δείγματα (δέκα δείγματα για κάθε μέθοδο θανάτωσης). Το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν 90

ιχθύες. Η κάθε μια από τις 3 επαναλήψεις περιελάμβανε καθημερινές μετρήσεις για 10 μέρες.

### 2.2.1. Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε για να προσδιορίσει το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης των ιχθύων για τη κάθε περίπτωση – τρόπο θανάτωσης κατά τη συντήρησή τους, σε θερμοκρασία αποθήκευσης 5°C .

Η μικροβιολογική εξέταση περιελάμβανε τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC), των βακτηρίων που παράγουν H<sub>2</sub>S (*Shewanella putrefaciens*), των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*) και του *Brochothrix thermosphacta*.

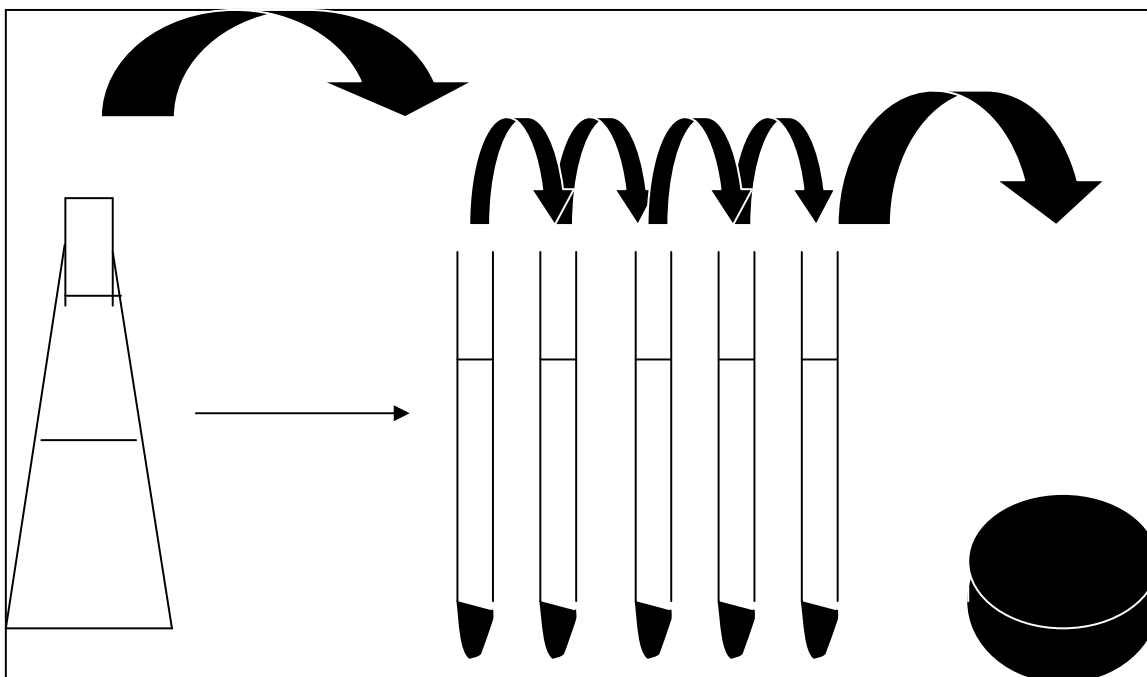
#### Διαδικασία

1. Σε ασηπτικές συνθήκες λαμβάνονταν δείγμα 10 g από τη σάρκα του ψαριού και ελάμβανε χώρα μεταφορά του σε σακούλα stomacher με 90 ml αποστειρωμένο διάλυμα MRD (Maximum Recovery Diluent, 0,85% NaCl, 0,1% bacteriological peptone).
2. Έπειτα το παρασκεύασμα ομογενοποιούνταν για 1 λεπτό σε συσκευή stomacher (BAGMIXER 400, Interscience) (Εικ. 2.1).
3. Κατόπιν από το κάθε παρασκεύασμα λαμβάνονταν δείγμα και ακολουθούσε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων (Σχ. 2.1).
4. Τέλος, πραγματοποιούνταν εξάπλωση ή ενσωμάτωση σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και ακολουθούσε επώαση σε διάρκεια και θερμοκρασία ανάλογα με την περίπτωση.

5. Για την καταμέτρηση επιλέχθηκε η αραίωση όπου ο αριθμός αποικιών κυμαίνονταν από 15 έως 300.



**Εικόνα 2.1** Συσκευή stomacher (BAGMIXER 400, Interscience).

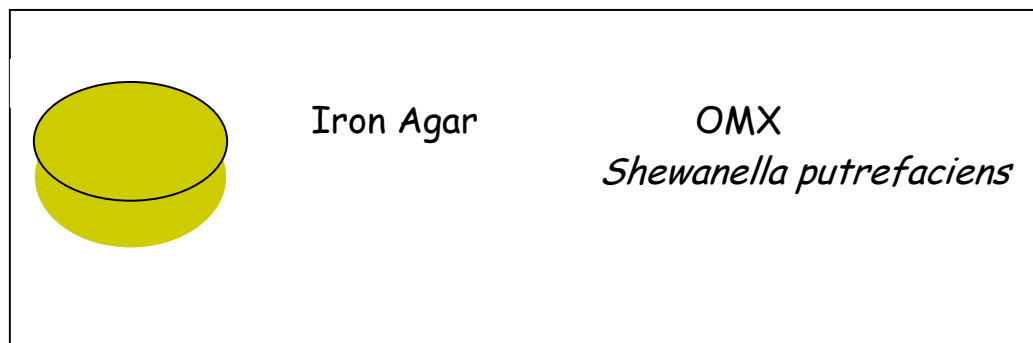


**Σχήμα 2.1** Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Για τη προσαρμογή της σιγμοειδούς καμπύλης στα δεδομένα αύξησης του λογαρίθμου του πληθυσμού σε συνάρτηση με το χρόνο χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Baranyi (Baranyi et al., 1993), με χρήση κατάλληλου λογισμικού.

#### Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX – total viable counts)

Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας καθώς και των βακτηρίων που παράγουν  $H_2S$  (*Shewanella putrefaciens*) έγινε με ενσωμάτωση σε θρεπτικό υλικό Iron Agar (AI) ( bacteriological peptone 20gr/l, Meat (Beef) Extract 3 gr/l, Yeast Exctract 3 gr/l, Ferric Citrate 0.3 gr/l, Sodium Thiosulphate 0.3 gr/l, Sodium Chloride 5 gr/l, L-cysteine 0.6gr/l, Agar 12 gr/l. και pH: 7.4) και επώαση στους 25°C για 48 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες (Σχ. 2.2).

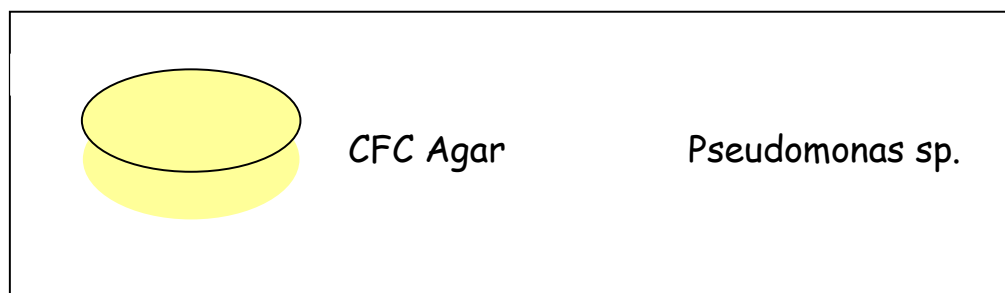


**Σχήμα 2.2** Ενσωμάτωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας καθώς και των βακτηρίων που παράγουν  $H_2S$  (*Shewanella putrefaciens*) σε θρεπτικό υλικό Iron Agar (AI).

Οι αποικίες που εμφανίστηκαν να έχουν μαύρο χρώμα καταμετρήθηκαν ως *Shewanella putrefaciens* ενώ για τον προσδιορισμό του συνολικού πληθυσμού καταμετρήθηκε το σύνολο των αποικιών.

#### Ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*)

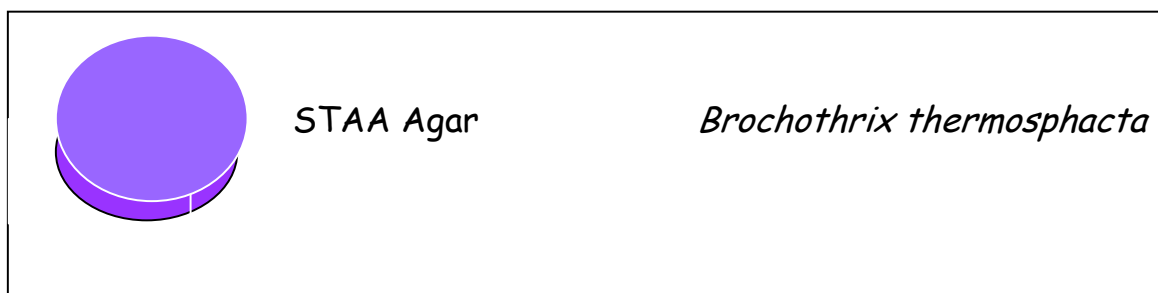
Για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ψευδομονάδων έγινε επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό υλικό CFC (cetrimide fusidin cephaloridine-LAB M) και καταμέτρηση μετά από επώαση στους  $25^{\circ}C$  για 48 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες. (Σχ.2.3)



**Σχήμα 2.3** Επίστρωση ψευδομονάδων σε τριβλία με θρεπτικό υλικό CFC.

*Brochothrix thermosphacta*

Για το προσδιορισμό του *Brochothrix thermosphacta* έγινε επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό υλικό STAA (sulfate-thalious acetate-cycloheximide actidione- Biolife) και επώαση στους 25°C για 72 ώρες σε αερόβιες συνθήκες. (Σχ. 2.4)



**Σχήμα 2.4** Επίστρωση του *Brochothrix thermosphacta* σε τριβλία με θρεπτικό υλικό STAA.

### 2.2.2 Μέτρηση του pH

Έγινε μέτρηση του pH της πρώτης δεκαδικής αραίωσης για κάθε μια περίπτωση χρησιμοποιώντας πεχάμετρο (Εικ. 2.2) (pH 730, inolab, WTW series).



**Εικόνα 2.2** Πεχάμετρο (pH 730, inolab, WTW series)

### 2.2.3 Μέτρηση της σκληρότητας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της σκληρότητας σε όλα τα δείγματα ψαριών σε τρία διαφορετικά σημεία, με τη βοήθεια του δυναμόμετρου AEGIS 1000 (ADMET-Model SM 250), με διάμετρο εμβόλου 12.5mm, βάθος 5mm και ταχύτητα καθόδου 100mm/min ( Εικ. 2.3).



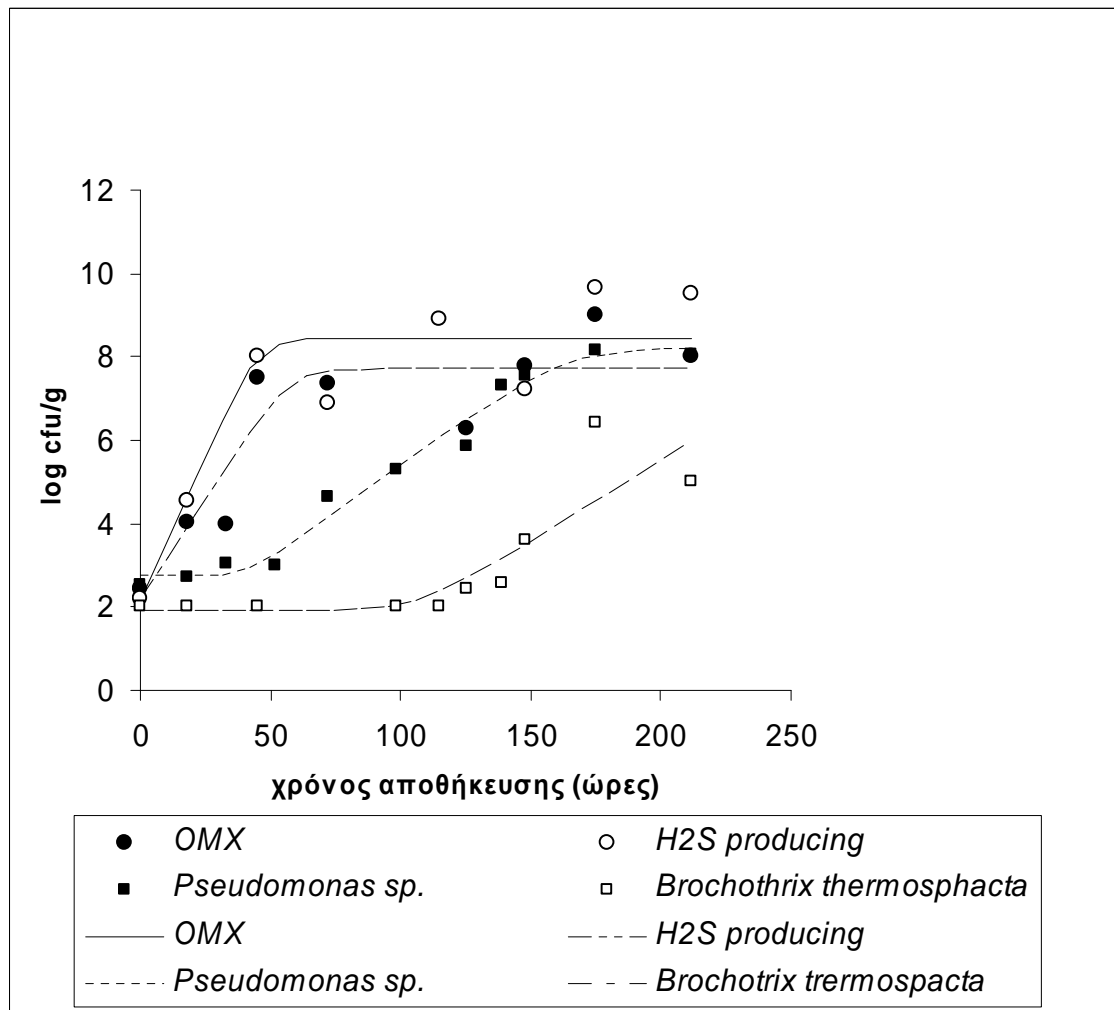


**Εικόνα 2.3** Δυναμόμετρο AEGIS 1000 (ADMET-Model SM 250)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Επίδραση των μεθόδων θανάτωσης στην ανάπτυξη της αλλοιωγόνου χλωρίδας

Οι καμπύλες αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στη σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C, παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.1, 3.2, 3.3, αντίστοιχα . Η προσαρμογή της σιγμοειδούς καμπύλης αύξησης στα διαγράμματα μεταβολής πληθυσμού (log cfu/g) σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης για την OMX, τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S (*Shewanella putrefaciens*), τους *Pseudomonas* sp, και το *Brochothrix thermosphacta*, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Baranyi (Baranyi *et al.* 1992).

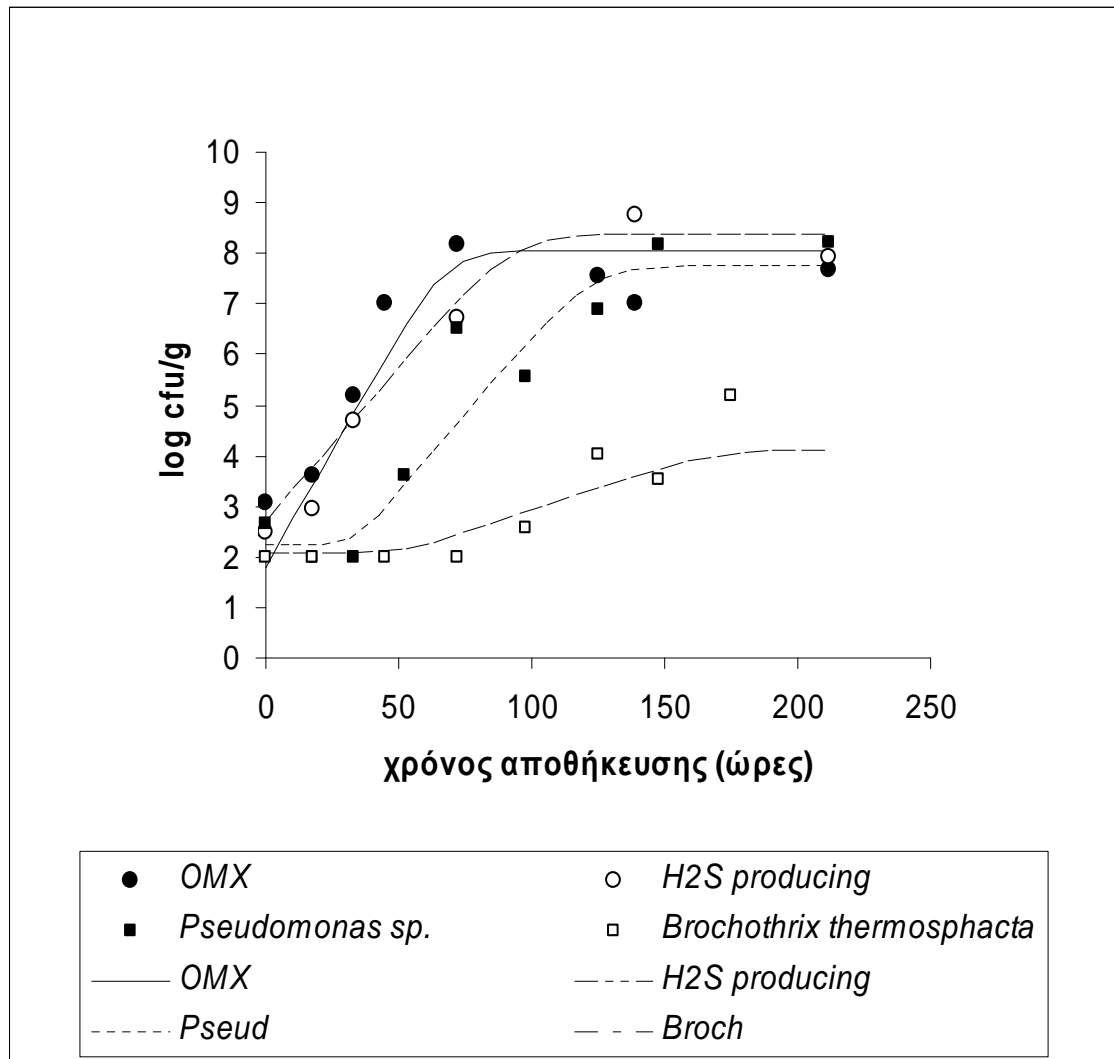


**Σχήμα 3.1** Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού στη σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της υποθερμίας. Τα δεδομένα αφορούν τον μέσο όρο των τριών επαναλήψεων. (Οι κουκίδες στο γράφημα συμβολίζουν τις τιμές των δεδομένων και οι γραμμές την εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου του Baranyi σύμφωνα με τις αυτές τις τιμές.)

