



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**<< Υδατοκαλλιέργειες- Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων  
Οργανισμών>>**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΙΤΛΟΣ**

**«Μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης  
σε μύδια κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη και κατά του  
*Vibrio parahaemolyticus*»**

**Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια  
Ντόντου Ιωάννα**

**Υπεύθυνος καθηγητής**

Αλέξαντρος Γκόβαρης

Καρδίτσα, 2012



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM**

***“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”***

**THESIS:**

**Study of the effect of oregano essential oil on mussels during  
refrigerated storage and against *Vibrio parahaemolyticus***

**POSTGRADUATE STUDENT**

Ntontou Ioanna

**SUPERVISOR**

Alexandros Govaris

Karditsa, 2012

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυδοκαλλιέργεια παρουσιάζει μεγάλη οικονομική σημασία για την Ελλάδα με την εγχώρια παραγωγή να υπερβαίνει τους 32000 τόνους ετησίως. Τα μύδια διακινούνται συνήθως νωπά με ή χωρίς κέλυφος και αποτελούν ιδιαίτερα ευαλλοιώτα προϊόντα. Η διάρκεια συντήρησής τους υπό ψύξη δεν υπερβαίνει τις 6-7 ημέρες και η διερεύνηση νέων μεθόδων για την επιμήκυνσή της παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης διαθέτει ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση και τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτενώς η χρήση του σε διάφορα τρόφιμα για την αύξηση του χρόνου συντήρησής τους, ως εναλλακτικό των χημικών συντηρητικών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη μικροβιολογική κατάσταση των μυδιών κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη, καθώς και η αντιμικροβιακή του δράση κατά του *Vibrio parahaemolyticus*, ενός σημαντικού τροφιμογενούς παθογόνου που συνδέεται με την κατανάλωση μυδιών, τόσο *in vitro* όσο και σε μύδια.

Μύδια καλλιέργειας (*Mytilus galloprovincialis*) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη και κατά την παραλαβή εξετάστηκε η νωπότητα και βιωσιμότητά τους. Τα νεκρά μύδια απομακρύνθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα εκπλύθηκαν και αφαιρέθηκε η σάρκα τους. Στο πρώτο μέρος της μελέτης, η σάρκα των μυδιών συσκευάστηκε σε αερόβιες συνθήκες τόσο με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,2% όσο και χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου (CON) και όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4 °C. Ανά 2 ημέρες γινόταν οργανοληπτικός (σε νωπά και σε μύδια μετά από θερμική επεξεργασία) και μικροβιολογικός έλεγχος (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ψυχρόφιλα βακτήρια και *Enterobacteriaceae*) των δειγμάτων. Τέλος εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου κατά του *V. parahaemolyticus* τόσο *in vitro* όσο και σε μύδια κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη για 14 ημέρες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα CON παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα, ενώ τα δείγματα με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,2% μέχρι και την 8<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησής τους.

τους, αντίστοιχα. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης 0,1% έδειξε ότι οι πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων παρέμειναν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,05$ ) σε σχέση με τα δείγματα CON από την 2<sup>η</sup> ημέρα μέχρι και το τέλος της συντήρησής τους. Αντίστοιχα, το αιθέριο έλαιο ρίγανης στην υψηλότερη συγκέντρωση (0,2%) παρουσίασε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) μικρότερους πληθυσμούς όλων των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, σε σχέση με τους αντίστοιχους της συγκέντρωσης ρίγανης 0,1%, από τη 2<sup>η</sup> ημέρα έως και το τέλος της συντήρησης στους 4 °C.

Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus* τόσο *in vitro* όσο και σε μύδια κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη, η οποία ήταν ισχυρότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση του 0,2%

**ΛΕΞΕΙΣ- ΚΛΕΙΔΙΑ:** μύδια, αιθέριο έλαιο ρίγανης, O.M.X., ψυχρόφιλα βακτήρια, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio parahaemolyticus*



## ABSTRACT

The aquaculture of mussels is of great financial importance for Greece since the mussel production exceeds 32000 tons annually. Mussels are marketed mainly as raw shelled or unshelled refrigerated products. They have a very limited shelf-life which is no more than 6-7 days under refrigerated storage. So research for new preservation methods in order to extend their shelf-life is important. Oregano essential oil possesses strong antimicrobial and antioxidant properties and has been thoroughly used as an alternative to chemical preservatives in a variety of foods. Aim of this work was to study: i) the effect of the addition oregano essential oil on the organoleptic characteristics and microbiological status of mussels during refrigerated storage as well as ii) the antimicrobial activity of oregano essential oil against *Vibrio parahaemolyticus* both *in vitro* and in mussels.

Aquaculture mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were transferred to the laboratory under refrigeration. Mussels were inspected and dead animals were discarded. The remaining samples were washed and their flesh meat was removed. Then mussels were packed aerobically with the addition of oregano essential oil at concentrations of 0.1%, 0.2% (which were the highest concentrations of the essential oil acceptable in mussels in a preliminary experiment) or without the addition of the essential oil (CON) and stored at 4 °C for 14 days. At 2 days interval sensory evaluation and microbiological analysis (for Total Viable Count and *Enterobacteriaceae*) were conducted. In the second part of the study, the antimicrobial effect of oregano essential oil against *V. parahaemolyticus* was investigated *in vitro* and in mussels during refrigerated storage for 14 days.

Sensory evaluation showed that CON group samples remained acceptable up the 6<sup>th</sup> day of storage, while group samples with the addition of oregano essential oil at 0.1% or 0.2% up the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> day of refrigerated storage, respectively. Measurement of Total Viable Count counts, psychrophilic bacteria and *Enterobacteriaceae* showed that the addition of oregano essential oil at 0.1% presented significantly lower ( $P < 0.05$ ) microbial populations than the CON group throughout the storage at 4 °C. Samples with

oregano essential oil at 0.2% showed significantly lower ( $P < 0.05$ ) microbial populations than the concentration of 0.1% throughout refrigerated storage. Finally, oregano essential oil at 0.1% or 0.2% presented significant antimicrobial effect against *V. parahaemolyticus* both *in vitro* and in mussels, which was stronger for the higher concentration of 0.2%.

**KEYWORDS:** mussels, oregano essential oil, TVC, psychrophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio parahaemolyticus*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ:</u></b>	<b>ΣΕΛ:</b>
Περίληψη	3
Abstract	5
Περιεχόμενα	7
Ευχαριστίες	11
<b><u>ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup> Βιβλιογραφική Ανασκόπηση</u></b>	
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup></u></b>	
1.1. Δίθυρα μαλάκια	13

1.2 Μύδια	15
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup></u></b>	
2.1. Το μύδι ως τρόφιμο	25
2.2 Τροφιμογενή νοσήματα από κατανάλωση οστρακοειδών	25
2.2 Η σημασία του <i>Vibrio parahaemolyticus</i> για την ασφάλεια των μυδιών	37
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></u></b>	
3.1 Αιθέρια έλαια	47
3.2 Αιθέριο έλαιο ρίγανης	50
<b><u>ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup> Η δική μας έρευνα</u></b>	
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></u></b>	
<b>Η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μυδιών.</b>	
4.1 Αντιμυκητιακή δράση	60
4.2 Αντιοξειδωτική δράση	60
4.3 Άλλες ιδιότητες	61
4.4 Αιθέριο έλαιο θυμαριού	61