Στο Σχήμα 3.1 φαίνεται ότι ο μικροβιακός πληθυσμός κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα της τάξεως των  $5 \times 10^2$  cfu/g. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που παράγουν  $H_2S$  και των ψευδομονάδων, οι οποίοι είναι οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, φτάνουν στο επίπεδο των  $10^8$  cfu/g μετά

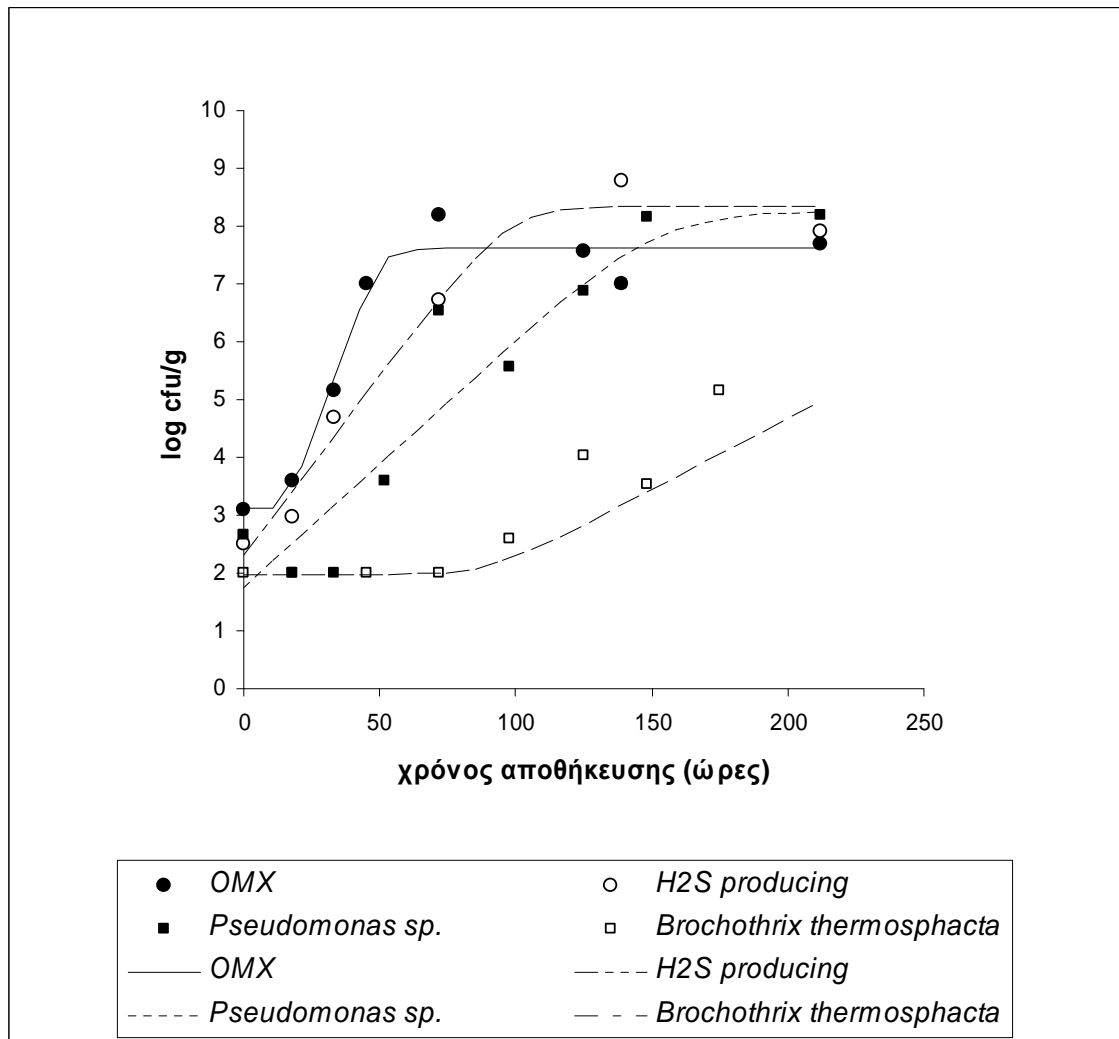
τη τέταρτη μέρα συντήρησης των ιχθύων στους 5°C, στη σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της υποθερμίας. Ο *Brochothrix thermosphacta* βρέθηκε πάνω από το επίπεδο ανίχνευσης όταν οι ειδικοί αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί έφτασαν στη στατική φάση. Τη πιο γρήγορη ανάπτυξη του πληθυσμού την παρουσιάζει η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, οι οργανισμοί που παράγουν  $H_2S$ , οι ψευδομονάδες και ο *Brochothrix thermosphacta* αντίστοιχα.

Η αλλοίωση, με την έννοια του μη αποδεκτού για κατανάλωση σημειώθηκε μετά την τέταρτη μέρα συντήρησης στους 5°C. Το επίπεδο αλλοίωσης, του βακτηριακού πληθυσμού στο σημείο απόρριψης των ιχθύων ήταν περίπου στα  $10^8$  cfu/g.



**Σχήμα 3.2** Απεικόνιση της μικροβιακής ανάπτυξης σε ψάρια που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας. (Οι κουκίδες στο γράφημα συμβολίζουν τις τιμές των δεδομένων και οι γραμμές την εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου του Baranyi σύμφωνα με τις αυτές τις τιμές.).

Στο Σχήμα 3.2 φαίνεται ότι ο μικροβιακός πληθυσμός κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα των  $5 \times 10^2$  cfu/g για τα ψάρια που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας.



**Σχήμα 3.3** Απεικόνιση της μικροβιακής ανάπτυξης σε ψάρια που θανατώθηκαν με τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι. (Οι κουκίδες στο γράφημα συμβολίζουν τις τιμές των δεδομένων και οι γραμμές την εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου του Baranyi σύμφωνα με τις αυτές τις τιμές.)

Στο Σχήμα 3.3 ακολουθείται η ίδια πορεία μικροβιακής ανάπτυξης με τις προηγούμενες μεθόδους θανάτωσης με μια ελάχιστη αύξηση των ψευδομονάδων πάνω από το επίπεδο της Ο.Μ.Χ. μετά την έκτη μέρα αποθήκευσης.

Οι ρυθμοί αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών υπολογίσθηκαν για κάθε επανάληψη της κάθε μεταχείρισης, προσαρμόζοντας την σιγμοειδή εξίσωση Baranyi στην σειρά δεδομένων κάθε επανάληψης ώστε να εκτιμηθεί ο μέσος όρος του ρυθμού αύξησης και να συγκριθεί σε σχέση με τον κάθε τρόπο θανάτωσης. Τα συνολικά αυτά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1** .Ρυθμοί αύξησης  $\pm$  τυπική απόκλιση, της ΟΜΧ, των βακτηρίων που παράγουν  $H_2S$  και των Ψευδομονάδων στην σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης  $5^\circ C$ . Ο ρυθμός αύξησης είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων.

| <b>Ρυθμός αύξησης (ώρες<sup>-1</sup>)</b>             |  |              |              |              |                     |                 |
|---|--|--------------|--------------|--------------|---------------------|-----------------|
| <b>Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα</b>                         |  |              |              |              |                     |                 |
| -   |  | Επανάληψη 1  | Επανάληψη 2  | Επανάληψη 3  | Μ.Ο                 | τυπική απόκλιση |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>                                      |  | <u>0,067</u> | <u>0,129</u> | <u>0,142</u> | <b><u>0,113</u></b> | <u>0,040</u>    |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>  |  | <u>0,037</u> | <u>0,097</u> | <u>0,129</u> | <b><u>0,088</u></b> | <u>0,046</u>    |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>                             |  | <u>0,025</u> | <u>0,087</u> | <u>0,059</u> | <b><u>0,057</u></b> | <u>0,031</u>    |
| <b>Μικροοργανισμοί που παράγουν <math>H_2S</math></b> |  |              |              |              |                     |                 |
| -   |  | Επανάληψη 1  | Επανάληψη 2  | Επανάληψη 3  | Μ.Ο                 | τυπική απόκλιση |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>                                      |  | <u>0,039</u> | <u>0,040</u> | <u>0,111</u> | <b><u>0,064</u></b> | <u>0,041</u>    |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>  |  | <u>0,084</u> | <u>0,075</u> | <u>0,094</u> | <b><u>0,085</u></b> | <u>0,009</u>    |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>                             |  | <u>0,058</u> | <u>0,070</u> | <u>0,108</u> | <b><u>0,079</u></b> | <u>0,026</u>    |
| <b>Ψευδομονάδες</b>                                   |  |              |              |              |                     |                 |
| -   |  | Επανάληψη 1  | Επανάληψη 2  | Επανάληψη 3  | Μ.Ο                 | τυπική απόκλιση |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>                                      |  | <u>0,046</u> | <u>0,056</u> | <u>0,053</u> | <b><u>0,051</u></b> | <u>0,004</u>    |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>  |  | <u>0,063</u> | <u>0,051</u> | <u>0,095</u> | <b><u>0,070</u></b> | <u>0,022</u>    |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>                             |  | <u>0,050</u> | <u>0,039</u> | <u>0,053</u> | <b><u>0,047</u></b> | <u>0,007</u>    |

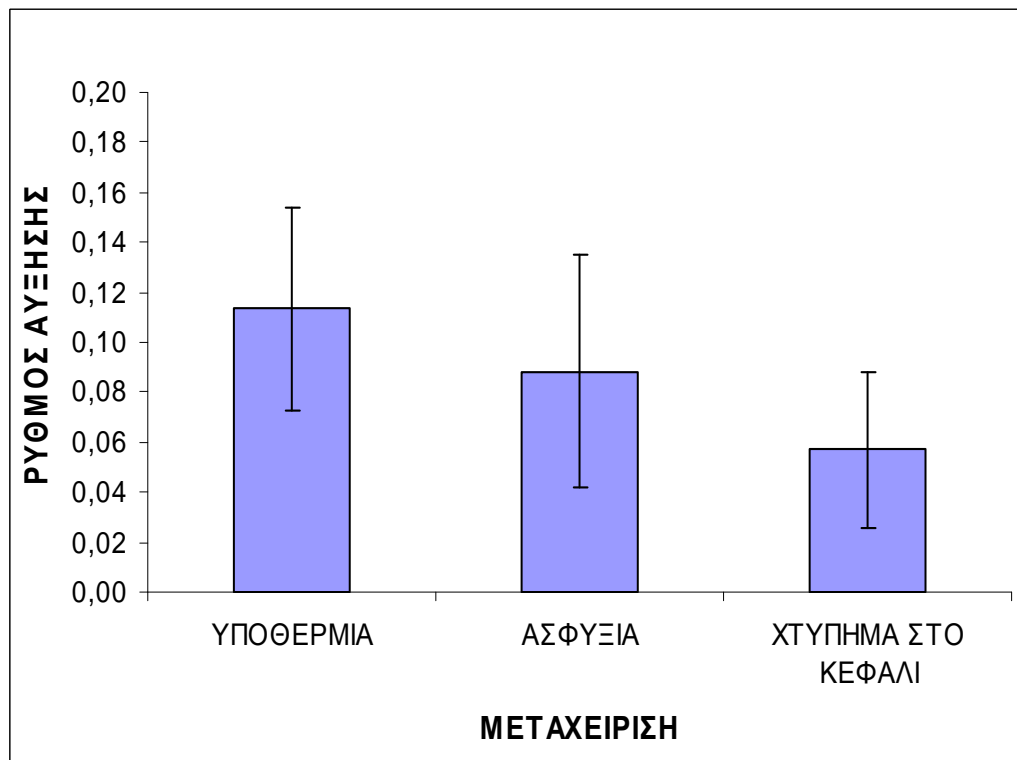


Στο παραπάνω πίνακα παρουσιάζεται ο ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν για τη κάθε μια διαφορετική μέθοδο θανάτωσης.

#### Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

Ο μέσος ρυθμός αύξησης της Ο.Μ.Χ για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται στο

Σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.4 Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας με τους 3 διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες αποθήκευσης στους 5°C. (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση).

Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του ρυθμού αύξησης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας διαφέρουν ελάχιστα για τη κάθε διαφορετική μέθοδο θανάτωσης και αυτό αποδεικνύεται και από την ανάλυση της διακύμανσης που παρατίθεται παρακάτω (Πίν. 3.2).

**Πίνακας 3.2.** Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα του μέσου ρυθμού αύξησης τριών επαναλήψεων της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στην σάρκα ιχθύων τσιπούρας που θανατώθηκαν με διαφορετικούς τρόπους και αποθηκεύθηκαν στους 5°C.

| <u>Ομάδες</u>    | <u>Αριθμός</u>     |                 | <u>Μέσος</u> |                   |
|------------------|--------------------|-----------------|--------------|-------------------|
|                  | <u>επαναλήψεων</u> | <u>Άθροισμα</u> | <u>όρος</u>  | <u>Διακύμανση</u> |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u> | <u>3</u>           | <u>0.340</u>    | <u>0.113</u> | <u>0.001</u>      |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>   | <u>3</u>           | <u>0.264</u>    | <u>0.088</u> | <u>0.002</u>      |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u>   |                    |                 |              |                   |

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

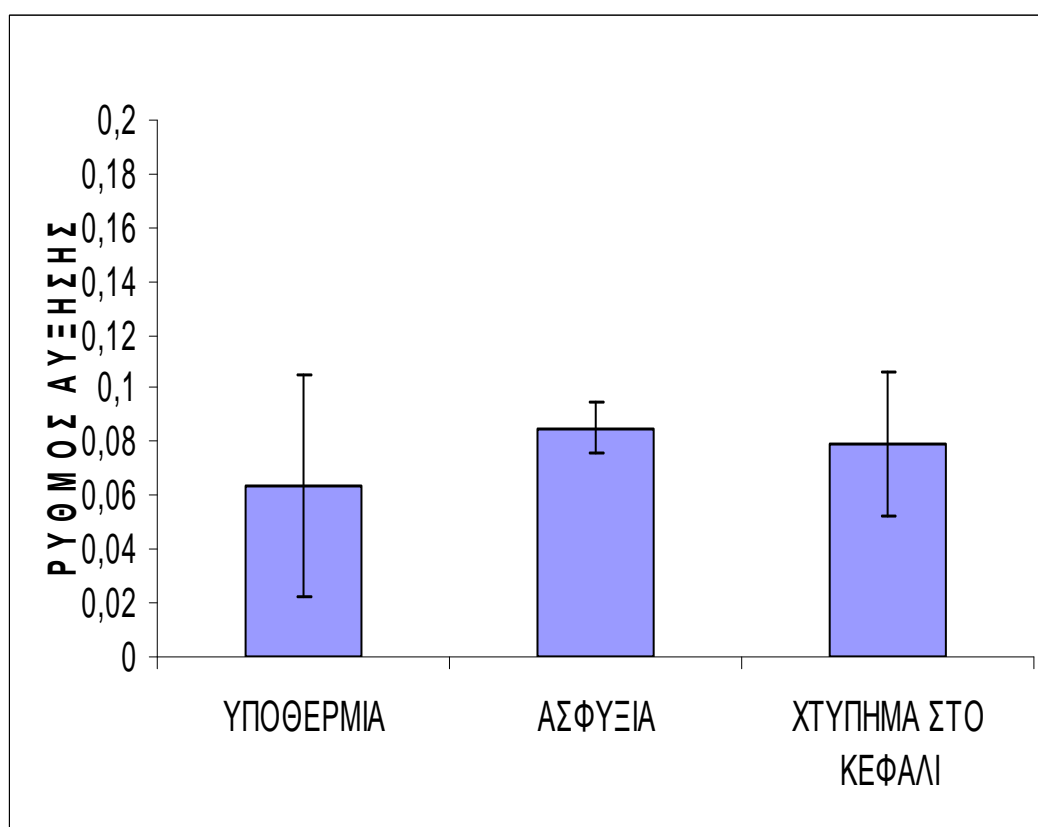
| <u>Προέλευση</u>   | <u>Βαθμοί</u> |                   | <u>Κριτήριο</u> |          |               |          |
|--------------------|---------------|-------------------|-----------------|----------|---------------|----------|
| <u>διακύμανσης</u> | <u>SS</u>     | <u>ελευθερίας</u> | <u>MS</u>       | <u>F</u> | <u>τιμή-P</u> | <u>F</u> |
| Μεταξύ ομάδων      | 0.004         | 2                 | 0.002           | 1.488    | 0.298         | 5.143    |
| Μέσα στις ομάδες   | 0.009         | 6                 | 0.001           |          |               |          |
| Σύνολο             | 0.014         | 8                 |                 |          |               |          |

Ο ρυθμός αύξησης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας για τις τρεις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης είναι 0,113 ώρες<sup>-1</sup> για την υποθερμία, 0,088

ώρες<sup>-1</sup> για την ασφυξία και 0,057 ώρες<sup>-1</sup> για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι.

### Μικροοργανισμοί που παράγουν H<sub>2</sub>S

Ο μέσος ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν H<sub>2</sub>S για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5.



**Σχήμα 3.5** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών που παράγουν H<sub>2</sub>S με τους 3 διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες αποθήκευσης στους 5°C. (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη ± τυπική απόκλιση).

Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του ρυθμού αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν H<sub>2</sub>S διαφέρουν ελάχιστα για την κάθε διαφορετική μέθοδο

θανάτωσης και αυτό αποδεικνύεται και από την ανάλυση της διακύμανσης που παρατίθεται παρακάτω (Πίν. 3.3).

**Πίνακας 3.3.** Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα του ρυθμού αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν H<sub>2</sub>S στην σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με διαφορετικούς τρόπους και αποθηκεύθηκαν στους 5°C.

| <u>Ομάδες</u>              | <u>Αριθμός</u>     |                   | <u>Μέσος</u> |                 | <u>Διακύμανση</u> |              |
|----------------------------|--------------------|-------------------|--------------|-----------------|-------------------|--------------|
|                            | <u>επαναλήψεων</u> | <u>Άθροισμα</u>   | <u>όρος</u>  |                 |                   |              |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>           | <u>3</u>           | <u>0.192</u>      | <u>0.064</u> |                 | <u>0.001</u>      |              |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>             | <u>3</u>           | <u>0.255</u>      | <u>0.085</u> |                 | <u>9.184</u>      |              |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u>             |                    |                   |              |                 |                   |              |
| <u>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>          | <u>3</u>           | <u>0.237</u>      | <u>0.079</u> |                 | <u>0.000</u>      |              |
| <u>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ</u> |                    |                   |              |                 |                   |              |
| <u>Προέλευση</u>           | <u>Βαθμοί</u>      |                   |              | <u>Κριτήριο</u> |                   |              |
| <u>διακύμανσης</u>         | <u>SS</u>          | <u>ελευθερίας</u> | <u>MS</u>    | <u>F</u>        | <u>τιμή-P</u>     | <u>F</u>     |
| <u>Μεταξύ ομάδων</u>       | <u>0.000</u>       | <u>2</u>          | <u>0.000</u> | <u>0.422</u>    | <u>0.673</u>      | <u>5.143</u> |
| <u>Μέσα</u>                |                    |                   |              |                 |                   |              |
| <u>στις ομάδες</u>         | <u>0.004</u>       | <u>6</u>          | <u>0.000</u> |                 |                   |              |
| <u>Σύνολο</u>              | <u>0.005</u>       | <u>8</u>          |              |                 |                   |              |

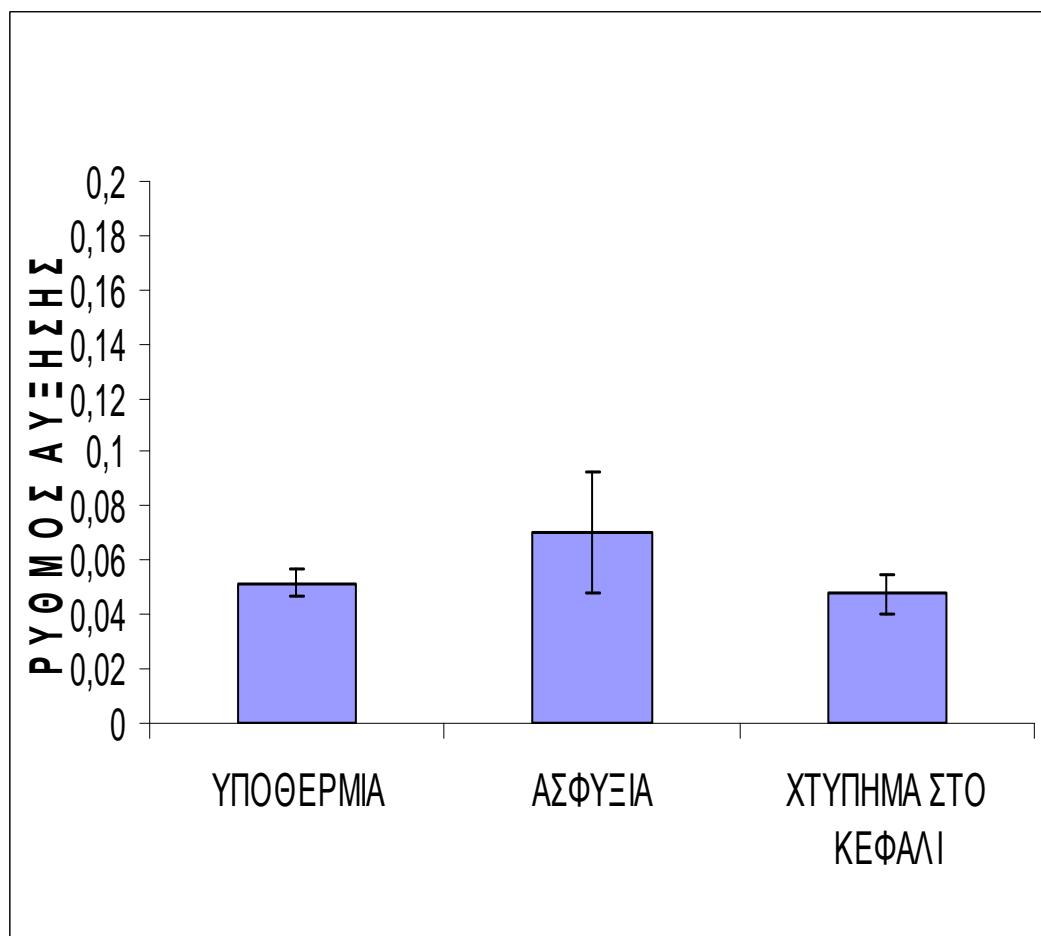
Ο ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν H<sub>2</sub>S για τις τρεις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης είναι 0,064 ώρες<sup>-1</sup> για την υποθερμία,

0,085 ώρες<sup>-1</sup> για την ασφυξία και 0,079 ώρες<sup>-1</sup> για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι.

Σύμφωνα και με την ανάλυση της διακύμανσης δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό αύξησης μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης των ιχθύων.

### Ψευδομονάδες

Ο μέσος ρυθμός αύξησης των ψευδομονάδων για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.6.



**Σχήμα 3.6** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης του πληθυσμού των ψευδομονάδων, με τους 3 διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες αποθήκευσης στους 5°C. (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη ± τυπική απόκλιση).

Παρατηρούμε ότι οι τιμές του ρυθμού αύξησης των ψευδομονάδων διαφέρουν ελάχιστα για τη κάθε διαφορετική μέθοδο θανάτωσης και αυτό αποδεικνύεται και από την ανάλυση της διακύμανσης που παρατίθεται παρακάτω (Πίν. 3.4).

**Πίνακας 3.4.** Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα του ρυθμού αύξησης των ψευδομονάδων στην σάρκα ιχθύων που θανατώθηκαν με διαφορετικούς τρόπους και αποθηκεύθηκαν στους 5°C.

| <u>Ομάδες</u>              | <u>Αριθμός</u>     | <u>Μέσος</u>      |               |              | <u>Διακύμανση</u> |              |
|----------------------------|--------------------|-------------------|---------------|--------------|-------------------|--------------|
|                            | <u>επαναλήψεων</u> | <u>Άθροισμα</u>   | <u>όρος</u>   |              |                   |              |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>           | <u>3</u>           | <u>0.155</u>      | <u>0.051</u>  |              | <u>2.462</u>      |              |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>             | <u>3</u>           | <u>0.210</u>      | <u>0.070</u>  |              | <u>0.000</u>      |              |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u>             |                    |                   |               |              |                   |              |
| <u>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>          | <u>3</u>           | <u>0.143</u>      | <u>0.047</u>  |              | <u>5.134</u>      |              |
| <u>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ</u> |                    |                   |               |              |                   |              |
| <u>Πρόελευση</u>           |                    | <u>Βαθμοί</u>     |               |              | <u>Κριτήριο</u>   |              |
| <u>διακύμανσης</u>         | <u>SS</u>          | <u>ελευθερίας</u> | <u>MS</u>     | <u>F</u>     | <u>τιμή-P</u>     | <u>F</u>     |
| <u>Μεταξύ ομάδων</u>       | <u>0.000</u>       | <u>2</u>          | <u>0.0004</u> | <u>2.182</u> | <u>0.193</u>      | <u>5.143</u> |
| <u>Μέσα</u>                | <u>στις</u>        |                   |               |              |                   |              |
| <u>ομάδες</u>              | <u>0.001</u>       | <u>6</u>          | <u>0.0001</u> |              |                   |              |
| <u>Σύνολο</u>              | <u>0.002</u>       | <u>8</u>          |               |              |                   |              |

Ο ρυθμός αύξησης των ψευδομονάδων για τις τρεις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης είναι 0,051 ώρες<sup>-1</sup> για την υποθερμία, 0,070 ώρες<sup>-1</sup> για την ασφυξία και 0,047 ώρες<sup>-1</sup> για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι. Σύμφωνα και με την ανάλυση της διακύμανσης που ακολουθεί δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό αύξησης μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης των ιχθύων .



### 3.2. Μεταβολή του pH της σάρκας των ιχθύων

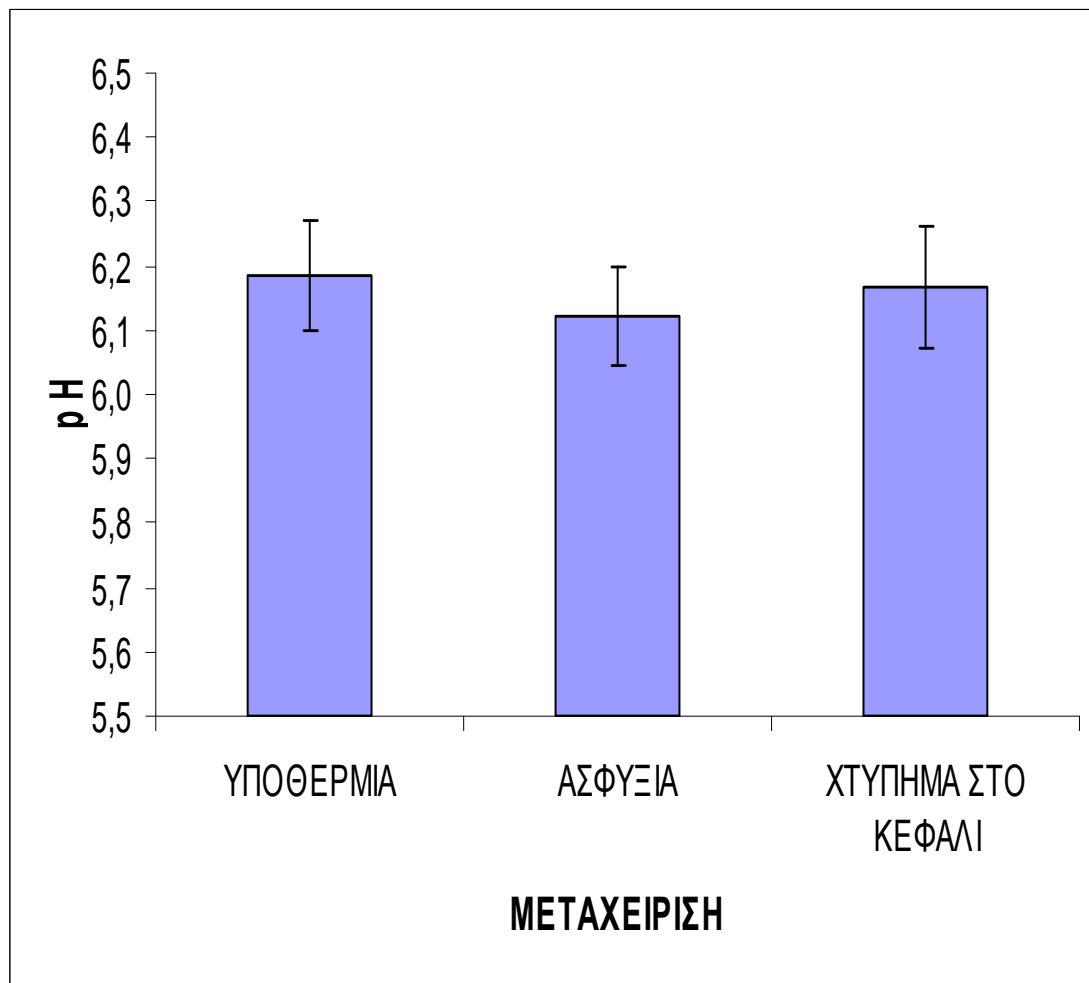
Το pH της σάρκας μετά την θανάτωση μετρήθηκε για κάθε επανάληψη της κάθε μεταχείρισης, ώστε να εκτιμηθεί ο μέσος όρος και να συγκριθεί σε σχέση με τον κάθε τρόπο θανάτωσης. Τα συνολικά αυτά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

**Πίνακας 3.5.** Μέση τιμή pH  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C. Το pH είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων.

| ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ pH |                       |                |                |                |      |                    |
|--------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------|--------------------|
| pH           |                       | επανάληψη<br>1 | επανάληψη<br>2 | επανάληψη<br>3 | Μ.Ο  | τυπική<br>απόκλιση |
|              | ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ             | 6.15           | 6.12           | 6.28           | 6.18 | 0.085              |
|              | ΑΣΦΥΞΙΑ               | 6.14           | 6.04           | 6.19           | 6.12 | 0.076              |
|              | ΧΤΥΠΗΜΑ<br>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ | 6.14           | 6.09           | 6.27           | 6.17 | 0.092              |

Η μεγαλύτερη μέση τιμή του pH παρουσιάστηκε με τη μέθοδο θανάτωσης της υποθερμίας και η μικρότερη με τη μέθοδο της ασφυξίας.

Η μέση τιμή pH  $\pm$  τυπική απόκλιση παρουσιάζεται και γραφικά στο Σχήμα 3.7.



**Σχήμα 3.7.** Απεικόνιση του ρυθμού αύξησης του pH της σάρκας των ιχθύων που θανατώθηκαν με τους τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης τη πρώτη μέρα αποθήκευσης στους 5°C (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη ± τυπική απόκλιση).

Το pH της σάρκας μετά την θανάτωση με υποθερμία είναι 6,18, για την ασφυξία είναι 6,12 και για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι είναι 6,17. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη μεταβολή του pH λόγω των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης των ιχθύων λίγες ώρες μετά τη θανάτωση.

Οι διαφορές αυτές πράγματι τεκμηριώνονται ως μη σημαντικές σύμφωνα και με την ανάλυση διακύμανσης που ακολουθεί (Πίν. 3.6).