4.5 Ταξινόμηση	63
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup></u></b> <b>Η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μικροβιολογική κατάσταση των μυδιών</b>	
5.1 Εισαγωγή	68
5.2 Παρασκευή των δειγμάτων	68
5.3 Μικροβιολογική ανάλυση	69
5.4 Στατιστική Ανάλυση	69
5.5 Αποτελέσματα και συζήτηση	70
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup></u></b> <b>Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου Ελαίου ρίγανης κατά του <i>V. parahaemolyticus in vitro</i></b>	
6.1 Εισαγωγή	77
6.2 <i>V. parahaemolyticus</i>	77
6.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζωμό TSB	78
6.4 Στατιστική επεξεργασία	78
6.5 Αποτελέσματα και συζήτηση	78
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup></u></b>	

<b>Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του <i>V. parahaemolyticus</i> σε μύδια</b>	
<b>7.1 Εισαγωγή</b>	<b>82</b>
<b>7.2 Παρασκευή των δειγμάτων</b>	<b>82</b>
<b>7.3 Μικροβιολογική ανάλυση</b>	<b>83</b>
<b>7.4 Στατιστική επεξεργασία</b>	<b>83</b>
<b>7.5 Αποτελέσματα και συζήτηση</b>	<b>83</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>86</b>

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη για την προθυμία και την βοήθεια που μου προσέφερε για την διεξαγωγή αυτής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το λέκτορα κ. Νίκο Σολωμάκο για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του στην εργασία και γιατί με βοήθησε με τις πολύτιμες συμβουλές του στη συγγραφή του κειμένου. Η συμπαράσταση του ήταν πολύτιμη για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής μου.

Ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στη λέκτορα κα. Α. Πεξαρά για το ενδιαφέρον που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω σε όλους τους συμφοιτητές μου για τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του

μεταπτυχιακού καθώς και στις συναδέλφους Αγγελίδου Νικολέτα Ελισάβετ και Αντωνία Αναλάτου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την απεριόριστη συμπαράσταση, την οικονομική τους υποστήριξη όλα τα χρόνια της φοίτησης μου, καθώς και για την ενθάρρυνση που μου έδωσαν στις δύσκολες στιγμές.

# **Μέρος 1<sup>ο</sup>**

## **Βιβλιογραφική ανασκόπηση**





# Κεφάλαιο 1

## 1.1 ΔΙΘΥΡΑ ΜΑΛΑΚΙΑ

Τα μαλάκια (Molluscs), σήμερα θεωρείται ότι αποτελούνται από 100.000 ζώντα είδη και η ιστορία τους πάνω στη γη, ξεπερνάει τα 600 εκατομμύρια χρόνια. Είναι ζώα ασπόνδυλα, το σώμα τους είναι μαλακό, χωρίς μεταμέρεια και έχουν αμφίπλευρη συμμετρία. Ο κύριος μηχανισμός προστασίας τους είναι η έκκριση ενός σκληρού εξωτερικού περιβλήματος, του οστράκου, το οποίο αποτελεί σπουδαίο καταφύγιο για το σώμα των μαλακίων (Delamotte, 1994).

Στην κλάση *Bivalvia* (δίθυρα) του φύλου των μαλακίων ανήκουν τα πιο γνωστά όστρακα, όπως τα μύδια, στρείδια, χτένια, γυαλιστερές, κυδώνια κ.α. Στην Ελλάδα οι πιο γνωστές περιοχές αλιείας οστράκων σήμερα είναι η Αλεξανδρούπολη, το Πόρτο Λάγος, η Κεραμωτή, ο Θερμαϊκός, ο Μαλιακός, ο Ευβοϊκός, ο Σαρωνικός, ο Αμβρακικός κόλπος και ο κόλπος της Καλλονής στη Λέσβο. Στον κόλπο της Θεσσαλονίκης υπάρχουν φυσικοί πληθυσμοί δίθυρων πολλών ειδών και σε εκμεταλλεύσιμες ποσότητες (Μητσούδη, 2002).

Στην Ελλάδα η μεγαλύτερη παραγωγή οστρακοειδών, περίπου το 95% προέρχεται από το Θερμαϊκό κόλπο (νομοί Θεσσαλονίκης, Πιερίας, Ημαθίας) και το υπόλοιπο ποσοστό της παραγωγής συμπληρώνεται από τους νομούς Καβάλας, Φθιώτιδας, Λέσβου, Δυτικής Αττικής, Έβρου, Εύβοιας, Πρέβεζας, Ροδόπης και Χαλκιδικής (Υπουργείο Γεωργίας, 2000). Μεγάλα τμήματα των κόλπων αυτών εντάσσονται στις υγροτοπικές περιοχές που προστατεύονται από την εθνική/κοινοτική

νομοθεσία (NATURA 2000, Συνθήκη Ramsar).

Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία η ετήσια παραγωγή των οστρακοειδών στη χώρα μας κυμαίνεται στους 35.000-40.000 τόνους, με βασικό προϊόν τα μύδια, που προέρχονται κυρίως από καλλιέργειες και λιγότερο από αλιεία φυσικών αποθεμάτων. Η παραγωγή των υπόλοιπων οστρακοειδών (στρείδια, χτένια, αχιβάδες, κυδώνια κ.α.) δεν υπερβαίνει τους 200-400 τόνους και προέρχεται από αλίευση φυσικών αποθεμάτων. Από την παραγωγή αυτή το 90-95%, εξάγεται στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ενώ το υπόλοιπο 5-10% απορροφάται στην εγχώρια αγορά. Οι εισροές από τη συγκεκριμένη παραγωγική δραστηριότητα είναι της τάξης των 25 εκατομμυρίων ευρώ (Κυριαζή και Παπαδοπούλου, 2002).

Τα μύδια, κυρίως τα είδη *Mytilus edulis* και *Mytilus galloprovincialis*, εκτρέφονται σε πολλές περιοχές στον κόσμο (Εικ. 1) και στην Ελλάδα (Εικ. 2).



Εικ. 1. Με πορτοκαλί χρώμα εμφανίζονται οι κυριότερες χώρες παραγωγής του *Mytilus galloprovincialis* (FAO Fishery Statistics, 2002).



**Εικ. 2: Απεικόνιση των κυριότερων οστρακοκαλλιεργητικών / οστρακοαλιευτικών περιοχών της Ελλάδας (ΥΠ.Α.Α.Τ., 2005).**

## **1.2 ΜΥΔΙΑ**

Τα μύδια ανήκουν στη συνομοταξία των αρθροπόδων (*Arthropoda*), στην ομοταξία των μαλακίων (*Mollusca*), στην υποομοταξία των ελασματοβραγχίων και στην οικογένεια των μυτιλιδών (*Mytilidae*).

### **1.2.1. ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

#### **Κέλυφος-Μανδύας-Μύες**

Το κέλυφος τους αποτελείται από δύο θυρίδες πλευρικές, ίσες ή άνισες, που συνδέονται μεταξύ με μία συνδετική ταινία, τον ελαστικό σύνδεσμο. Ο ελαστικός σύνδεσμος είναι μία κεράτινη συνδετική ουσία που μπορεί να είναι εξωτερικός, εσωτερικός ή και τα δύο. Το κλείσιμο των θυρίδων ελέγχεται από δύο ισχυρούς μυς που λέγονται προσαγωγοί μύες, ένας πρόσθιος και ένας οπίσθιος που το αποτύπωμά τους μένει πάνω στις θυρίδες. Στο πάνω μέρος της μίας θυρίδας σχηματίζονται οδοντώσεις και στην άλλη θυρίδα οι αντίστοιχες γλυφές. Το μέρος αυτό ονομάζεται κλείθρο. Έχουν υποτυπώδες κεφάλι και δίλοβο μανδύα. Η εξωτερική επιφάνεια των μανδουακών λοβών προσκολλάται στην εσωτερική επιφάνεια των θυρίδων, όπου τα όρια των λοβών διαγράφονται με μία γραμμή που ονομάζεται μανδουακό αποτύπωμα. Ο μανδύας σχηματίζει δύο σίφωνες από όπου μπαίνει και βγαίνει το νερό. Ο μανδύας εκκρίνει ασβεστολιθικά στρώματα για το σχηματισμό του όστρακου (Λαζαρίδου, 1992).