Πίνακας 3.6. Ανάλυση διακύμανσης του pH κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 5°C για όλες τις μεταχειρίσεις με όλους τους τρόπους θανάτωσης των ιχθύων.

| <u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</u>            |                            |                          |                   |                   |               |                   |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|
| <u>Ομάδες</u>                | <u>Αριθμός επαναλήψεων</u> | <u>Άθροισμα</u>          | <u>Μέσος όρος</u> | <u>Διακύμανση</u> |               |                   |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>             | <u>3</u>                   | <u>18.55</u>             | <u>6.18</u>       | <u>0.007</u>      |               |                   |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>               | <u>3</u>                   | <u>18.37</u>             | <u>6.12</u>       | <u>0.005</u>      |               |                   |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>    | <u>3</u>                   | <u>18.5</u>              | <u>6.17</u>       | <u>0.008</u>      |               |                   |
| <u>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ</u>   |                            |                          |                   |                   |               |                   |
| <u>Προέλευση διακύμανσης</u> | <u>SS</u>                  | <u>Βαθμοί ελευθερίας</u> | <u>MS</u>         | <u>F</u>          | <u>τιμή-P</u> | <u>Κριτήριο F</u> |
| <u>Μεταξύ ομάδων</u>         | <u>0.005</u>               | <u>2</u>                 | <u>0.002</u>      | <u>0.397</u>      | <u>0.688</u>  | <u>5.143</u>      |
| <u>Μέσα στις ομάδες</u>      | <u>0.043</u>               | <u>6</u>                 | <u>0.007</u>      |                   |               |                   |
| <u>Σύνολο</u>                | <u>0.049</u>               | <u>8</u>                 |                   |                   |               |                   |

Το αρχικό pH της σάρκας των ιχθύων (4 ώρες μετά τη θανάτωση) δε διέφερε σημαντικά. Η τιμή του ήταν περίπου 6,2 για τους ιχθύες που θανατώθηκαν με υποθερμία και χτύπημα στο κεφάλι και 6,1 για τους ιχθύες που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας. Τις επόμενες μέρες παρατηρήθηκε

μια μικρή αύξηση του pH η οποία μπορεί να αποδοθεί στη πρωτεολυτική δράση των αλλοιωγόνων βακτηρίων (Dainty 1996).

### 3.3. Μέτρηση της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων

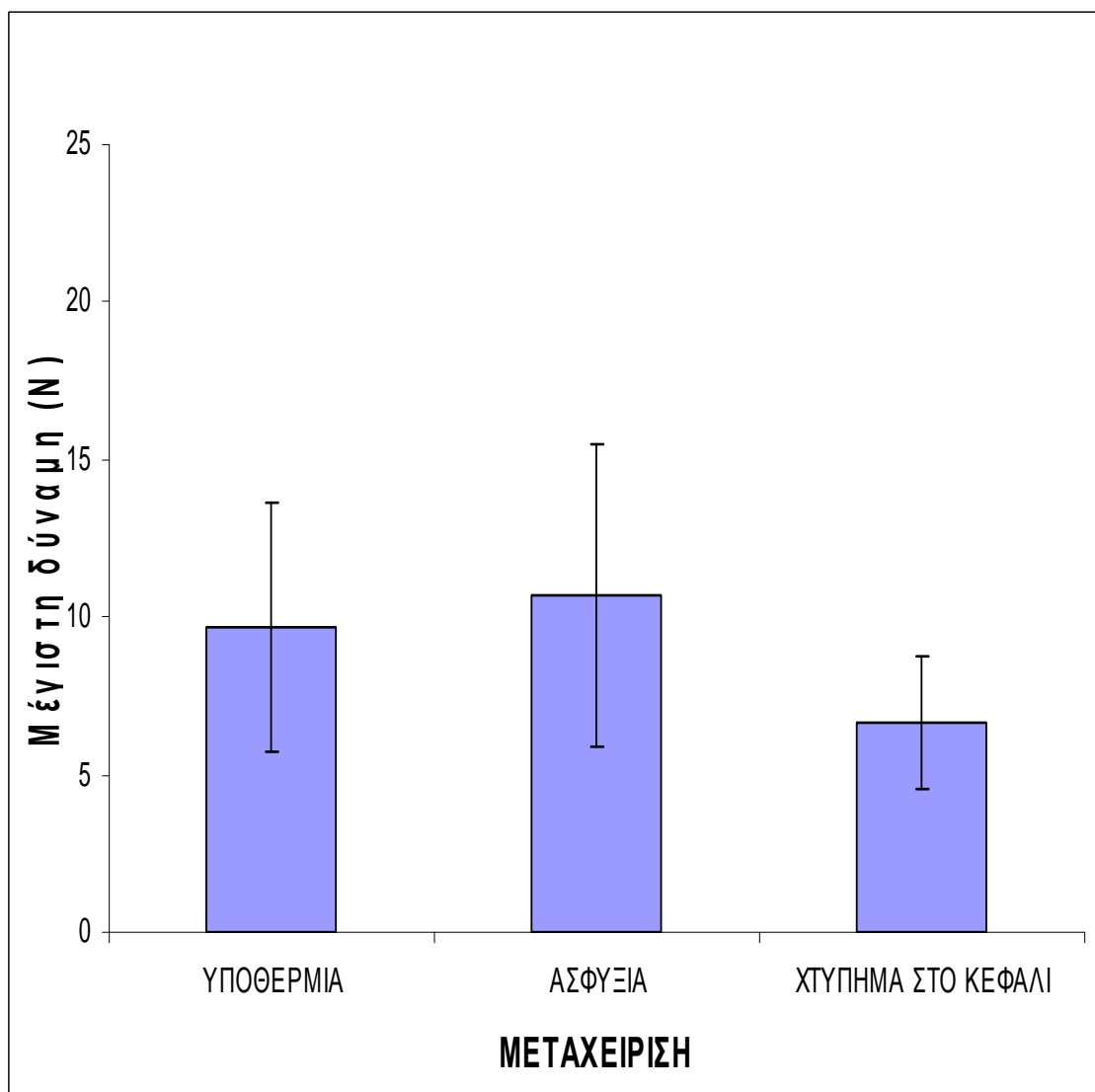
Η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας που θανατώθηκαν με διαφορετικό τρόπο μετρήθηκε για τη κάθε επανάληψη της κάθε μεταχείρισης, ώστε να εκτιμηθεί ο μέσος όρος και να συγκριθεί σε σχέση με τον κάθε τρόπο θανάτωσης.

Η μέγιστη δύναμη εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας και η μικρότερη δύναμη εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι για το text 1 (πίσω από το θωρακικό πτερύγιο). Τα συνολικά αυτά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7 Μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N),  $\pm$  τυπική απόκλιση της σκληρότητας της σάρκας ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C. Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N), είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το σημείο μέτρησης πίσω από το θωρακικό πτερύγιο (texture 1).

| <u>text 1</u><br><u>(πίσω από το</u><br><u>θωρακικό</u><br><u>πτερύγιο)</u> | Επανάληψη<br>η 1 | Επανάληψη<br>η 2 | Επανάληψη<br>η 3 | <u>M.O</u>   | <u>τυπική</u><br><u>απόκλιση</u> |
|---|------------------|------------------|------------------|--------------|----------------------------------|
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>  | <u>11.06</u>     | <u>12.77</u>     | <u>5.2</u>       | <u>9.67</u>  | <u>3.970</u>                     |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>  | <u>15</u>        | <u>11.21</u>     | <u>5.66</u>      | <u>10.71</u> | <u>4.8194</u>                    |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ</u><br><u>ΚΕΦΑΛΙ</u>   | <u>8.12</u>      | <u>4.28</u>      | <u>7.61</u>      | <u>6.67</u>  | <u>2.085</u>                     |

Οι μέσοι όροι της σκληρότητας  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σάρκας των ιχθύων πίσω από το θωρακικό πτερύγιο, που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5° C παρουσιάζονται και γραφικά στο Σχήμα 3.11.



**Σχήμα 3.11.** Απεικόνιση της μέγιστης δύναμης (N) που εφαρμόστηκε όσον αφορά τη σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων που θανατώθηκαν με τους τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης την πρώτη μέρα αποθήκευσης στους 5°C, στο σημείο εκείνο, στο πίσω μέρος του θωρακικού πτερυγίου (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση).

Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε τη πρώτη μέρα θανάτωσης των ιχθύων με υποθερμία ήταν 9,67 N, για την ασφυξία 10,71N και για το χτύπημα στο κεφάλι 6,67N.

Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία (ANOVA) που ακολούθησε, η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν στη παρούσα μελέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το βαθμό σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων στο πίσω μέρος του θωρακικού πτερυγίου, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 5°C για όλες τις μεταχειρίσεις με όλους τους τρόπους θανάτωσης των ιχθύων κατά τη πρώτη μέρα θανάτωσης ( $p=0,450$ ) (Πίν.3.8).



**Πίνακας 3.8.** Ανάλυση διακύμανσης του βαθμού σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για το texture 1(στο πίσω μέρος του θωρακικού πτερυγίου).

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

| <u>Ομάδες</u>     | <u>Αριθμός μεταχειρίσεων</u> | <u>Άθροισμα</u> | <u>Μέσος όρος</u> | <u>Διακύμανση</u> |
|-------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>  | <u>3</u>                     | <u>29,03</u>    | <u>9,67</u>       | <u>15,761</u>     |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>    | <u>3</u>                     | <u>32,13</u>    | <u>10,71</u>      | <u>23,227</u>     |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u>    |                              |                 |                   |                   |
| <u>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u> | <u>3</u>                     | <u>20,01</u>    | <u>6,67</u>       | <u>4,349</u>      |

### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

| <u>Προέλευση διακύμανσης</u> | <u>SS</u>      | <u>Βαθμοί ελευθερίας</u> | <u>MS</u>     | <u>F</u>     | <u>τιμή-P</u> | <u>Κριτήριο F</u> |
|------------------------------|----------------|--------------------------|---------------|--------------|---------------|-------------------|
| <u>Between Groups</u>        | <u>26,429</u>  | <u>2</u>                 | <u>13,214</u> | <u>0,914</u> | <u>0,450</u>  | <u>5,143</u>      |
| <u>Within Groups</u>         | <u>86,676</u>  | <u>6</u>                 | <u>14,446</u> |              |               |                   |
| <u>Total</u>                 | <u>113,105</u> | <u>8</u>                 |               |              |               |                   |
|                              |                |                          | -             | -            | -             | -                 |

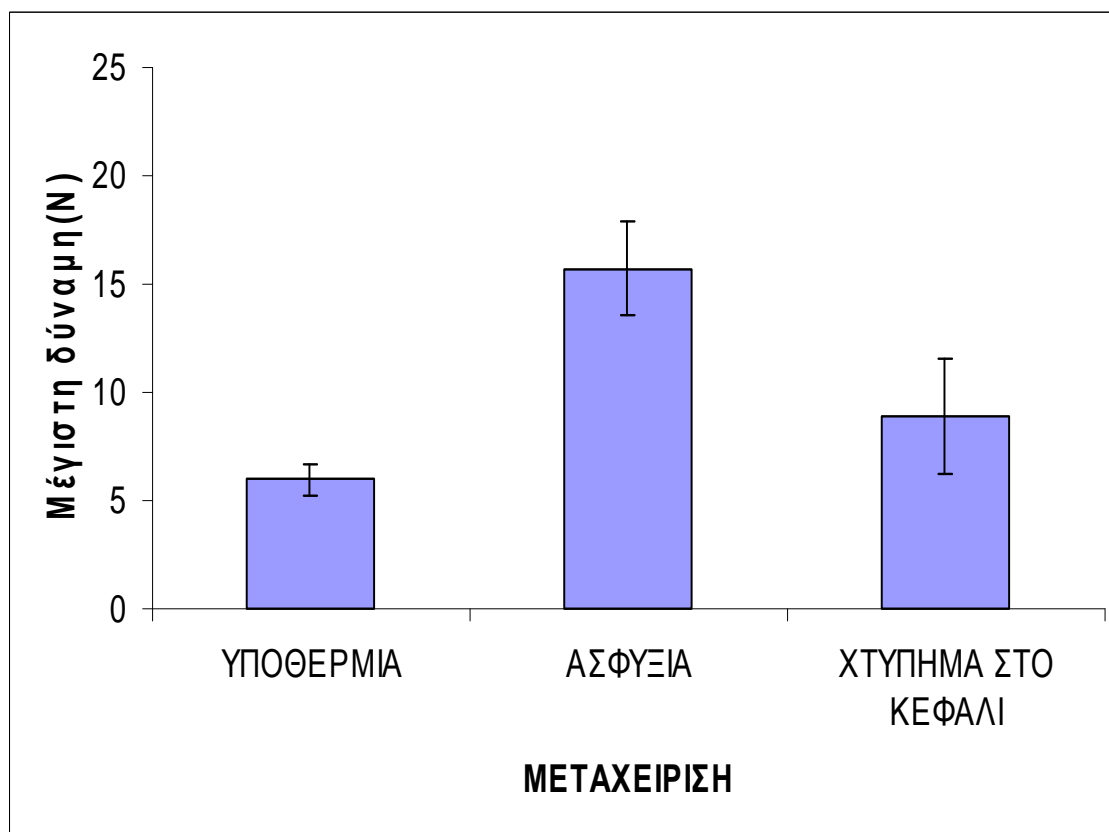
Η μέγιστη δύναμη εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας και η μικρότερη δύναμη εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της υποθερμίας για το text 2 (στην αρχή της πλευρικής γραμμής) (Πίν.3.9).

**Πίνακας 3.9** Μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N),  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σκληρότητας της σάρκας ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C. Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N), είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το σημείο μέτρησης στην αρχή της πλευρικής γραμμής (texture 2).

| <u>text 2</u><br><u>(στην αρχή</u><br><u>της</u><br><u>πλευρικής</u><br><u>γραμμής)</u> | Επανάληψη<br>1 | Επανάληψη<br>2 | Επανάληψη<br>3 | M.O           | τυπική<br>απόκλιση |
|---|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------------|
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>  | <u>5.34</u>    | <u>6.72</u>    | <u>5.81</u>    | <u>5.956</u>  | <u>0.701</u>       |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>  | <u>13.49</u>   | <u>17.87</u>   | <u>15.76</u>   | <u>15.706</u> | <u>2.190</u>       |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u><br><u>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>   | <u>5.81</u>    | <u>10.77</u>   | <u>10.03</u>   | <u>8.87</u>   | <u>2.675</u>       |

Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε για την υποθερμία ήταν 5,956N, για την ασφυξία 15,706N και για το χτύπημα στο κεφάλι ήταν 8,87N, για όλες τις μέρες αποθήκευσης στους 5°C για τη κάθε περίπτωση.

Οι μέσοι όροι της σκληρότητας  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σάρκα των ιχθύων πίσω από το θωρακικό πτερύγιο, που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C παρουσιάζονται και γραφικά στο Σχήμα 3.12.



**Σχήμα 3.12.** Απεικόνιση της μέγιστης δύναμης που εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων που θανατώθηκαν με τους τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης τη πρώτη μέρα αποθήκευσης στους 5°C, στην αρχή της πλευρικής γραμμής (Οι κάθετες μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση).

Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία (ANOVA), η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το βαθμό σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων στην αρχή της πλευρικής γραμμής, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 5°C για όλες τις μεταχειρίσεις με όλους τους τρόπους θανάτωσης των ιχθύων ( $p=0,002$ ) (Πίν. 3.10).

**Πίνακας 3.10** Ανάλυση διακύμανσης του βαθμού σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για το texture 2 (αρχή της πλευρικής γραμμής).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

| <u>Ομάδες</u>      | <u>Αριθμός</u>       |                 | <u>Μέσος</u>  |                   |
|--------------------|----------------------|-----------------|---------------|-------------------|
|                    | <u>μεταχειρίσεων</u> | <u>Άθροισμα</u> | <u>όρος</u>   | <u>Διακύμανση</u> |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>   | <u>3</u>             | <u>17,87</u>    | <u>5,956</u>  | <u>0,492</u>      |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>     | <u>3</u>             | <u>47,12</u>    | <u>15,706</u> | <u>4,798</u>      |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ</u> |                      |                 |               |                   |
| <u>ΚΕΦΑΛΙ</u>      | <u>3</u>             | <u>26,61</u>    | <u>8,87</u>   | <u>7,159</u>      |

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

| <u>Προέλευση</u>        | <u>Βαθμοί</u>  |                   | <u>Κριτήριο</u> |               |               |              |
|-------------------------|----------------|-------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| <u>διακύμανσης</u>      | <u>SS</u>      | <u>ελευθερίας</u> | <u>MS</u>       | <u>F</u>      | <u>τιμή-P</u> | <u>F</u>     |
| <u>Μεταξύ ομάδων</u>    | <u>150,29</u>  | <u>2</u>          | <u>75,145</u>   | <u>18,107</u> | <u>0,002</u>  | <u>5,143</u> |
| <u>Μέσα στις ομάδες</u> | <u>24,900</u>  | <u>6</u>          | <u>4,150</u>    |               |               |              |
| <u>Σύνολο</u>           | <u>175,190</u> | <u>8</u>          |                 |               |               |              |