## **Κινητικό σύστημα**

Το πόδι τους, είναι μία σαρκώδης μάζα σε σχήμα πέλεκυ, που χρησιμεύει για τη μετακίνηση του ζώου. Στα μύδια, το πόδι φέρει αδένες που εκκρίνουν στην αρχή μια γλοιώδη ουσία, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε ανθεκτικά νήματα που με τη βοήθεια τους προσκολλάται στα διάφορα στερεά αντικείμενα. Η δέσμη αυτή των νημάτων λέγεται βύσσος. Για να αποκολληθεί ένα μύδι από ένα στερεό αντικείμενο πρέπει να αποκοπεί η βύσσος. Χρειάζεται προσοχή επομένως στην αποκόλληση καθόσον είναι δυνατόν να τραυματιστεί το ζώο και να μη μπορεί να επιβιώσει πολύ μετά την αποκόλληση. Το μύδι όταν αποκολληθεί μπορεί εκ νέου να προσκολληθεί σε άλλο αντικείμενο με την έκκριση νέας βύσσου (Λαζαρίδου, 1992).

## **Αναπνευστικό Σύστημα**

Μεταξύ των μανδουακών λοβών υπάρχει ένα ζεύγος βραγχίων. Τα βράγχια έχουν φυλλοειδή, ελασματοειδή μορφή και είναι μεγάλα. Καθώς επιμηκύνονται αναδιπλώνονται και σχηματίζουν φυλλοειδή βράγχια, τα οποία σε κατά μήκος τομή έχουν σχήμα w (Λαζαρίδου, 1992).

## **Πεπτικό Σύστημα**

Ο πεπτικός σωλήνας περιλαμβάνει ένα μικρό οισοφάγο, το στομάχι και το έντερο το οποίο καταλήγει στην έδρα. Γύρω από τον οισοφάγο υπάρχει το ήπαρ το οποίο όπως και τα στρείδια υποβοηθά τη πέψη. Μετατρέπει σε σάκχαρο τις αμυλώδεις

ουσίες (Παπουτσόγλου, 1997).

Το στόμα τους, που δεν έχει όργανα μασήσεως και ζύστρου, περιβάλλεται από φυλλοειδείς κεραίες που πάλλονται και διευκολύνουν έτσι την είσοδο στην στοματική κοιλότητα του θαλάσσιου ύδατος που περιέχει θρεπτικές ουσίες. Η εσωτερική επιφάνεια του μανδύα η οποία καλύπτει τα βράγχια καλύπτεται από βλεφαρίδες οι οποίες κινούμενες δημιουργούν ένα γρήγορο ρεύμα νερού. Οι βλεφαρίδες χρησιμοποιούνται για την συλλογή τροφής σε ειδικές αύλακες απόπου με τη βοήθεια χειλικών προσακτριδών η τροφή οδηγείται στο στόμα. Τα πετρώδη και τα άλλα σωματίδια τα οποία εισέρχονται στον οργανισμό δεν είναι δυνατό να υποστούν πέψη, αποβάλλονται σε μικρές σφαιρικές μάζες δημιουργούμενες με την βοήθεια σιέλου (Λαζαρίδου, 1992).

### **Απεκκριτικό σύστημα**

Πάνω από το πόδι βρίσκεται ο σπλαχνικός σάκος μέσα στον οποίον υπάρχουν τα περισσότερα από τα σπλάχνα, ο πεπτικός σωλήνας, το ήπαρ, η καρδιά, οι νεφροί, τα γεννητικά όργανα, το νευρικό σύστημα. Όλα τα δίθυρα φέρουν ένα ζεύγος μετανεφριδίων των οποίων η απεκκριτική οπή βρίσκεται στη μανδουακή κοιλότητα. Το άλλο άκρο τους, το νεφροστόμιο βρίσκεται στη περικαρδιακή κοιλότητα. Είναι στενά συνδεδεμένα με το κυκλοφορικό σύστημα (Λαζαρίδου, 1992).

### **Κυκλοφορικό**

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

σπλαγχνική αρτηρία και αυτή στη συνέχεια μια ποδική. Αυτή φέρει βαλβίδα η οποία εμποδίζει την παλινδρόμηση του αίματος προς την καρδιά. Για την έκταση του ποδιού συμμετέχουν τόσο οι μύες όσο και το αίμα (Λαζαρίδου, 1992).

### **Νευρικό σύστημα**

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από τα εγκεφαλικά γάγγλια, που με νευρικά σχοινιά συνδέονται με τα ποδικά και τα σπλαγχνικά γάγγλια. Τα αισθητήρια όργανα είναι καλύτερα αναπτυγμένα στα ελεύθερα είδη. Τα οπτικοαισθητικά κύτταρα βρίσκονται στο άκρο του μανδύα και των σιφώνων (Λαζαρίδου, 1992).

### **Γεννητικό σύστημα**

Τα δίθυρα είναι γονοχωριστικά. Τα γεννητικά όργανα του αρσενικού και του θηλυκού βρίσκονται στις πλευρές του ήπατος ή περιβάλλουν το έντερο και σχηματίζουν δύο μεγάλους λοβούς (Seed, 1969). Έχουν ένα ζεύγος γονάδων που εκβάλουν σε δύο αγωγούς οι οποίοι είναι τελείως ανεξάρτητοι (Λαζαρίδου, 1992).

## **1.2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

### **Διατροφή**

Το μύδι είναι διηθηματοφάγος οργανισμός, τρέφεται με φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς σε διαστάσεις μικρότερους των 5μm, οι οποίοι διηθούνται από το θαλάσσιο νερό με τα βράγχια. Τα βράγχια για το λόγο αυτό είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένα εφόσον εκτελούν διπλό προορισμό, δηλαδή το βασικό της αναπνοής και

της σύλληψης της τροφής (Bardach *et al.*,1972).

Έχει υπολογιστεί ότι το μύδι είναι δυνατό να διηθήσει 2 έως 5 περίπου λίτρα νερό την ώρα. Ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για να περάσουν οι τροφές από το στόμα μέχρι την έδρα είναι 1 ώρα (Bardach *et al.*,1972).

Η διατροφή των μυδιών αποτελείται από μικροσκοπικά ζώα, φύκι και διάτομα. Από παρατηρήσεις έχει διαπιστωθεί ότι τα μύδια έχουν την ικανότητα να απορροφούν με ολόκληρη την επιφάνεια του μανδύα, των βραγχίων και των στοματικών λοβών διάφορες ουσίες οι οποίες μετασχηματίζονται για να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό (Bardach *et al.*,1972).