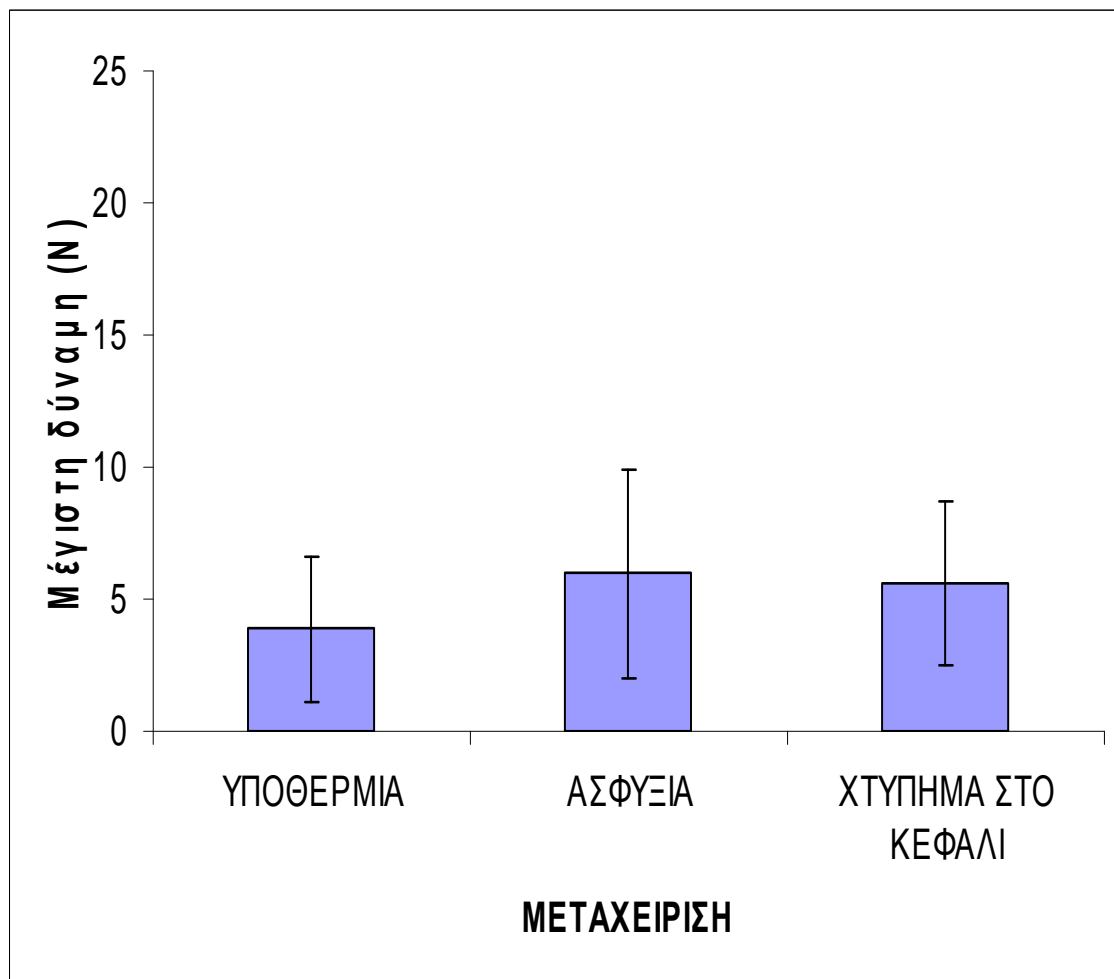
Η μέγιστη δύναμη (N) εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας και η μικρότερη δύναμη εφαρμόστηκε στη σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της υποθερμίας για το text 3 (στο μέσο της πλευρικής γραμμής) (Πίν. 3.11).

**Πίνακας 3.11** . Μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N),  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σκληρότητας της σάρκας ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C. Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε (N) είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων για το σημείο μέτρησης στο μέσο της πλευρικής γραμμής (texture 3).

| <u>text 3</u><br><u>(στο μέσο της</u><br><u>πλευρικής</u><br><u>γραμμής)</u> | Επανάληψη<br>1 | Επανάληψη<br>2 | Επανάληψη<br>3 | M.O         | τυπική<br>απόκλιση |
|--|----------------|----------------|----------------|-------------|--------------------|
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>   | <u>1.97</u>    | <u>2.65</u>    | <u>7.00</u>    | <u>3.87</u> | <u>2.73</u>        |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>   | <u>3.12</u>    | <u>4.30</u>    | <u>10.49</u>   | <u>5.97</u> | <u>3.96</u>        |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ</u><br><u>ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΙ</u>  | <u>2.46</u>    | <u>5.73</u>    | <u>8.65</u>    | <u>5.61</u> | <u>3.10</u>        |

Η μέγιστη δύναμη που εφαρμόστηκε για την υποθερμία ήταν 3,87N, για την ασφυξία 3,96 N και για το χτύπημα στο κεφάλι 3,10N, για όλες τις μέρες αποθήκευσης στους 5°C για τη κάθε περίπτωση.

Οι μέσοι όροι της σκληρότητας  $\pm$  τυπική απόκλιση, της σάρκα των ιχθύων πίσω από το θωρακικό πτερύγιο, που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5° C παρουσιάζονται και γραφικά στο Σχήμα 3.13.



**Σχήμα 3.13.** Απεικόνιση της μέγιστης δύναμης που εφαρμόστηκε (N) για τη σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων που θανατώθηκαν με τους τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης τη πρώτη μέρα αποθήκευσης στους 5°C, στην μέσο της πλευρικής γραμμής. (Οι μπάρες στο γράφημα συμβολίζουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση).

Η στατιστική επεξεργασία (ANOVA) και η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν στη παρούσα μελέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το βαθμού σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για το μέσο της πλευρικής γραμμής, κατά τη διάρκεια

αποθήκευσης στους 5°C για όλες τις μεταχειρίσεις με όλους τους τρόπους θανάτωσης των ιχθύων ( $\rho=0,720$ ) (Πίν.3.12).

**Πίνακας 3.12** Ανάλυση διακύμανσης του βαθμού σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για το texture 3 (μέσο της πλευρικής γραμμής)

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

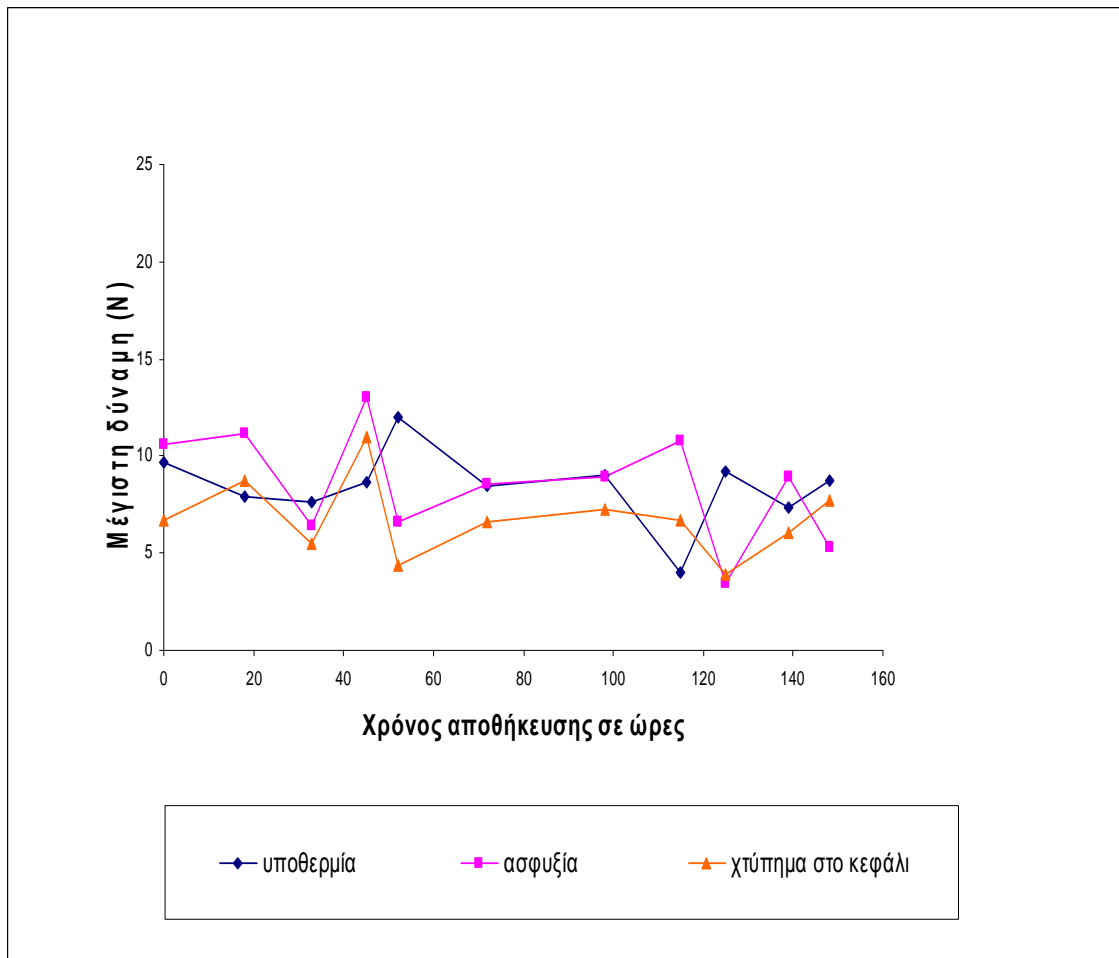
| <u>Ομάδες</u>      | <u>Αριθμός</u>       |                 | <u>Μέσος</u> |                   |
|--------------------|----------------------|-----------------|--------------|-------------------|
|                    | <u>μεταχειρίσεων</u> | <u>Άθροισμα</u> | <u>όρος</u>  | <u>Διακύμανση</u> |
| <u>ΥΠΟΘΕΡΜΙΑ</u>   | <u>3</u>             | <u>11,62</u>    | <u>3,873</u> | <u>7,447</u>      |
| <u>ΑΣΦΥΞΙΑ</u>     | <u>3</u>             | <u>17,91</u>    | <u>5,97</u>  | <u>15,670</u>     |
| <u>ΧΤΥΠΗΜΑ ΣΤΟ</u> |                      |                 |              |                   |
| <u>ΚΕΦΑΛΙ</u>      | <u>3</u>             | <u>16,84</u>    | <u>5,613</u> | <u>9,589</u>      |

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ**

| <u>Προέλευση</u>        | <u>Βαθμοί</u> |                   |               | <u>Κριτήριο</u> |               |              |
|-------------------------|---------------|-------------------|---------------|-----------------|---------------|--------------|
| <u>διακύμανσης</u>      | <u>SS</u>     | <u>ελευθερίας</u> | <u>MS</u>     | <u>F</u>        | <u>τιμή-P</u> | <u>F</u>     |
| <u>Μεταξύ ομάδων</u>    | <u>7,550</u>  | <u>2</u>          | <u>3,775</u>  | <u>0,346</u>    | <u>0,720</u>  | <u>5,143</u> |
| <u>Μέσα στις ομάδες</u> | <u>65,415</u> | <u>6</u>          | <u>10,902</u> |                 |               |              |
| <u>Σύνολο</u>           | <u>72,966</u> | <u>8</u>          |               |                 |               |              |

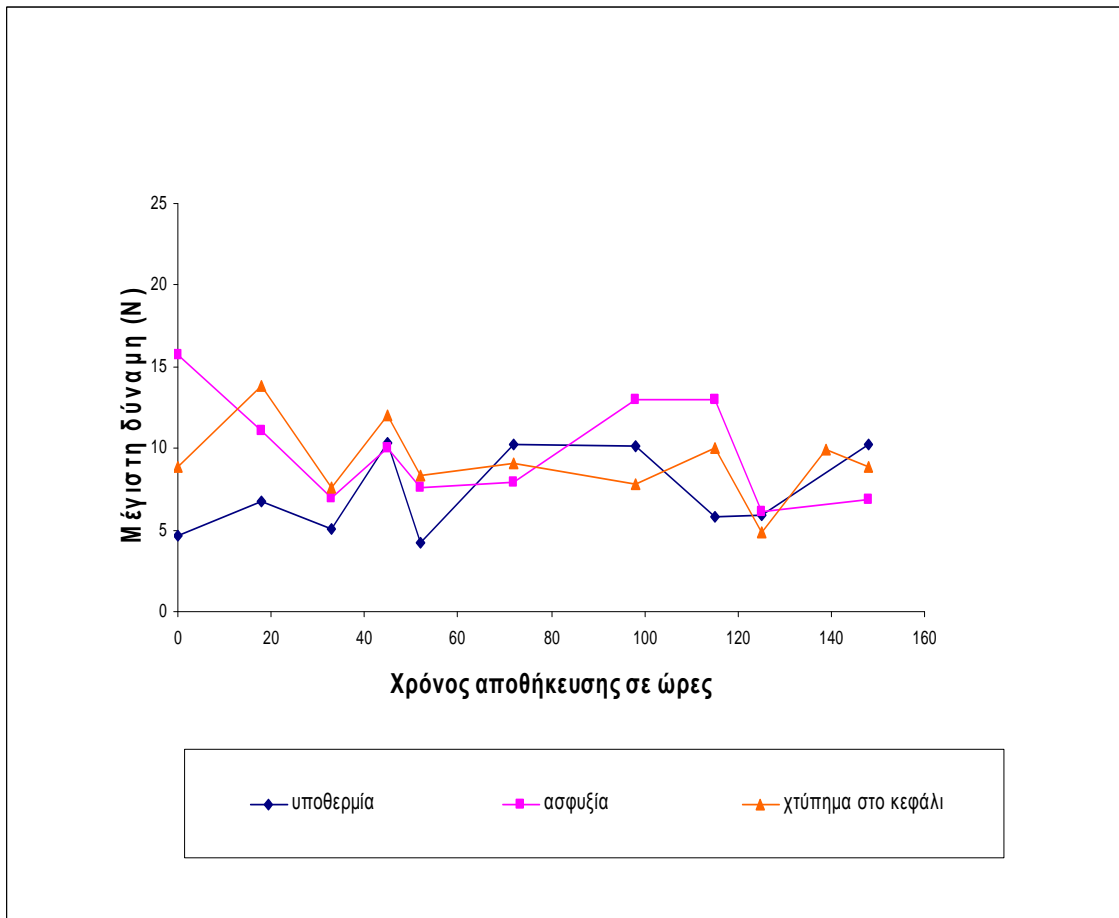
Στο Σχήμα 3.14 παρουσιάζεται η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους στους 5°C, στο σημείο πίσω από το θωρακικό πτερύγιο.





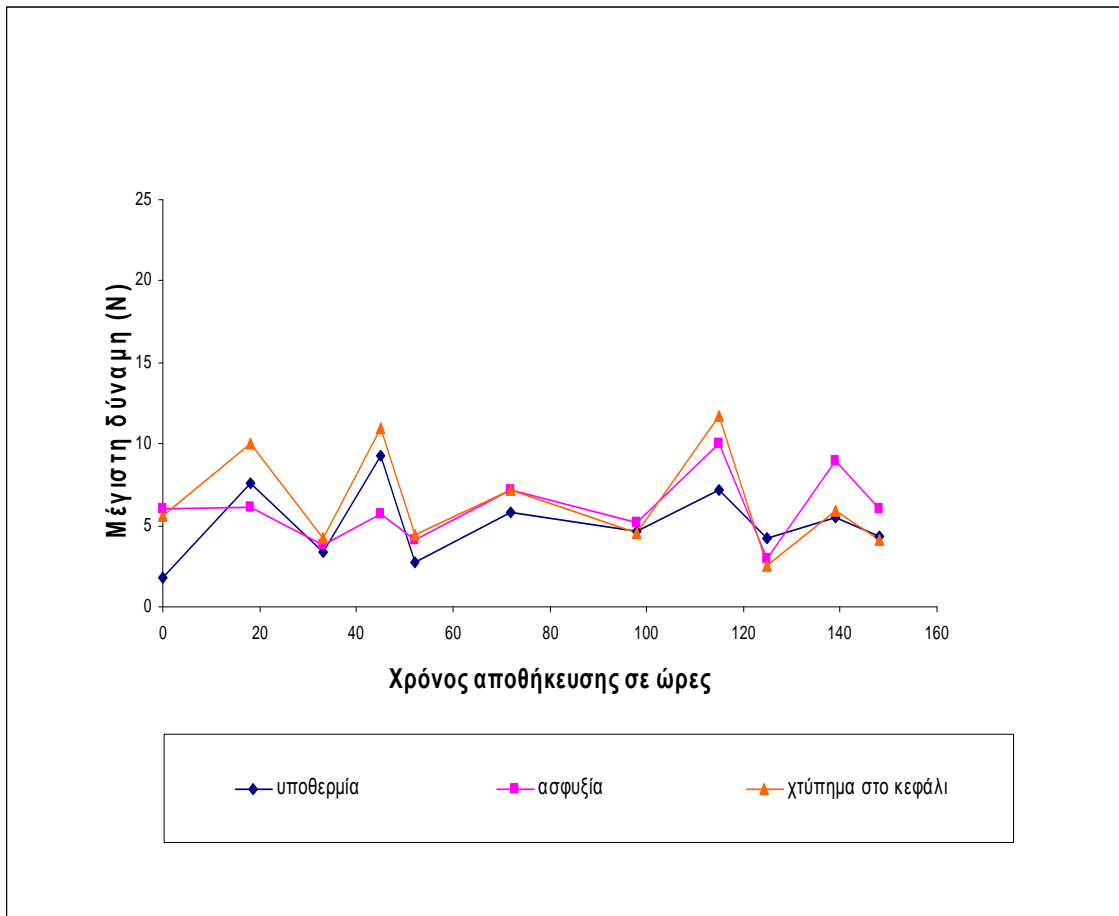
**Σχήμα 3.14.** Απεικόνιση της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους στους  $5^{\circ}\text{C}$ , στο σημείο πίσω από το θωρακικό πτερύγιο.

Στο σχήμα 3.15 παρουσιάζεται η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους στους  $5^{\circ}\text{C}$ , στην αρχή της πλευρικής γραμμής.



**Σχήμα 3.15.** Απεικόνιση της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους στους **5°C**, στην αρχή της πλευρικής γραμμής.

Στο Σχήμα 3.16 παρουσιάζεται η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής τους στους **5°C**, στο μέσο της πλευρικής γραμμής.



**Σχήμα 3.16.** Απεικόνιση της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων για τις τρεις μεθόδους θανάτωσης (υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι), για τις τρεις μεταχειρίσεις του πειράματος, καθ'όλη τη διάρκεια συντήρησης τους στους **5°C**, στο μέσο της πλευρικής γραμμής.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

##### 4.1 Επίδραση των μεθόδων θανάτωσης στη μικροβιακή ανάπτυξη

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι οι τρεις διαφορετικοί μέθοδοι θανάτωσης, η ασφυξία, η οποία είναι η κοινή μέθοδος θανάτωσης που συμβαίνει στα αλιεύματα των ψαράδων, η υποθερμία, η οποία χρησιμοποιείται σαν μέθοδος θανάτωσης από τις περισσότερες σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες και το χτύπημα στο κεφάλι, έδειξαν ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης των ιχθύων στη συντήρηση στους 5° C. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και για την επίδραση των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης στις φυσικοχημικές μεταβολές στη σάρκα των ιχθύων.

Τα πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός βρέθηκε στο χαμηλό επίπεδο των  $5 \times 10^2$  cfu/g. Πραγματοποιήθηκαν καθημερινές μετρήσεις για πείραμα με διάρκεια 10 ημερών, για κάθε μια επανάληψη ξεχωριστά με σκοπό να συγκριθούν οι φυσικοχημικές μεταβολές και το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης με τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης. Η μικροβιακή ανάπτυξη όσον αφορά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τις Ψευδομονάδες άρχισε να γίνεται αισθητή από τη πρώτη κιόλας μέρα μέχρι και την δεύτερη μέρα συντήρησης στους 5° C.

Ο ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια συντήρησης των ιχθύων είναι ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Παρατηρήθηκε ότι ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης της Ο.Μ.Χ πραγματοποιείται με τη μέθοδο θανάτωσης της υποθερμίας, αν και η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν

στη παρούσα μελέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το ρυθμό αύξησης της Ο.Μ.Χ στη σάρκα των ιχθύων ( $p=0,298$ ).

Παρατηρήθηκε επίσης ότι ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν  $H_2S$  πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ασφυξίας και των ψευδομονάδων πάλι με τη μέθοδος της ασφυξίας. Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία (ANOVA), η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν στη παρούσα μελέτη δε επηρεάζουν το ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών που παράγουν  $H_2S$  ( $p=0,673$ ) και των ψευδομονάδων στην σάρκα ιχθύων ( $p=0,193$ ).

Όσον αφορά τους ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των ιχθύων (SSO's) όπως η *Shewanella putrefaciens* έφτασαν στο επίπεδο των  $10^8$  cfu/g από τη δεύτερη μέρα αποθήκευσης έως και τη τέταρτη μέρα αποθήκευσης στους  $5^\circ\text{C}$  ανεξάρτητα από τη μέθοδο θανάτωσης που χρησιμοποιήθηκε.

Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* παρέμεινε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης για τις 4 πρώτες μέρες και όταν οι ειδικοί μικροοργανισμοί έφτασαν τη στατική φάση τότε άρχισε η αύξηση του πληθυσμού του. Από τις μετρήσεις του μικροβιακού πληθυσμού διαπιστώθηκε ότι η κυρίαρχη αλλοίωση είναι η αερόβια. Το επίπεδο αλλοίωσης, όσον αφορά το βακτηριακό πληθυσμό για την απόρριψη του προϊόντος βρέθηκε να είναι στα  $10^8$  cfu/g.

Σε μελέτη των Scherer et al., (2006) που πραγματοποιήθηκε για τη μέτρηση ποιοτικών παραμέτρων για το κυπρίνο βρέθηκε ότι η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα αυξήθηκε σταδιακά από 4 σε  $8-9 \log \text{cfu/g}^{-1}$  μετά από 14 μέρες αποθήκευσης στους 4 και  $7^\circ\text{C}$ . Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα ψυχρότροφα βακτήρια των ψευδομονάδων ήταν οι κύριοι οργανισμοί που προκαλούσαν

αλλοίωση. Ο ολικός πληθυσμός της μεσόφιλης χλωρίδας και των ψυχρότροφων βακτηρίων στο κυπρίνο αυξήθηκε σημαντικά τη 2<sup>η</sup> μέρα. Τα ψάρια που είχαν θανατωθεί με τη μέθοδο της υποθερμίας παρουσίασαν μικρότερο βακτηριακό πληθυσμό τις πρώτες μέρες αποθήκευσης, όμως εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξης των τελευταίων ημερών αποθήκευσης το βακτηριακό φορτίο αυτών των ψαριών ήταν μεγαλύτερο από αυτό των ψαριών που θανατώθηκαν με τη μέθοδο του ηλεκτρισμού. Τα ψάρια που θανατώθηκαν με τη μέθοδο του ηλεκτρισμού είχαν σημαντικά μεγαλύτερο βακτηριακό πληθυσμό ΟΜΧ από τα ψάρια που θανατώθηκαν με υποθερμία, τις πρώτες (0, 4 και 7 μέρες), αλλά σημαντικά χαμηλότερο πληθυσμό την 20<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης. Για τα νωπά ψάρια, το όριο που είναι αποδεκτό για την ανθρώπινη κατανάλωση είναι 10<sup>7</sup> cfu g<sup>-1</sup> σύμφωνα με τον International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986), ενώ άλλοι προτείνουν 3\*10<sup>6</sup>cfu g<sup>-1</sup> (Chang *et al.*, 1998). Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα και τα ψυχρότροφα βακτήρια φτάνουν το 3\*10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup> μεταξύ της 13<sup>ης</sup> και 16<sup>ης</sup> μέρας αποθήκευσης ανεξάρτητα από τη μέθοδο θανάτωσης που εφαρμόστηκε. Οι μέθοδοι θανάτωσης που εφαρμόστηκαν δεν είχαν σημαντική επίδραση στη διάρκεια ζωής του κυπρίνου.

Σε μελέτη των Tejada *et al.*, (2002) έγινε σύγκριση στους διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης και αποδείχθηκε ότι υπήρξε ελάχιστη ή καμία επίδραση στη μικροβιολογική ποιότητα των ψαριών. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) που θανατώθηκε με ασφυξία έδειξε μια μικρή καθυστέρηση στην αρχική βακτηριακή ανάπτυξη όταν συγκρίθηκε με αυτή που θανατώθηκε με υποθερμία. Παρόλα αυτά, δε παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά μεταξύ της πέστροφας (rainbow trout) που θανατώθηκε με υποθερμία και με αυτή με χτύπημα στο κεφάλι

(Ozogul *et al.*, 2004). Οι Tobiassen και Sorensen (1999), μελέτησαν δύο μεθόδους θανάτωσης όπως: το κόψιμο του βραγχίου, την αναισθητοποίηση με χτύπημα στο κεφάλι και το κόψιμο του βραγχίου, το τρύπημα του εγκεφάλου και το κόψιμο του βραγχίου αφού πρώτα προηγήθηκε αναισθησία με CO<sub>2</sub>, για 5 λεπτά. Μετά από αυτή την επεξεργασία παρατηρήθηκε ηρεμία σε όλες τις αντιδράσεις των ψαριών όπως στη κολύμβηση, στην αναπνοή κλπ. Συμπέραναν ότι η καλύτερη μέθοδος από τις δύο ήταν το χτύπημα στο κεφάλι, ενώ το CO<sub>2</sub> και το κόψιμο του βραγχίου δεν προκάλεσε γρήγορη απώλεια των αισθήσεων.

Στη παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στις κινητικές παραμέτρους βακτηριακής ανάπτυξης (ρυθμός αύξησης,) μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης, της υποθερμίας, της ασφυξίας και του χτυπήματος στο κεφάλι. Η διαπίστωση ότι δεν υπάρχουν διαφορές στις κινητικές παραμέτρους βακτηριακής ανάπτυξης πιθανών οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταθανάτιες μεταβολές στην σάρκα των υπό εξέταση ιχθύων δεν επηρέασαν σημαντικά τους ενδογενείς παράγοντες που επιδρούν στη μικροβιακή ανάπτυξη, όπως pH, συγκέντρωση διαθέσιμων υδατανθράκων (γλυκογόνο), δομή του υποστρώματος (σκληρότητα), ικανότητα συγκράτησης ύδατος ( $a_w$ ) κτλ.

#### 4.2 Συντήρηση των ιχθύων υπό ψύξη

Για τη συντήρηση και αποθήκευση των ιχθύων ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν είναι η προέλευση των ιχθύων. Για παράδειγμα οι ιχθύες των τροπικών νερών συντηρούνται για

μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υπό ψύξη από εκείνους που προέρχονται από εύκρατα νερά. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στο γεγονός ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων που αποτελούν τη μικροβιακή χλωρίδα των τροπικών ψαριών αναχαιτίζεται στις θερμοκρασίες ψύξης, ενώ, αντίθετα, τα βακτήρια που αποτελούν τη μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών που διαβιώνουν σε εύκρατα νερά προσαρμόζονται σχετικά εύκολα στις θερμοκρασίες ψύξης. Η διάρκεια ζωής των υπό ψύξη ψαριών εξαρτάται ακόμη από τη θρεπτική τους κατάσταση, την εποχή αλιείας τους κατά τη διάρκεια του έτους και την περιοχή απ' όπου αλιεύθηκαν. Όσον αφορά τα λιπαρά ψάρια, η ρέγγα για παράδειγμα που αλιεύεται το καλοκαίρι, κατά τη διάρκεια εντατικής θρέψης της, οπότε η σάρκα της έχει υψηλή λιποπεριεκτικότητα, διατηρεί την αρχική της ποιότητα επί 4 ημέρες υπό ψύξη, ενώ το ίδιο ψάρι όταν αλιευθεί το χειμώνα μπορεί να διατηρήσει την αρχική του ποιότητα επί 12 ημέρες υπό ψύξη (Garthwaite, 1997). Σε αντίθεση, τα άπαχα ψάρια, όταν δεν βρίσκονται στην καλύτερη θρεπτική τους κατάσταση αλλοιώνονται πιο γρήγορα σε σύγκριση με εκείνα που βρίσκονται στην καλύτερη θρεπτική τους κατάσταση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το pH της σάρκας των πρώτων είναι πολύ υψηλό και επιπλέον η συγκέντρωση του γλυκογόνου στη σάρκα τους είναι πολύ χαμηλή ώστε να συνεισφέρει στη μείωση του pH. Επισημαίνεται ότι τα βακτήρια που προκαλούν αλλοίωση είναι πιο ενεργά σε υψηλές τιμές του pH (Connell, 1990).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος συντήρησης των ψαριών και άλλων αλιευμάτων υπό ψύξη είναι η χρήση πάγου σε νιφάδες (flakes) (Βαρελτζής 1999; Connell et al., 1990)



Κατά τη συντήρηση των ιχθύων με πάγο και τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, ελήφθησαν υπόψη οι παρακάτω παράγοντες που συμβάλλουν στην καλή ψύξη των ιχθύων:

Η ποιότητα του χρησιμοποιούμενου πάγου. Ο πάγος πρέπει να παρασκευάζεται από πόσιμο ή καθαρό θαλασσινό νερό, με συγκεκριμένες προδιαγραφές. Η παρασκευή, διακίνηση και αποθήκευσή του πρέπει να γίνεται με τις απαραίτητες συνθήκες υγιεινής.

Ο σωστός σχεδιασμός και τα υλικά κατασκευής των ιχθυοκιβωτίων ή των αποθηκευτικών χώρων. Τα ιχθυοκιβώτια πρέπει να έχουν στρογγυλεμένες γωνίες για να μη δημιουργούνται εστίες πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και κατάλληλες υποδοχές ώστε να είναι εύκολη η τοποθέτηση του ενός πάνω στο άλλο.

Τα υλικά κατασκευής τους πρέπει να είναι κατάλληλα για τρόφιμα και να επιτρέπουν το πλύσιμο και την απολύμανση τους. Συνήθως χρησιμοποιούνται πολυμερή υλικά όπως το πολυστυρένιο. Για τη μεταφορά των ψαριών ή άλλων αλιευμάτων υπό ψύξη χρησιμοποιούνται και κιβώτια μιας χρήσης από διογκωμένη πολυουρεθάνη (φελιζόλ).

Οι αποθηκευτικοί χώροι στα πλοία-εργοστάσια, στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις ή στους μαζικούς χώρους εστίασης (π.χ. εστιατόρια) πρέπει να είναι κατασκευασμένοι από υλικά κατάλληλα για τρόφιμα, τα οποία δεν οξειδώνονται (ανοξειδωτα) και επιτρέπουν το πλύσιμο και την απολύμανση τους. Οι χώροι αυτοί, κατάλληλα ρυθμισμένοι με οριζόντια διαχωριστικά (ράφια) πρέπει να έχουν στρογγυλεμένες γωνίες και λείες επιφάνειες.

Το βάθος των ιχθυοκιβωτίων ή των ραφιών στους αποθηκευτικούς χώρους δεν πρέπει να ξεπερνά τα 40 εκατοστά. Αν πρόκειται για τη συσκευασία μικρού μεγέθους ψαριών (π.χ. σαρδέλα γόππα) το βάθος πρέπει να είναι μικρότερο, ώστε να μη δημιουργούνται μεγάλες πιέσεις στα ψάρια που έχουν τοποθετηθεί στον πυθμένα του ιχθυοκιβωτίου από το βάρος των υπερκείμενων ψαριών.

Η τοποθέτηση των ψαριών στα ιχθυοκιβώτια ή στους αποθηκευτικούς χώρους πρέπει να γίνεται έτσι ώστε ολόκληρη η επιφάνεια τους να καλύπτεται με πάγο. Σε περίπτωση τοποθέτησης των ιχθυοκιβωτίων το ένα πάνω στο άλλο δεν πρέπει να υπάρχουν κενά (Connell, 1990, Βαρελτζής, 1999).

Το μέγεθος των ιχθύων. Ιχθύες μεγάλου μεγέθους πριν συσκευαστούν πρέπει να αποκεφαλίζονται, να εκσπλαχνίζονται και να πλένονται με άφθονο καθαρό θαλασσινό νερό εφόσον συσκευάζονται στο αλιευτικό σκάφος ή με πόσιμο νερό εφόσον συσκευάζονται στη βιομηχανία.

Στη παρούσα μελέτη τηρήθηκαν όλες οι προβλεπόμενες προδιαγραφές για τη συσκευασία και τη μεταφορά των ιχθύων στο εργαστήριο για τη ορθή διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και οι προδιαγραφές που αφορούν τη ποιότητα του νερού που χρησιμοποιήθηκε για τη παρασκευή του πάγου.

#### 4.3 Μεταβολή του pH στη σάρκα των ιχθύων

Το pH της σάρκα των ιχθύων που θανατώθηκαν με υποθερμία, ασφυξία και χτύπημα στο κεφάλι κατά την συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψύξης 5°C, δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε σχέση με τις μεθόδους θανάτωσης σύμφωνα με τη ανάλυση διακύμανσης (p= 0,688).

Η μεταβολή του αρχικού pH στη σάρκα των ιχθύων 4 ώρες μετά τη θανάτωση δεν παρουσίασε κάποια σημαντική διαφορά λόγω των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης των ιχθύων . Το pH της σάρκας των ιχθύων 4 ώρες μετά την θανάτωση ήταν 6,18 για τη περίπτωση της υποθερμίας, 6,12 για την ασφυξία και 6,17 για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι διαφορετικοί τρόποι θανάτωσης δεν επηρεάζουν σημαντικά τη μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης των ιχθύων στους 5° C καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αυτή η διαπίστωση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη θανάτωση των ιχθύων με διαφορετικούς τρόπους το στρες πιθανόν να μη διέφερε σημαντικά λόγω της έλλειψης εκπαίδευσης και εμπειρίας των χειριστών που πραγματοποίησαν τη θανάτωση των ιχθύων. Το εύρος των τιμών κυμάνθηκε από 6,12-6,28 για τη μέθοδο της υποθερμίας, 6,04-6,19 για τη μέθοδο της ασφυξίας και 6,09-6,27 για τη μέθοδο του χτυπήματος στο κεφάλι. Τις επόμενες μέρες παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση των τιμών του pH η οποία πιθανώς σχετίζεται με τη πρωτεολυτική δράση των αλλοιωγόνων βακτηρίων (Dainty, 1996).

Η μελέτη των Acerete *et al.* , (2009) που αφορά τη θανάτωση ιχθύων με τρεις μεθόδους θανάτωσης (ασφυξία, υποθερμία και θανάτωση με CO<sub>2</sub> ) έδειξε ότι η μεταβολή του pH στη σάρκα των ιχθύων λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης που χρησιμοποιήθηκαν, όπως συνέβη και στη παρούσα εργασία που εξετάζει τη μεταβολή του pH σε ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*).