Τα μύδια θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες, για την μελέτη της ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος από διάφορες τοξικές ουσίες διότι είναι οργανισμοί που δεν μετακινούνται και έχουν την ικανότητα, φιλτράροντας τεράστιες ποσότητες θαλασσινού νερού, να βιοσυγκεντρώνουν τις τοξικές ουσίες που βρίσκονται ακόμη και σε ίχνη στο θαλάσσιο περιβάλλον (NAS, 1980).

## **Ανάπτυξη**

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυδιών είναι ο ευτροφισμός των νερών, η θερμοκρασία, η αλατότητα, ο βαθμός έκθεσης στον κυματισμό και η ποσότητα του φωτός. Το μύδι λόγω του ότι είναι ευρύαλο και ευρύθερμο, αρέσκεται και μπορεί να επιβιώσει σε μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών και αλατότητας, μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 10-26 °C με τη βέλτιστη ανάπτυξη να παρατηρείται σε τιμές μεταξύ 15-19 °C. Σε θερμοκρασίες κάτω από 5 °C το μύδι δεν μπορεί να τραφεί,



ενώ άνω των 28-30 °C πεθαίνει (Bayne *et al.*, 1973).

Το εύρος τιμών pH στο οποίο αυξάνεται χωρίς προβλήματα είναι 7,8- 8,3, ενώ σε όξινο περιβάλλον επιβραδύνεται η κίνηση των βραγχιακών βλεφαρίδων οι οποίες σταματούν εντελώς στην τιμή 5.

Η άριστη αλατότητα για την ανάπτυξη είναι 26‰ με όρια 18-30‰ (Bayne, 1973).

Άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη είναι το φώς και η έκθεση στον αέρα. Οι εκτροφές γίνονται σε μικρά βάθη της ευφωτικής ζώνης όπου η ηλιακή ακτινοβολία είναι υψηλή καθώς και η θερμοκρασία, συνθήκες που ευνοούν την πρωτογενή παραγωγή. Η ανάπτυξη της σάρκας ευνοείται στο ημίφως εκτός του οστράκου το οποίο αυξάνει σε πλήρη ηλιοφάνεια. Η έλλειψη φωτός είναι δυσμενής παράγοντας ανάπτυξης. Η συχνότητα του ανοίγματος και του κλεισίματος των θυρίδων επηρεάζεται και ακολουθεί την ένταση του φωτός το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο, αλλά και από την ποσότητα της τροφής που λαμβάνεται από το μύδι (Κριάρης, 1989). Ο υψηλός κυματισμός επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη του μυδιού από την άποψη ότι το μύδι σπαταλά ενέργεια για να κρατηθεί προσκολλημένο σε κάποιο υπόστρωμα, και έτσι αναπτύσσει ισχυρό όστρακο και βύσσο εις βάρος του σώματός του.

Σε ιδανικές συνθήκες το μήκος του ξεπερνάει τα 10-13 cm και όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές, το μήκος δεν ξεπερνά τα 2-3 cm ακόμη και σε ηλικία 15 ετών (Seed, 1976). Η αυξημένη συγκέντρωση ατόμων μυδιών είναι αιτία επιβράδυνσης της ανάπτυξης. Στις εκτροφές υπό την επίβλεψη και την φροντίδα του ανθρώπου είναι δυνατό εντός χρονικού διαστήματος 16-18 μηνών να φτάσουν το εμπορεύσιμο μήκος

των 7-8 cm (Bayne *et al.*, 1973).

### **Αναπαραγωγή**

Το θηλυκό άτομο απελευθερώνει από ένα έως οκτώ εκατομμύρια ωάρια των οποίων η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στο θαλάσσιο περιβάλλον από τα σπερματοζωάρια του αρρενος ατόμου. Τα αυγά είναι σφαιρικά με διάμετρο 70 μm περίπου. Στις πρώτες 20 μέρες οι εκκολαπτόμενες προνύμφες είναι πλαγκτονικές και στη συνέχεια προσκολλώνται με τη βοήθεια της βύσσου τους σε στερεές επιφάνειες.

Οι προνύμφες έχουν εξογκωμένη την κεφαλή με βλεφαρίδες, σχηματιζόμενου έτσι του καλούμενου ιστίου, πολύ χρήσιμου οργάνου για την ταχεία κολύμβηση. Κολυμπούν έως ότου βρουν υποστήριγμα πάνω στο οποίο θα προσκολληθούν. Το ιστίο χάνεται περίπου ένα μήνα μετά. Το όστρακο έχει ήδη σχηματιστεί και αρχίζει να αναπτύσσεται (Seed, 1969).

### **1.2.3 ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ**

#### ***Mytilus edulis***

Το μύδι *Mytilus edulis* έχει «τριγωνικό» σχήμα και στην εσωτερική του πλευρά εκβάλλει ένας μυώδης σάκος σαν σωλήνας, το πόδι . Το Ευρωπαϊκό μύδι (*Mytilus edulis*), κατανέμεται ευρέως στα ύδατα της Ευρώπης κυρίως λόγω των ικανοτήτων του να αντέχει σε μεγάλες διακυμάνσεις της αλατότητας, της θερμοκρασίας και του οξυγόνου. Η εκτροφή μυδιών εξαρτάται από τα φυσικά αποθέματα, λόγω της μεγάλης

αφθονίας. Ωστόσο έχει αναπτυχθεί και τεχνολογία με την οποία μπορεί να γίνει αναπαραγωγή των μυδιών και στο εκκολαπτήριο (FAO, 2002).

### ***Mytilus galloprovincialis***

Το μύδι *Mytilus galloprovincialis*, δεν διαφέρει σημαντικά από το *M. edulis*. Τα σημεία διαφοράς εμφανίζονται στο σχήμα και στο χρωματισμό του κελύφους ο οποίος είναι πιο σκούρος (μπλέ-μωβ). Έχει τα ίδια γνωρίσματα με το παραπάνω είδος. Εσωτερικά το όστρακο είναι μαύρο γυαλιστερό με ζοηρές μπλε γραμμές. Το εσωτερικό του όστρακου έχει χρώμα κίτρινο (FAO, 2002). Το *Mytilus galloprovincialis* απαντάται σε ηπειρωτικά κλίματα αλλά σε πιο θερμά νερά. Στην Ευρώπη απαντάται στις νήσους της Βρετανίας, στην Ιβηρική Χερσόνησο και στη Μεσόγειο. Στο βόρειο ημισφαίριο απαντάται στην νότια Καλιφόρνια, Ιαπωνία, Χόνγκ Κόνγκ και κατά μήκος της ανατολικής ακτής της Κίνας. Στο νότιο ημισφαίριο απαντάται στην δυτική Αυστραλία, Τασμανία, Ν. Ζηλανδία και Ν. Αφρική (Spencer, 2002). Στην Ελλάδα, συναντάται κυρίως στην Αλεξανδρούπολη, στον Αμβρακικό, στο Πόρτο-Λάγος, στον Μαλιακό, στον Σαρωνικό και στον Στρυμονικό και κυρίως στους Κόλπους της Θεσσαλονίκης και του Θερμαϊκού (FAO, 2002).

### ***Modiolus barbatus***

Ονομάζεται Χάβαρο ή ξανθό μύδι ή Μούσουλο. Το όστρακο του έχει χρώμα καφετί ή κοκκινωπό και επιδερμίδα τριχωτή (FAO, 2002).



**Εικ.3 Το Μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis*. Αριστερά, εξωτερική όψη της δεξιάς θυρίδας, δεξιά, εσωτερική όψη δεξιάς θυρίδας.**

### ***Volsella modiolus***

Ονομάζεται Μύδι άλογο. Απαντά στο ΒΑ Ατλαντικό. Έχει μήκος 5-15cm, χρώμα σκοτεινό γκριζόμαυρο, με ορισμένα μαύρα τμήματα κατά θέσεις (FAO, 2002).

### ***Volsella demissa***

Ονομάζεται Ραβδωτό μύδι. Απαντά στον Ατλαντικό και τον Καναδά μέχρι το Τέξας (FAO, 2002).

### ***Dreissensia polymorpha***

Είναι μύδι του γλυκού νερού. Έχει τριγωνικό σχήμα και καστανό χρώμα με

πράσινες κηλίδες. Ζει στους λασπώδεις βυθούς των ποταμών και των λιμνών. Το κρέας του δεν είναι βρώσιμο (FAO, 2002).

***Mytilus californicus***

Υπάρχει στις ακτές του Ειρηνικού Ωκεανού των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (FAO, 2002).

## Κεφάλαιο 2

### 2.1 ΤΟ ΜΥΔΙ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ

Τα μύδια είναι πλήρης θρεπτική και εύγεστη τροφή. Περιέχουν πολύτιμα συστατικά απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη του ανθρώπου. Έχουν μικρότερη θρεπτική αξία από τα στρείδια.

Η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, λίπη, άλατα ασβεστίου, ιωδίου, φωσφόρου και σιδήρου είναι σημαντική καθώς επίσης και σε βιταμίνες Α, Β και C. Αναλυτικότερα η σύστασή τους έχει ως κάτωθι: νερό 82%, αζωτούχες ουσίες 11,5%, λιπαρές ουσίες 1,25%, μη αζωτούχες ουσίες 4,04%, άλατα 1,3%. Τα 100 γραμμάρια σάρκας μυδιού αποδίδουν 72 θερμίδες.

Είναι ένα εξαιρετικό έδεσμα, παρασκευαζόμενα και προσφερόμενα στο εμπόριο υπό διάφορες μορφές που μπορούν παράλληλα να μαγειρευτούν με ποικίλους τρόπους (Walne, 1974).

Τα μύδια που έχουν μέγεθος μικρότερο του εμπορεύσιμου τα χρησιμοποιούν για τη παρασκευή ζωοτροφών καλής ποιότητας εξαιτίας της άφθονης περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες και ασβέστιο. Επίσης στην Αμερική χρησιμοποιούν την ύλη της εκτροφής μυδιών ως λίπασμα (Walne, 1974).

### 2.2 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΟΣΤΡΑΚΟΕΙΔΩΝ

Εξαιτίας του τρόπου θρέψης τους, που χαρακτηρίζεται από επιλεκτική

τροφοληψία τα μύδια αλλά και τα οστρακοειδή γενικότερα μπορούν, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, να αποτελέσουν τροφικό κίνδυνο καθώς είναι δυνατόν να γίνουν φορείς διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και τοξικών ουσιών, επικίνδυνων για την υγεία των καταναλωτών, που βρίσκονται συσσωρευμένοι στη σάρκα τους (Παπαναστασίου,1990;Sidari *et al.*, 1998).

Ως «τροφικός κίνδυνος» σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ, ορίστηκε κάθε βιολογικός, χημικός, ή φυσικός παράγοντας ενός τροφίμου, η κατανάλωση του οποίου μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή (FAO,1998). Η πρόσληψη των παραπάνω ουσιών στα ίδια τα οστρακοειδή συνήθως δεν προκαλεί κανένα κλινικό σύμπτωμα, αντίθετα η ανάπτυξη τους συνεχίζεται κανονικά και η μακροσκοπική τους εικόνα δε μαρτυρά την ύπαρξη αυτών των ουσιών στη σάρκα τους, οπότε χωρίς την παρουσία κατάλληλων ελεγκτικών μηχανισμών τα παραπάνω οστρακοειδή θα διοχετεύονταν στην κατανάλωση, απειλώντας τη Δημόσια Υγεία (FAO, 1998).

Εκτός όμως από το βιότοπο και τις επικρατούσες συνθήκες υγιεινής κατά την αλίευση των οστρακοειδών, είναι δυνατόν αυτά να μολυνθούν και κατά τη διακίνηση ή τη μεταποίησή τους, από μολυσμένα δοχεία, σκεύη ή μηχανήματα επεξεργασίας, ή όταν το προσωπικό που έρχεται σε επαφή με τα οστρακοειδή δεν τηρεί σχολαστικά τους απαραίτητους κανόνες υγιεινής.

Οι εγκεκριμένοι τρόποι με τους οποίους είναι δυνατόν να διακινηθούν τα οστρακοειδή είναι οι ακόλουθοι:

- 1) Ζωντανά (σε δικτυωτούς σάκους των 5, 10 ή και 25 kg)

- 2) Νωπά -αποκελυφωμένα μέσα σε πλαστικούς περιέκτες με ποσότητα πόσιμου νερού σε αναλογία 1:1. Η απομάκρυνση του κελύφους συνήθως γίνεται με τα χέρια και γι' αυτό είναι απαραίτητο να εξασφαλίζονται υψηλά επίπεδα υγιεινής τόσο στα χρησιμοποιούμενα μαχαιρίδια, όσο και στο προσωπικό (Αρβανιτογιάννης et al., 2001; Vasakou et al., 2002). Σήμερα με βάση στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων λειτουργούν στη χώρα μας 33 εγκεκριμένα αποκελυφωτήρια οστρακοειδών.
- 3) Κατεψυγμένα σε θερμοκρασία μικρότερη των  $-18^{\circ}\text{C}$ .
- 4) Κονσερβοποιημένα
- 5) Αφυδατωμένα (Στην Άπω Ανατολή).

Τα οστρακοειδή, είτε πωλούνται ως έχουν (με το κέλυφος), είτε μεταποιημένα, έχοντας δηλαδή δεχθεί τροποποίηση της αρχικής μορφής τους με τη βοήθεια της θερμικής επεξεργασίας, του καπνίσματος, του αλατίσματος, της ωρίμανσης, της αποξήρανσης, του μαριναρίσματος, ή συνδυασμού αυτών των μεθόδων, δεν υποβάλλονται σε πολύωρη θερμική επεξεργασία, γεγονός που βοηθά στην εκδήλωση, τροφιμογενών λοιμώξεων μετά την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο (Σαρρής και συν., 1986).

Στην Ελλάδα αν και η ετήσια εσωτερική κατανάλωση δίθυρων μαλακίων παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια προοδευτική αύξηση που οφείλεται τόσο στην εφαρμογή καλύτερων συνθηκών υγιεινής της παραγωγής τους, όσο και στην εξοικείωση του πληθυσμού της χώρας μας στην κατανάλωση αυτών, ωμά οστρακοειδή πολύ σπάνια προτιμώνται με εξαίρεση τα λιγοστά στρείδια, τα κυδώνια και τις



γυαλιστερές (Σαρρής και συν., 1986).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κυριότερα νοσήματα που σχετίζονται με τη κατανάλωση οστρακοειδών.

### **Χολέρα**

Προκαλείται από τα δονάκια (βακτήρια καμπυλοειδούς μορφής) *Vibrio cholerae* O1 και O139 τα οποία είναι υπεύθυνα για την ασιατική ή επιδημική χολέρα, νόσημα ισχυρά διαρροϊκό. Αν και η νόσος είναι γνωστή εδώ και εκατοντάδες χρόνια, σήμερα η εμφάνιση της είναι σπάνια στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, σε αντίθεση με τις (υπό)- τροπικές περιοχές της Αφρικής, Ασίας και νότιας Αμερικής (Pruzzo et al., 2005).