Η συσσώρευση του γαλακτικού οξέος στους μύς, κατά τις πρώτες λίγες ώρες μετά το θάνατο των ψαριών, έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της τιμής του

pH από 7,0 (φυσιολογική τιμή στη σάρκα των ψαριών) συνήθως σε 6,0-6,8. Η πτώση αυτή εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος, τη θρεπτική και βιολογική κατάσταση του ψαριού, τον τύπο του μυός και τη μέθοδο αλιείας (Connell, 1990). Είναι πιθανό να μην υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα της επίδρασης του τρόπου θανάτωσης στο pH διότι το βάρος των ιχθύων της δεύτερης επανάληψης είναι περίπου το μισό από αυτό των ιχθύων που παρελήφθησαν για την αρχική μέτρηση. Στα ψάρια που περιέχουν μεγάλες ποσότητες σκουρόχρωμου ιστού, όπως ο τόνος και το σκουμπρί, η τιμή του τελικού pH μπορεί να είναι περίπου 5,5, ενώ στα λευκόσαρκα κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 6,2-6,6 (Foegeding *et al.*, 1996).

Η μελέτη του [Huss, \(1988\)](#) έδειξε ότι το pH στη σάρκα του κυπρίνου που θανατώθηκε με τη μέθοδο της υποθερμίας αυξήθηκε σημαντικά τη 4<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης και παρέμεινε σταθερό τις επόμενες μέρες. Επίσης για κυπρίνους που θανατώθηκαν με ηλεκτροσόκ παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση του pH από τη 2<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης έως και τη 10<sup>η</sup> μέρα, τις οποίες και διατήρησε τις επόμενες ημέρες. Η αύξηση στις τιμές του pH ίσως να οφείλεται στη συσσώρευση βασικών συστατικών όπως η αμμωνία και η τριμεθυλαμίνη, τα οποία παράγονται από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα ιχθυηρά κατά την αποθήκευση. Επίσης στη ίδια μελέτη δε παρουσιάστηκε καμία σημαντική διαφορά στις τιμές του pH μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων θανάτωσης (Rodrigo *et al.*, 2006). Όπως επίσης και στη παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις τιμές του pH μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων.

Σε μελέτη των Carmel *et al.*, (2006) παρατηρήθηκε ότι η τιμή του pH για ιχθύες που θανατώθηκαν με χτύπημα στο κεφάλι ήταν σημαντικά υψηλότερη

από εκείνη που παρουσιάστηκε για τη μέθοδο θανάτωσης με άζωτο και για τη μέθοδο της ασφυξίας. Συνοπτικά θα λέγαμε ότι η συγκεκριμένη μελέτη απέδειξε ότι η μέθοδος θανάτωσης που παρουσίασε τη μικρότερη κατανάλωση ενέργειας είναι η μέθοδος του χτυπήματος στο κεφάλι, έπειτα ακολουθεί η μέθοδος θανάτωσης με άζωτο και τέλος η μέθοδος της ασφυξίας.

Σε άλλη μελέτη των Grigorakis et al., (2003) μελετήθηκε και παρατηρήθηκε ότι το pH στους ιστούς των ιχθύων τσιπούρας παρέμεινε σταθερό μέχρι τη 3<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης υπό ψύξη (και στα δυο δείγματα του χειμώνα και του καλοκαιριού) ενώ σημαντικές διαφορές παρουσιάστηκαν στο pH των ψαριών που συλλέχθηκαν το καλοκαίρι μετά την 11<sup>η</sup> μέρα και για τα ψάρια που συλλέχθηκαν το χειμώνα μετά από τη 15<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης. Το χαμηλότερο μεταθανάτιο pH μπορεί να κυμαίνεται από 5,4 έως και 7,2 ανάλογα με το είδος του ιχθύος και η μείωση του συνοδεύεται από την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας ( Huss, 1988). Το pH,στη μελέτη του Grigorakis et al., (2003) παρατηρήθηκε να ακολουθεί την ίδια πορεία με τη μελέτη της τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας, (Kyra et al., 1997) αποθηκευμένης στο πάγο. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι ιχθύες μεγαλύτερου μεγέθους διατηρούσαν μια χαμηλότερη τιμή pH από τους μικρότερους σε μέγεθος ιχθύες (Love, 1992). Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Sigholt et al.,(1997) οι οποίοι διαπίστωσαν μία άμεση σχέση μεταξύ του μεταθανάτιου pH και το βάρος ιχθύων εκτρεφόμενου σολωμού.

Στη μελέτη του Bagni et al., (2006) παρατηρήθηκε σημαντική αρχική μείωση του pH και αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η χαμηλότερη τιμή του pH μπορεί να έχει σημειωθεί κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πριν τη

δειγματοληψία τη πρώτη μέρα αποθήκευσης (Alvarez *et al.*,2008) . Η εμφάνιση της νεκρικής ακαμψίας επήλθε στα δείγματα τσιπούρας σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των δوو ωρών μετά τη θανάτωση και αυξήθηκε βαθμιαία μετά από 24 ώρες, με μια μείωση του pH κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου( Bagni *et al.*, 2007).

Σε μελέτη των Bagni *et al.*, (2006) περιγράφεται η επίδραση των μεταχειρίσεων πριν τη θανάτωση και δύο κοινές μέθοδοι θανάτωσης με κάποιους δείκτες στρες. Συγκρίθηκε η επίδραση δυο μεταχειρίσεων (χαμηλής και υψηλής ιχθυοπυκνότητας) και δυο μέθοδοι θανάτωσης (ασφυξία και υποθερμία) σε ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων (χαμηλής και υψηλής ιχθυοπυκνότητας) καθώς επίσης παρατηρήθηκε ότι τα ψάρια που θανατώθηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας είχαν πιο αργό θάνατο από τα άλλα που θανατώθηκαν με υποθερμία. Τα ψάρια που προέρχονταν από χαμηλή ιχθυοπυκνότητα πέθαναν πιο αργά και στα δυο είδη ιχθύων (τσιπούρα και λαβράκι). Τα δεδομένα όσον αφορά τη νεκρική ακαμψία έδειξαν ότι και οι δυο συνηθισμένες μέθοδοι θανάτωσης προκάλεσαν σε μεγάλο βαθμό στρες και στα δυο είδη ιχθύων.

Σε μελέτη των Polli *et al.*, (2005) παρατηρήθηκε το στρες που προκαλείται στους ιχθύες πριν τη θανάτωση, και η επίδραση στις φυσικές και βιοχημικές παραμέτρους της ποιότητας των ιχθύων καθώς και στη ποιότητα της σάρκας τους. Το στρες που προκαλείται πριν τη θανάτωση προκαλεί τη κατανάλωση των ενεργειακών αποθεμάτων και οδηγεί στη παραγωγή γαλακτικών οξέων και στη μείωση του pH, αυξάνοντας τη ταχύτητα έναρξης της

νεκρικής ακαμψίας. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την αρνητική επίδραση στις τεχνολογικές μεθόδους επεξεργασίας της σάρκας των ιχθύων, στη ποιότητα της σάρκας και στη διατήρηση της ποιότητας τους. Η ασφυξία έχει αποδειχθεί η μέθοδος που προκαλεί το περισσότερο στρες στους ιχθύες ( Polli *et al.*, 2005) σε σχέση για παράδειγμα με το χτύπημα στο κεφάλι ή το τρύπημα του εγκεφάλου (Ottera *et al.*, 2001) ή τη θανάτωση σε CO<sub>2</sub> ή με ηλεκτρισμό (Sebastio *et al.*, 1996). Η ασφυξία οδηγεί σε μια πιο παρατεταμένη κινητική δραστηριότητα σε σχέση με την υποθερμία, με αποτέλεσμα να επηρεάζει αρνητικά τη καλή φυσική κατάσταση των ιχθύων.

Οι μεταβολές του pH όπως παρατηρήθηκε και από άλλους μελετητές (Kyraa *et al.*, 1997) παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση της τιμής κατά τη τέταρτη μέρα αποθήκευσης καθώς και μια άμεση σχέση του βαθμού αύξησης του pH με τη σκληρότητα της σάρκας. Στα ψάρια μια αρχική μείωση του pH μετά το θάνατο αποδίδεται στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που παράγεται από τον αναερόβιο μεταβολισμό του γλυκογόνου στη σάρκα των ιχθύων (Grigorakis *et al.*, 2003), και αυτή η μείωση του pH συνοδεύεται από τη διαδικασία της νεκρικής ακαμψίας (Huss,1995).

Με τη μείωση της συγκέντρωσης της ATP κάτω από μια ορισμένη, οριακή τιμή η οποία ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης, και με την πτώση του pH στην κατώτερη τιμή επέρχεται η νεκρική ακαμψία, κατά την οποία οι μυς βρίσκονται σε διαρκή σύσπαση και το σώμα του ψαριού γίνεται άκαμπτο. Ο χρόνος που μεσολαβεί από το θάνατο των ψαριών μέχρι την εμφάνιση της νεκρικής ακαμψίας και η χρονική της διάρκεια ποικίλλουν ανάμεσα

στα διάφορα είδη ψαριών και επηρεάζονται από τα αποθέματα γλυκογόνου (η καταπόνηση κατά τη σύλληψη τους τα εξαντλεί), (FAO, 2003b)

Η μελέτη των Alvarez et al., (1998) έδειξε ότι οι αναμενόμενες τιμές του pH όσον αφορά εμπορεύσιμοι μεγέθους ψάρια κυμαίνονται μεταξύ 6,12 και 6,56. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές πριν τη θανάτωση και κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό ψύξη. Όσο παρέμεναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα τα ψάρια στη συντήρηση τόσο αυξανόταν το pH τους. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί και από άλλες μελέτες (Paradoroulos et al., 2003), όπου το pH παρέμενε σταθερό τις πρώτες μέρες συντήρησης και μετά αυξανόταν. Παρόλα αυτά σε άλλη μελέτη αποθηκεύθηκαν στους 2-4°C τσιπούρες και λαβράκια και παρατηρήθηκε μια αύξηση του pH (κυρίως στις τσιπούρες) καθ' όλη τη διάρκεια των 7 ημερών αποθήκευσης (Taskaya et al., 2003).

Η άνοδος του pH που παρατηρείται κατά τη διάρκεια συντήρησης των ψαριών υπό ψύξη οφείλεται στη βαθμιαία συγκέντρωση πτητικών βάσεων που προέρχονται από τη βακτηριακή δράση επί των ελεύθερων αμινοξέων αρχικά και των πρωτεϊνών στη συνέχεια, καθώς και επί του μη πρωτεϊνικού αζώτου (Alur et al., 1995). Οι μετρήσεις του pH κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στη ψύξη δείχνουν ότι έχουν άμεση σχέση με τη ταχύτητα της αλλοίωσης στα ψάρια (Barat et al., 2008). Παρόμοιες τιμές παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες (Parisi et al., 2002).

#### 4.4 Μεταβολή της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων

Για τη μέτρηση της σκληρότητας χρησιμοποιήθηκε δυναμόμετρο τύπου Instron με έμβολο που έφτανε σε βάθος 5mm στη σάρκα των ιχθύων. Η μέγιστη



δύναμη που εφαρμόστηκε τη πρώτη μέρα θανάτωσης των ιχθύων με υποθερμία ήταν 9,67 N, για την ασφυξία 10,71N και για το χτύπημα στο κεφάλι 6,67N. Η σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων που θανατώθηκαν με ασφυξία πιθανώς οφείλεται στη γρήγορη κατανάλωση του γλυκογόνου και τη ακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης της ATP, η οποία οδηγεί στη γρήγορη έναρξη και αύξηση της νεκρικής ακαμψίας (Poli *et al.*, 2005).

Από την επεξεργασία των δεδομένων, όσον αφορά τη σκληρότητα της σάρκας των ιχθύων για τη πρώτη μέρα θανάτωσης, παρατηρούμαι ότι διαφέρει σημαντικά ο βαθμός σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων στο σημείο της αρχής της πλευρικής γραμμής, σε αντίθεση με τα άλλα δύο σημεία στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση και δεν παρουσιάστηκε διαφορά εξαιτίας του διαφορετικού τρόπου θανάτωσης. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στο τεχνικό μέρος της μέτρησης.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της σκληρότητας δεν είναι ενδεικτικά για τη παρούσα μελέτη εξαιτίας του μικρού δείγματος ιχθύων που εξασφαλίστηκε καθώς και λόγω της πιθανότητας της μη σωστής εφαρμογής των διαφορετικών τρόπων θανάτωσης από μη εξειδικευμένους χειριστές.

Σε παρόμοια μελέτη των Urbieto *et al.*, (2000) διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στη σκληρότητα για τη 2<sup>η</sup> και την 7<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης καθώς επίσης ότι επηρεάζεται η συνεκτικότητα, η σταθερότητα και η ελαστικότητα της σάρκας των ιχθύων τσιπούρας. Όλες οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος ήταν οι ίδιες (χρόνος αποθήκευσης, θερμοκρασία) για τις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης που ακολουθηθήκαν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η

μεγαλύτερη σκληρότητα βρέθηκε να είναι στους ιχθύες που θανατώθηκαν με τη μέθοδο θανάτωσης της υποθερμίας (Urbieto *et al.*, 2000).

Η μελέτη των Ambroggi *et al.*, (1996) απέδειξε ότι η ακαριαία θανάτωση όπως το χτύπημα στο κεφάλι παρουσίασε μεγαλύτερη σκληρότητα απ' ότι οι μέθοδοι με ηλεκτρισμό ή οι μέθοδοι ασφυξίας στη πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*).

Παρατηρήθηκε στη μελέτη των Bagni *et al.*, (2007) ότι η νεκρική ακαμψία εμφανίστηκε νωρίτερα στα ψάρια που προέρχονταν από υψηλή ιχθυοπυκνότητα, σύμφωνα και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τα σολωμοειδή. (Korhonen *et al.*, 1990). Επιπλέον, τα ψάρια τα οποία έχουν εκτεθεί σε στρες πριν τη θανάτωση γενικά είναι αναμενόμενο να έχουν μια πιο έντονη νεκρική ακαμψία ( Berg *et al.*, 1997). Αντιθέτως, τα ψάρια που δεν έχουν υποστεί στρες φαίνεται να έχουν μικρότερη διάρκεια στο στάδιο της νεκρικής ακαμψίας. Οι μεταθανάτιες μεταβολές διαφέρουν μεταξύ των στρεσαρισμένων και μη ιχθύων, όπου η συγκέντρωση της ATP ελαττώνεται σημαντικά (Berg *et al.*, 1997). Η νεκρική ακαμψία ξεκινά αμέσως ή λίγο μετά από τη θανάτωση αν το ψάρι βρίσκεται σε κατάσταση νηστείας και τα αποθέματα γλυκογόνου είναι μειωμένα, ή όταν το ψάρι βρίσκεται σε κατάσταση στρες. Επίσης η μέθοδος θανάτωσης που θα χρησιμοποιηθεί επηρεάζει το χρόνο έναρξης της νεκρικής ακαμψίας. Η θανάτωση με υποθερμία δίνει τη πιο γρήγορη έναρξη της νεκρικής ακαμψίας, ενώ το χτύπημα στο κεφάλι δίνει μια καθυστέρηση περισσότερη των 18 ωρών (Proctor *et al.*, 1992).

Οι Gines *et al.* (2002), μελέτησαν τσιπούρες (500g), τις οποίες διατήρησαν σε κατάσταση ασιτίας για 1 και 8 μέρες. Μετρήθηκε η σκληρότητα

της σάρκας και το pH μετά από 11 μέρες στο πάγο. Στα ψάρια που παρέμειναν σε κατάσταση ασιτίας για 1 μέρα και διατηρήθηκαν στο πάγο η σκληρότητα ήταν 6,17N, μετά από 7 μέρες 4,57 και μετά από 11 μέρες 3,94N. Στα ψάρια σε ασιτία 8 ημερών παρουσιάστηκε μετά από 2 μέρες στο πάγο μέγιστη δύναμη 6,19N, μετά από 7 μέρες 5N και μετά από 11 μέρες 4,43N.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα αποτελέσματα των άλλων ερευνών δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διότι για τη μέτρηση της μέγιστης δύναμης που εφαρμόστηκε, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικού μεγέθους έμβολα ή η μέτρηση δε πραγματοποιήθηκε στο ίδιο βάθος της σάρκας ή το έμβολο κινήθηκε με διαφορετική ταχύτητα κατά τη μέτρηση με συνέπεια τα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών ερευνών να διαφέρουν όπως και τα αποτελέσματα των τιμών της παρούσας εργασίας. Σύμφωνα με τον Shearer (1994), ένας επιπλέον λόγος που εμποδίζει τη σύγκριση των τιμών είναι το είδος αλλά και το μέγεθος των ιχθύων που μελετούνται, διότι οι δύο αυτοί παράγοντες επηρεάζουν τη σύσταση της σάρκας τους και συνεπώς την ίδια τη μέτρηση. Συνεπώς στη συγκεκριμένη μελέτη λόγω του διαφορετικού μεγέθους των ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις επαναλήψεις, η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε δεν μπορεί να θεωρηθεί ενδεικτική για τα αποτελέσματα.

Στη μελέτη των Erickson *et al.*, (1997) που ασχολήθηκε με τη διαδικασία θανάτωσης ιχθύων και την επίδραση στη ποιότητα της σάρκας τους, παρουσιάστηκε ότι η ανάπτυξη της νεκρικής ακαμψίας δυο συνηθισμένων μεθόδων θανάτωσης όπως η υποθερμία και η ασφυξία προκαλούσαν και οι δύο σε μεγάλο βαθμό στρες στα ψάρια. Το ίδιο αποτέλεσμα παρουσίασε και η

παρούσα μελέτη όσον αφορά τις δύο από τις τρεις μεθόδους θανάτωσης την υποθερμία και την ασφυξία, που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέτρηση. Η ασφυξία θεωρείται από τις πιο στρεσογόνες μεθόδους σε σχέση με το χτύπημα στο κεφάλι, το τρύπημα του εγκεφάλου, ψύξη με CO<sub>2</sub> ή με τον ηλεκτρισμό (Sebastio *et al.*, 1996). Σαν αποτέλεσμα έδειξε ότι υπάρχει μια έντονη νεκρική ακαμψία μετά από 6 ώρες, ενώ σε άλλη μελέτη για το σολωμό που θανατώθηκε με χτύπημα στο κεφάλι αναφέρθηκε ότι η εντονότερη νεκρική ακαμψία έγινε μετά από 18-24 ώρες μετά τη θανάτωση. Η ασφυξία συνήθως οδηγεί σε μια πιο παρατεταμένη δραστηριότητα πριν τη θανάτωση σε σχέση με την υποθερμία, επομένως έχει και διαφορετική επίδραση στη φυσική κατάσταση των ιχθύων. Η φυσική κατάσταση των ιχθύων επηρεάζεται άμεσα από τις επικρατούσες συνθήκες εξαιτίας των έντονων κινήσεων των ιχθύων που γίνονται για μερικά λεπτά πριν τη θανάτωση τους. Η μελέτη μας έδειξε ότι η μεγαλύτερη σκληρότητα παρουσιάστηκε μετά τις 18 ώρες θανάτωσης και οι τρόποι θανάτωσης δεν επιδρούν στη μεταβολή της σκληρότητας της σάρκας εκτός από τη περίπτωση που εφαρμόστηκε στο σημείο στην αρχή της πλευρικής γραμμής (texture 2), κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 5°C, που μπορεί να οφείλεται στο τεχνικό μέρος της μεταχείρισης κατά τη διάρκεια της θανάτωσης.

#### 4.5 Μαθηματικό μοντέλο παρουσίασης των δεδομένων ( Baranyi )

Υπάρχουν πολλές και διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά τα μοντέλα της μικροβιακής ανάπτυξης στη βιβλιογραφία. Για την περιγραφή της βακτηριακής ανάπτυξης χρειάζονται οι διαφορικές εξισώσεις. Ένα ιδιαίτερα

εύχρηστο μοντέλο επεξεργασίας των δεδομένων είναι το μαθηματικό μοντέλο του Baranyi (1992) και το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη, για το προσδιορισμό της μικροβιακής ανάπτυξης καθώς και για τη μελέτη των μεταβολών του pH και της σκληρότητας της σάρκας των ιχθύων.

## 5. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### 5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Acerete L., Reig L., Alvarez D., Flos R., Tort L. (2009).** Comparison of two stunning/ slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 287: 139-144.
- **Alvarez, J.G., Storey, B., (1989).** Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of mobility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*. 23: 77–90.
- **A. Álvarez a, B. García García a, M.D. Garrido b, M.D. Hernández (2008).** The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 284: 106–114
- **Alur, M. D., Doke, S. N., Warriar, S. B. & P. M. Nair (1995).** Biochemical methods for determination of spoilage of foods of animal origin: A critical evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, 32 : 181-188 .
- **Ambroggi, F., Sebastio P., Pirazzoli, P. And Baldrati, G. (1996).** Influenza del sistema disaccificazione su trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) di allevamento, II – Rigor mortis e consistenza del tessuto muscolare. *Industria Conserve*, 71: 157-161.**Bagni M., Civitareale C., Priori A., Ballerini A., Finoia M., Brambilla G., Marino G. (2007).** Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) *Aquaculture* 263: 52–60.

- **Baranyi, J., Roberts, T. A. and McClure, P. (1992). Theorems on a non-autonomous growth model describing the adjustment of the bacterial population to a new environment.** *Food microbiology*: 43-59.
- **Barrat J., Gil L., Garcia-Breijo E., Aristoy M-Concepcion, Toldra F., Martinez-Manez R., Soto J., (2008).** Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with potentiometric sensor. *Food Chemistry* 108: 681-688.
- **Batty R.S, Wardle C.S.(1979).** Restoration of glycogen from lactic acid in the anaerobic swimming muscle of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of fish biology*:509-519.
- **Berg, T., Erikson, U., Nordvedt, T.S., (1997). Rigor mortis assessment of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and effects of stress.** *Journal Food Science* 62: 439–446.
- **Botta, J. R. (1995).** Evaluation of seafood freshness quality. VCH Publishers Inc: 9-17.
- **Carmel C. Wills , Giulia Zampacavallo , Bianca-Maria Poli , Marlene R.M. Proctor & Gary T.M. Henehan (2006). Nitrogen stunning of rainbow trout.** *International Journal of Food Science and Technology*: 395-398.
- **Chang K.L.B., Chang,J., Shiau C.-Y., Pan,B.S. (1998).** Biochemical, Microbiological, and Sensory Changes of Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*) under Partial Freezing and Refrigerated Storage *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 682-686.

- **Chiba, A., Hamaguchi, M., Kosaka, M., Tokuno, T., Asai, T. and Chichibu, S., (1991).** Quality evaluation of fish meat by phosphorus-nuclear magnetic resonance. *Journal of Food Science* 56:. 660–664.
- **Clydesdale, M. F., (1998).** Color: origin, stability, measurement and quality. *Food Science and Technology*:196-201.
- **Connell, J. J. (1975).** Control of fish quality. London: *Fishing News Books Ltd. Journal of Food Quality* :197.
- **Connell, J. J. (1990).** Control of fish Quality (3<sup>rd</sup> ed.). *Fishing News Books Ltd.* Surrey, England. *Journal of Food Quality* 13 : 209-223.
- **Dainty, R. H. (1996).** Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33 : 19-33.
- **Dalgaard, P. (1995).** Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish *International Journal of Food Microbiology*, 26: 305-317.
- **Dalgaard, P., Mejlholm, O., Huss, H.H. (1997b).** Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish *International Journal of Food Microbiology*, 38 :169-179.
- **Davis, H. K. (1995).** Quality and Deterioration of Raw Fish. In A. Ruiter (Ed.), *Fish and Fishery Products, Composition, Nutrive Properties and Stability*: 215-242.
- **U. Erikson U., Sigholt T. and Seland A., (1997).** Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture* 149: 243–252.



- **FAO (2002)**. Recent trends and possible consequences for world fisheries and aquaculture.
- **FAO (2003a)**. Aquaculture production: quantities 1950-2001 & values 1984-2000.
- **FAO (2003 b)**. Quality and quality changes in fresh fish: 5. Postmortem changes in fish.
- **FAO (2003c)**. Quality and quality changes in fresh fish: 8. Assessment of fish quality.
- **FAWC, (1996)**. Report on the Welfare of Farmed Fish, Farm Animal Welfare Council, UK..
- **Foegeding E. A., Lanier, C. T. & H. O. Hultin (1996)**. Characteristics of Edible Muscle Tissues. In O. R. Fennema (Ed), *Food Chemistry (3<sup>rd</sup> ed.)*: 879-942.
- **Garthwaite, G. A. (1997)**. Chilling and freezing of fish. In G. M. Hall (Ed.), *Fish Processing Technology (2<sup>st</sup> ed)* :119-158.
- **Gibson, D.M. (1985)**. Predicting the shelf life of packaged fish from conductance measurements *Journal of Applied Bacteriology*, 58 : 465-469.
- **Gines, R., Palicio, M., Zamorano, M.J., Arguello, M., Lopez, J.L. and Afonso, J.M. (2002)**. Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture International*, 10:1573-143.

- **Gram, L., Melchiorson, J.(1995).** Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas sp.* and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80 : 589-595.
- **Gram, L., Huss, H.H. (1996)** .Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33 : 121-137.
- **Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., Alexis, M.N., (2003).** Seasonal patterns of spoilage of iced stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*. 81: 263–268.
- **Hanna, J. (1992).** Rapid microbial methods and fresh fish quality assessment. In G. M. Hall (Ed.), *Fish Processing Technology* (1<sup>st</sup> ed.) :275-301
- **Handumrongkul, C. and Silva, J.L., (1994).** Aerobic counts, colour and adenine nucleotide changes in CO<sub>2</sub> packed refrigerated striped bass strips. *Journal of Food Science* 59:. 67–69.
- **Harrigan, W. F. (1998).** *Laboratory Methods in Food Microbiology*, 3rd edn. Academic Press London, UK: 228-233.
- **Horner, W. F. A. (1997).** Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In G. M. Hall (Ed.), *Fish Processing Technology* (2<sup>nd</sup> Ed.) : 32-73.
- **Howgate, P., Johnston, A. & K. J. Whittle (1992).** Multilingual guide to E.C. freshness grades for fishery products. Torry Research Station, Food Safety Directorate and Ministry of Agriculture, *Fisheries and Food* :32.
- **Huss, H. H. (1988).** Fresh fish-quality and quality changes. *International Food of Microbiology* :121-137.

- **ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for foods). (1986).** Microorganisms in foods. Control of biological hazards in cold smoked salmon production *Food control*: 335-340.
- **P. Jenner P, (1994).** Oxidative damage in neurodegenerative disease, *Lancet* 344: 796–798.
- **Korhonen, R.W., Lanier, T.C., Giesbrecht, F., (1990).** An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. *Journal Food Science* 55: 346–348.
- **Koutsoumanis, K., Nychas K., G.-J.E. (1999)** Chemical and sensory changes associated with microbial flora of mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C ~~(1999)~~ *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 698-706.
- **Koutsoumanis, K., Tassou, C., Taoukis, P., Nychas, G.-J.E. (1999)** . Predictive Modelling of Microbial Growth and Survival in Food. *International Journal of Food microbiology* : 295-303.
- **Kyranas, V. R., Lougovois, V. P., & Valsamis, D. S. (1997).** Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 32: 339–347.
- **Love, R. M. (1980).** The chemical biology of fishes (Vol. 2). London UK: *London Academic Press* : 547.
- **Love, R. M. (1992).** Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In G. M. Hall (Ed.), *Fish processing technology*: 1–30.
- **Love, R. M. (1997).** Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. In G. M. Hall (Ed.), *Fish Processing technology*: 1-31.

- **S. Mochizuki S. and A. Sato A. (1994).** Effects of various killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel, *Nippon Suisan Gakkaishi* 60:~~(1994)~~ 125–130.
- **T. Nakayama T., M. Kaneko M. and M. Kodama M., (1986).** Detection of DNA damage in cultured human fibroblasts induced by methyl linoleate hydroperoxide, *Agriculture. Biological. Chemistry* 50:~~(1986)~~ 261–262.
- **T. Nakayama T., T. Toyoda T. and A. Ooi A., (1994).** Physical property of carp muscle during rigor tension generation, *Fisheries. Science.* 60:~~(1994)~~ 717–721.
- **Özogul, Y., Özogul, F. (2004).** Effects of slaughtering methods on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored in ice and MAP *European Food Research and Technology*, 219: 211-216.
- **Ottera H., Roth B. and Torrissen O.J. (2001).** Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon?. In: S.C. Kestin and P.D. Warriss, Editors, *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science Ltd, Oxford: 398–399.
- **Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savva, I.N., Kontominas, M.G., (2003).** Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20: 411–420.
- **Parisi, G., Franci, O., & Poli, B. M. (2002).** Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in

- refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. *Aquaculture*, 214: 153–167.
- **Poli B. M., Parisi G., Scappinil F. and Zampacavallo G. (2005).** *Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13 : 29-49.*
  - **Proctor, M.R.M., I.A. Ryan and J.V. McLoughlin (1992).** The effects of stunning and slaughter methods on changes in skeletal muscle and quality of farmed fish. Proceedings from TNO, The Netherlands, International Conference *Upgrading and Utilization of Fishery Products*.
  - **Reineccius G., (1985).** Off-flavours in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29: 381–402.
  - ~~D.H.F. Robb~~ **D.H.F., S.C. Kestin S.C. and P.D. Warriss P.D, (2000).** Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout, *Aquaculture* 182:~~(2000)~~, 261–269.
  - **Rodrigo S., Rossini P., Augusti V., Caetano B., Steffens C, Martins L Fries, Ana Paula Daniel, Ernesto Hashime Kubota, João Radünz Neto and Tatiana Emanuelli (2005).** Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry* 99 : 136-142.
  - **Shearer, K. D, (1994).** Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119 : 63-88.
  - **Sebastio, P., Ambroggi, F., Baldrati, G. (1996).** Influence of slaughtering method on rainbow trout bred in captivity. *Aquaculture* 119 : 63-88.

- **Schaller E, Bosset Jacques O. and Escherba Felix (1998).** Electronic Noses' and Their Application to Food. *Food Science and Technology* 31:305-316.
- **Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S., & Seland, A. (1997).** Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 62: 899–905.
- **Taskaya, L., Cakli, S., Celik, U., (2003).** A study on the quality changes of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) under the market conditions. *E.U. Journal Fishery Aquatic Science*. 20: 313–320.
- **Tobiassen, T. and Sorensen, N.K. (1999).** Influence of killing methods on time of death of Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture Europe* :50-58.
- **Tejada,M., Huidobro,A. (2002).** Quality of farmed gilthead seabream [*Sparus aurata*] during ice storage related to the slaughter method and gutting *European Food Research and Technology*, 215 : 1-7.
- **Urbieta F.J., Ginis (2000).** Optimisation of slaughtering method in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cahiers Options Méditerranées* 51: 71-77.

- **Veciana-N M. T., Izquierdo-Pulido M. and Vidal-Carou M.C.. (1997).** Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. *Food Chemistry* 59 : 467-472.
- **Waagb R., Sandnes K., ~~O.J.~~ Torrissen O.J., ~~A.~~ Sandvin A. and ~~Ø.~~ Lie O., (1993).** Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three different levels of *N*-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E, *Food Chemistry* 46 ~~(1993)~~: 361–366.
- **~~A.J.~~ Wall A.J., (2001).** Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: S.C. Kestin and P.D. Warriss, Editors, *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science Ltd., Oxford ~~(2001)~~: 108–115.

### 5.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- **Βαρελιτζής, Κ. (1997).** Σημειώσεις τεχνολογίας και ποιοτικού ελέγχου αλιευμάτων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης : 23-35.
- **Βαρελιτζής, Κ. (1999).** Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλιευμάτων. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη : 115-129.
- **Βασιλειάδου, Σ. (2003).** Σημειώσεις τεχνολογίας και ποιοτικού ελέγχου αλιευμάτων. Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης : 32-44.
- **Γεωργάκης, Α. Σ. (2000).** Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης, *Σύγχρονη Παιδεία* : 25-133.
- **Μποζιάρης, Ι. (2008).** Υγιεινή και συντήρηση εδώδιμων αλιευμάτων. *Πανεπιστημιακές παραδόσεις*, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας : 90-99.



## 6. ABSTRACT

The aim of the research is to study the influence of three different slaughtering methods (asphyxiation in ice water slurry, asphyxiation in air and blow on the head) at post mortem changes and the subsequent growth of microbial spoilage flora, which are the main factors responsible for the quality deterioration and shelf-life duration of fish stored at refrigeration temperatures.

Initially, the study was about the population of the main spoilage microorganisms that were monitored during storage at 5°C. That experiment was revised three times in the laboratory using three different slaughtering procedures of the fishes so as to investigate the influence that these methods have on the microbial growth. The micro organisms that were detected were the total population of microflora, the organisms that produce H<sub>2</sub>S (*Shewanella putrefaciens*) and *Brochothrix thermosphacta*.

The statistic analysis showed that there was no significant difference between the three different slaughtering methods that influence the spoilage growth population. The population of *Pseudomonas sp.* and the population of bacteria producing H<sub>2</sub>S achieved the level of 10<sup>8</sup> cfu/g after 4 days in storage conditions at 5°C, according to the killing method that was used. As far as Specific Spoilage Organisms (SSO's) are concerned, like *Shewanella*

*putrefaciens*, reached the level of  $10^8$  cfu/g from the second day of storage up to the fourth day of storage at 5°C.

Additionally, in the same study recorded the pH changes in the flesh of fishes for the three different slaughtering methods for 10 days. There was a daily examination of the sediments. The results showed that the pH changes were not influenced by the killing procedure of the three different slaughtering methods for fishes that were been stored at 5°C.

The measurement of the flesh texture of fishes was an additional parameter in the study. The results of that measurement showed that the three different killing methods, according to the asphyxiation in air, did not show a significant difference on the influence on the flesh texture. The pressure that adjusted on the fish flesh for the texture measurement was achieved with a plug. The plug got in the flesh 5mm.

The different slaughtering methods as the ice water slurry, asphyxiation in air and blow on head, did not influence, in any significant way the growth of microbial spoilage population as well as the post mortem changes in storage conditions at 5°C.