Η χολέρα συνδέεται με την πόση μολυσμένου νερού ή την κατανάλωση ωμών οστρακοειδών που διαβιούν σε μολυσμένα ύδατα. Τα δονάκια προσκολλώνται στα κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου, όπου πολλαπλασιάζονται, χωρίς να προκαλούν τοπική φλεγμονή. Κατά τον πολλαπλασιασμό τους όμως παράγουν εξωτοξίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για το διαρροϊκό σύνδρομο (Αρσένη, 1994).

Η επώαση της νόσου διαρκεί 12-24 ώρες και στη συνέχεια ακολουθεί απότομη

έναρξη υδαρούς με πόνο διάρροιας, κοιλιακοί μυϊκοί σπασμοί, ναυτία, ακατάσχετος εμετός, και πυρετός. Περίπου 25% των μολυσμένων ατόμων εμφανίζει αίμα και βλέννα στα κόπρανα. Η διάρροια μπορεί, σε μερικές περιπτώσεις, να είναι αρκετά οξεία και να διαρκέσει 6-7 ημέρες, προκαλώντας σοβαρή αφυδάτωση στον ασθενή, με πτώση της αρτηριακής πίεσης, ταχύ και νηματοειδή σφυγμό, οπότε η εισαγωγή του στο νοσοκομείο κρίνεται απαραίτητη (FDA,2006).

Από το 1978 έως το 1987 καταγράφηκαν στις Η.Π.Α. 120 περιστατικά χολέρας οφειλόμενα στο *Vibrio cholerae* O1, μετά από κατανάλωση ωμών στρειδιών (Ahmed, 1991).

### **Λοιμώδης γαστρεντερίτιδα**

Μπορεί να προκληθεί από περισσότερους του ενός παθογόνους μικροοργανισμούς όπως π.χ. *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Staphylococcus aureus* κ.λ.π. (Hervio et al., 2005).

Στην περίπτωση που ο υπεύθυνος μικροοργανισμός είναι κάποιο βακτήριο του γένους *Salmonella*, η νόσος που προκαλείται ονομάζεται Σαλμονέλλωση. Οι πιο γνωστοί, υπεύθυνοι για τη νόσο ορότυποι που προσβάλλουν τον άνθρωπο, είναι η *Salmonella* Enteritidis και η *Salmonella* Typhi. Αν και η ανθεκτικότητα των βακτηρίων αυτών στο περιβάλλον είναι μεγάλη, τα περισσότερα κρούσματα από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων θα μπορούσαν να αποφευχθούν, αν υπόκειντο τα τρόφιμα αυτά

σε βρασμό 80 °C για 10 λεπτά, κάτι που δεν εφαρμόζεται στην περίπτωση των οστρακοειδών .(Hervio *et al.*, 2005).

Σε μελέτη που έγινε στο Μικροβιολογικό τμήμα του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, κατά τη διάρκεια των ετών 1990, 1991 και 1992 όλα τα δείγματα των οστρακοειδών βρέθηκαν αρνητικά στη *Salmonella* spp, σε 25g σάρκας, όπως ακριβώς ορίζει και η νομοθεσία (Αναγνωστόπουλος, 1999).

Στην περίπτωση της λοιμώδους γαστρεντερίτιδας από κολοβακτηρίδια, ο υπεύθυνος μικροοργανισμός είναι η *Escherichia coli*, η οποία βρίσκεται φυσιολογικά στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων, από όπου αποβάλλεται με τα κόπρανα, διασπείρεται στο περιβάλλον (έδαφος, φυτά, νερά) μολύνοντας τα τρόφιμα (Dontorou *et al.*, 2003).

Η *Escherichia coli* αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης του νερού, η δε απομόνωσή της σε μεγάλο αριθμό από δείγματα αυτού, υποδηλώνει ότι καταλήγουν στο νερό κοπρανώδη υπολείμματα, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας για την προστασία της Δημόσιας Υγείας (Σαρρής και συν., 1986).

Η νόσος εκδηλώνεται μετά από μια περίοδο επώασης 2-4 ημερών με γαστροεντερίτιδα, συνοδευόμενη από έντονη διάρροια, μερικές φορές αιμορραγική και αφυδάτωση, η οποία όμως μπορεί να εξελιχθεί σε σηψαιμία. Η διάρροια είναι αποτέλεσμα του έντονου πολλαπλασιασμού του βακτηρίου στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης ποσότητας εντεροτοξίνης, η οποία επιδρά τοπικά στα επιθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας υπερρέκριση υγρών, αυξημένη περισταλτική κίνηση και διάρροια (Αρσένη, 1994).

Ορισμένα μικρόβια όπως π.χ. ο *Staphylococcus aureus* δρουν με προσχηματισμένες τοξίνες. Ο άνθρωπος με τη κατανάλωση της μολυσμένης τροφής παρουσιάζει οξεία γαστρεντερίτιδα από την εξωτοξίνη και όχι από το ίδιο το μικρόβιο. Η σοβαρότητα της γαστρεντερίτιδας εξαρτάται από την ποσότητα της τοξίνης που περιείχε η μολυσμένη τροφή. Η νόσος αρχίζει 2-6 ώρες μετά από τη βρώση της μολυσμένης τροφής με εμέτους και διάρροιες, χωρίς πυρετό. Διαρκεί 1-2 μέρες και συνήθως αυτοιάται (Αρσένη, 1994).

Πολύ σημαντικά για τη δημόσια υγεία από την κατανάλωση οστρακοειδών είναι τα δονάκια και ιδιαίτερα το *Vibrio parahaemolyticus*, το οποίο περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω (Αρσένη, 1994).

### **Λοιμώδης Ηπατίτιδα Α (HAV)**

Οφείλεται σε ιό της οικογένειας *Picornaviridae*, γένους *hepatovirus*. Είναι συχνή σε περιοχές με έλλειψη ή κακή ποιότητα αποχετευτικών συστημάτων (αναπτυσσόμενες χώρες) (Ραφαηλαίου, 1992).

Ο ιός μεταδίδεται μέσω χειρών που μολυσμένων με κόπρανα, μολυσμένο νερό ή τροφές. Τα οστρακοειδή, είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα στη μετάδοση της νόσου επειδή έχουν συγκεντρώσεις ιού HAV 100 φορές μεγαλύτερες από το νερό του ενδοναυτικού τους και συνήθως μαγειρεύονται σε θερμοκρασίες χαμηλές (γύρω στους 70 °C), για σύντομο χρονικό διάστημα, ενίοτε μέχρι τη διάνοιξη του κελύφους, κάτι το οποίο γίνεται σε λιγότερο από 2 λεπτά, χωρίς όμως να είναι έτσι δυνατόν να γίνει πλήρης

αδρανοποίηση του ιού HAV. Η αδρανοποίηση του ιού επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 85 °C για 6 λεπτά (Sanchez *et al.*, 2004), ενώ η εξυγίανση των οστρακοειδών μειώνει, αλλά δεν εξαλείφει τον ιό HAV (Koff, 1992).

Τα κύρια κλινικά συμπτώματα, τα οποία εμφανίζονται 10-15 ημέρες μετά τη μόλυνση είναι: έντονη αδυναμία, καταβολή, ανορεξία, ναυτία, έμετοι, μυαλγίες, αίσθημα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο, αρθραλγίες, πυρετός και κίτρινη χροιά στους βλεννογόνους (ίκτερος). Η θνησιμότητα συνήθως είναι πολύ μικρή, εξαρτάται δε από την ηλικία των ασθενών (Koff, 1992).

### **Τοξίνωση από θαλάσσιες βιοτοξίνες**

Είναι οι σημαντικότερες από άποψη κινδύνου τροφοτοξινώσεις, που προκύπτουν μετά από βρώση μολυσμένων οστρακοειδών, με παγκόσμια εξάπλωση. Οι θαλάσσιες βιοτοξίνες αποτελούν ουσίες που παράγονται από διάφορα μικροφύκη και μέσω της κατανάλωσης οστρακοειδών καταλήγουν στον άνθρωπο, στον οποίο ανάλογα με την ευαισθησία του αλλά και τη συγκέντρωσή τους προκαλούνσοβαρά προβλήματα υγείας, κυρίως γαστρεντερικού και νευρολογικού χαρακτήρα ή ακόμη και θάνατο (Νικολαΐδης, 1999).

Από τα 5.000 είδη φυτοπλαγκτού που υπάρχουν στις διάφορες θάλασσες παγκοσμίως, 300 έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν πληθυσμιακές εξάρσεις με αποτέλεσμα τον εμφανή χρωματισμό των επιφανειακών θαλάσσιων υδάτων. Οι πιο συνήθεις αποχρώσεις είναι η καφέ και η καφεκόκκινη. Από τα 300 είδη που εμφανίζουν πληθυσμιακές εξάρσεις, τα 80 περίπου έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, οι

οποίες είναι δυνατόν να καταλήξουν στον άνθρωπο με τη βρώση των οστρακοειδών (Νικολαΐδης, 1999).

Η πρώτη αναφορά γαστρεντερικών διαταραχών με διάρροια στον άνθρωπο μετά από κατανάλωση μυδιών, που είχαν τραφεί με τοξικά δινομαστιγωτά καταγράφεται στην Ιαπωνία το 1976, με υπεύθυνο μικροφύκος το *Dinophysis fortii*, προκαλώντας σημαντικά προβλήματα στην καλλιέργεια των οστρακοειδών (Yasumoto et al., 1978). Στη συνέχεια ανάλογα περιστατικά εμφανίστηκαν και σε άλλες περιοχές, όπως π.χ. στην Ευρώπη με αίτιο *Dinophysis acuminata* (Kumagai et al., 1986). Από το 1976 έως το 1983 καταγράφηκαν 1.300 περιστατικά στην Ιαπωνία, 5.000 στην Ισπανία και 3.300 στη Γαλλία (Baden et al., 1995).

Στη χώρα μας το 2000, συνολικά 120 άτομα, διαφόρων ηλικιών, παρουσίασαν συμπτώματα από το γαστρεντερικό και εισήχθησαν στο νοσοκομείο μετά από κατανάλωση οστρακοειδών (Economidou et al., 2007), την περίοδο που παρουσιάστηκε στο Θερμαϊκό κόλπο πληθυσμιακή έκρηξη τοξικών μικροφυκών *Dinophysis acuminata*, (Nikolaidis et al., 2005). Το γεγονός αυτό οδήγησε τις αρμόδιες αρχές να αναστείλουν τη διακίνηση των οστρακοειδών της περιοχής για χρονικό διάστημα περίπου πέντε μηνών (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2001). Από την περίοδο εκείνη και μετά, τοξίνες διαρροϊκού τύπου εμφανίζονται τόσο στο Θερμαϊκό κόλπο, όσο και στις άλλες περιοχές όπου υπάρχει οστρακοαλιευτική ή/και οστρακοκαλλιεργητική δραστηριότητα.

Τα συμπτώματα, στον καταναλωτή μετά τη βρώση οστρακοειδών μολυσμένων με τοξίνη, είναι γαστρεντερικά και εμφανίζονται μέσα σε 30 λεπτά έως λίγες ώρες μετά την κατανάλωση αυτών. Η κλινική εικόνα του ασθενούς χαρακτηρίζεται από οξεία

διάρροια, ναυτία, εμετούς, υπερβολική έκκριση σιέλου, κοιλιακούς σπασμούς με έντονο πόνο, ρίγη και πυρετό( Hallegraef, 2003).

- *Παραλυτική δηλητηρίαση από οστρακοειδή* - Paralytic Shellfish Poisoning (PSP).

Οι υπεύθυνες τοξίνες για την πρόκληση του συνδρόμου αυτού είναι περίπου είκοσι, ανάλογα δε με την τοξικότητά τους μπορούν να χωρισθούν σε τρεις κατηγορίες: α) ισχυρής τοξικότητας β) ενδιάμεσης τοξικότητας και γ) χαμηλής τοξικότητας.

Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι η σαξιτοξίνη (STX) και οι νέο-σαξιτοξίνες οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές, θερμοάντοχες και αδιάλυτες στα περισσότερα οξέα (Halsteand 2002). Από το δινομαστιγωτό *Gonyalax catenella* απομονώθηκε αρχικά μια τοξίνη υδατοδιαλυτή και σταθερή σε όξινα διαλύματα που ταυτίστηκε με τη σαξιτοξίνη, η οποία είχε προηγουμένα απομονωθεί από δίθυρα μαλάκια στην Αλάσκα (Halsteand, 2002).

Σχετικά με την εξάπλωση της δηλητηρίασεως αυτής, ενώ τη δεκαετία του 1970 τα κρούσματα περιορίζονταν μόνο σε Ιαπωνία, Βόρεια Αμερική και Ευρώπη, το 2000 εμφανίστηκαν και στο νότιο ημισφαίριο, στη νότια Αφρική, Αυστραλία (*Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*) Νέα Ζηλανδία, Ταϊλάνδη και Φιλιππίνες (Hallegraef, 2003).

Η σαξιτοξίνη και οι παρόμοιου τύπου τοξίνες επιδρούν επί του κεντρικού νευρικού συστήματος προκαλώντας σπασμούς, αλλά και επί του αναπνευστικού συστήματος, με αποτέλεσμα αρχικά δυσκολία στην αναπνοή, η οποία μπορεί να επιδεινωθεί στη συνέχεια .

Ο άνθρωπος, τα ανώτερα θηλαστικά και επίσης τα πουλιά και τα ψάρια

μπορούν να δηλητηριαστούν από τις τοξίνες αυτού του τύπου. Ιδιαίτερα ο άνθρωπος είναι πολύ ευαίσθητος στις παραλυτικού τύπου βιοτοξίνες, αφού δόση σαξιτοξίνης ίση με 1-4mg/kg σωματικού βάρους μπορεί να προκαλέσει το θάνατο, ανάλογα με την ηλικία και τη φυσική του κατάσταση (Baden *et al.*, 1995).

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται στην παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών, αρχίζουν σε 30 λεπτά μετά την κατανάλωση των μολυσμένων οστρακοειδών και μοιάζουν με εκείνα που εμφανίζονται μετά τη χρήση τοπικών αναισθητικών (μούδιασμα) με τη διαφορά ότι η παραλυτική τοξίνη είναι πολύ πιο δραστική από τα συνήθη αναισθητικά (Hallegraef, 2003).

Χαρακτηριστική είναι η αίσθηση καύσου στα χείλη που εμφανίζεται ταχύτατα, το μούδιασμα των άκρων, η σταδιακή αδυναμία και η ζάλη. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις επέρχεται παράλυση των αναπνευστικών μυών που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο από ασφυξία (Hallegraef, 2003).

Μετά από 30 λεπτά έως λίγες ώρες παρουσιάζεται διάρροια, ναυτία, έμετος, και πόνος στην κοιλιακή χώρα. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις επέρχεται παράλυση των αναπνευστικών μυών, που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο από

Στη Γαλλία οι πρώτες περιπτώσεις αναφέρονται τα έτη 1988 και 1989. Στην Ιαπωνία σημειώθηκαν το 1976 τα πρώτα κρούσματα από τοξίνες παραλυτικού τύπου σε καταναλωτές οστρακοειδών, με συμπτώματα όπως μούδιασμα των άκρων, αδυναμία, ίλιγγοι και παραισθήσεις, στις δε σοβαρότερες περιπτώσεις δυσπεψία και αναπνευστική δυσχέρεια λόγω παράλυσης των αναπνευστικών μυών, καθώς και θάνατος από ασφυξία (Ono, 1996).



- *Αμνησιακή δηλητηρίαση από οστρακοειδή*- Amnesic Shellfish Poisoning (ASP).

Πρόκειται για μία νέου τύπου δηλητηρίαση που προκαλείται από τα οστρακοειδή, αφού αναφέρεται για πρώτη φορά μόλις το 1987, στο Prince Edward Island του Καναδά, όπου 105 άτομα προσβλήθηκαν από αυτή, τρία εκ των οποίων κατέληξαν, μετά από κατανάλωση οστρακοειδών (Hallegraef et al., 2003), ενώ το 1991 στην Καλιφόρνια πελεκάνοι και κορμοράνοι πέθαναν, μετά από κατανάλωση αντσούγιων (Backer et al., 2003).

Η υπεύθυνη τοξίνη για την εμφάνιση της δηλητηρίασεως αυτής είναι το δομοϊκό οξύ που απομονώθηκε στην Ιαπωνία από το ροδοφύκος *Chondria armata domoi* (Quilliam, 2003). Ανήκει σε μια ομάδα αμινοξέων που ονομάζονται νευροδιεγερτικές ουσίες επειδή παρεμβάλλονται στους νευροδιαβιβαστικούς μηχανισμούς του εγκεφάλου, δρώντας ως γλουταμινικοί ανταγωνιστές (Fernandez, 2003).

Επειδή η απορρόφηση της τοξίνης γίνεται με αργό ρυθμό τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται μετά από 3 έως 5 ώρες από την κατανάλωση των μολυσμένων οστρακοειδών. Τα συμπτώματα αυτά είναι ναυτία, εμετός, κοιλιακοί σπασμοί και διάρροια. Η θνησιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό 3%, των περιστατικών (Ifremer, 2003).

### **Τοξίκωση από χημικούς ρυπαντές**

Σε ότι αφορά την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων από τη βρώση οστρακοειδών, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η συνεργιστική δράση αυτών, η βιοσυσσώρευση και η επικινδυνότητα για τον καταναλωτή, που είναι δυνατόν να απορρέει από τα θαλάσσια αυτά προϊόντα (Eto, 1977).

Το 1952, τα πρώτα κρούσματα της δηλητηρίασης από υδράργυρο εμφανίστηκαν στον πληθυσμό του κόλπου Minimata στην Ιαπωνία, όταν τα απόβλητα ενός εργοστασίου παραγωγής ακεταλδεΐδης που περιείχαν Hg, διοχετεύονταν ακατέργαστα στον κόλπο, με αποτέλεσμα στο σημείο που χύνονταν να βρεθούν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις Hg (Eto, 1977).

Ο υδράργυρος αυτός μέσω της τροφικής αλυσίδας (πλαγκτόν-ψάρια-άνθρωπος) συσσωρεύονταν σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, έως ότου εκδηλώθηκε μια αρρώστια γνωστή ως ασθένεια Minimata, με συμπτώματα σοβαρές νευρολογικές παθήσεις, σωματικές και διανοητικές βλάβες στους ενήλικες, καθώς και μεταβολές στην κανονική ανάπτυξη του εγκεφάλου των βρεφών (Eto, 1977).

Τα οστρακοειδή είναι πιο επικίνδυνα από τα ψάρια, διότι συσσωρεύουν τις τοξικές ουσίες στο εδώδιμο μέρος τους σε αντίθεση με τα ψάρια που τις συσσωρεύουν κατά κύριο λόγο στους ιστούς, οι οποίοι δεν καταναλώνονται από τον άνθρωπο, όπως είναι το ήπαρ. Υπολογίζεται ότι περίπου 2.000 άτομα εμφάνισαν την ασθένεια αυτή, ενώ σημειώθηκαν και 780 θάνατοι (Eto, 1977).

Η μετάδοση στον καταναλωτή κατάλοιπων γεωργικών φαρμάκων- που είναι δυνατόν να υπάρχουν στα οστρακοειδή, όταν οι ουσίες αυτές καταλήγουν στο νερό του ενδιαιτήματός τους, μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιπλοκές στην υγεία του καταναλωτή με σημαντικότερες τη διόγκωση και νέκρωση του ήπατος, τη δημιουργία νεοπλασιών, ή την παράλυση του νευρικού συστήματος.

Επίσης η πρόσληψη πετρελαϊκών υδρογονανθράκων μέσω της βρώσης οστρακοειδών, μπορεί να γίνει αιτία για την εμφάνιση σε αυτόν δυσάρεστων

καταστάσεων, όπως τη συσσώρευσή τους στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και ιδιαίτερα στο σπλήνα, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λειτουργίας του, την απορρόφησή τους από το έντερο και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ ενοχοποιούνται και για την πρόκληση διαφόρων μορφών καρκίνου (Eto, 1977).

### **2.3 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ *Vibrio parahaemolyticus* ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ**

Το γένος *Vibrio* αποτελείται από 30 είδη από τα οποία τα 13 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Στα είδη αυτά ανήκουν το *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. furnissii*, *V. damsella*, *V. metshnikovii*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*. Όλα τα παθογόνα είδη *Vibrio* αποτελούν αίτιο πρόκλησης τροφογενούς διάρροιας. Ωστόσο τα είδη *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* αποτελούν το πιο συχνό αίτιο δηλητηριάσεων και προκαλούν έντονα κλινικά συμπτώματα στον άνθρωπο. (Drake *et al.*, 2007).

Το *V. parahaemolyticus* είναι αλόφιλο βακτήριο Gram (-) και έχει σχήμα ευθείας ή καμπυλοειδούς ράβδου. Έχει ένα πολικό μαστίγιο και αναπτύσσει αυξημένη κινητικότητα όταν αναπτύσσεται σε υγρό μέσο. Είναι μικροοργανισμός προαιρετικά αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος. Βρίσκεται σε υδάτινα οικοσυστήματα σε όλη την υφήλιο (Drake *et al.* 2007). Έχει απομονωθεί από ποικιλία θαλασσινών όπως βακαλάος, σκουμπρί, σαρδέλα καρκάνι, μύδια, χταπόδι, γαρίδες, καβούρια, αστακοί, караβίδες, χτένια και στρείδια και μύδια. Η κατανάλωση ακατέργαστων ή μαγειρεμένων μολυσμένων θαλασσινών και ιδιαίτερα οστρακοειδών μπορεί να

οδηγήσει στην πρόκληση οξείας γαστρεντερίτιδας η οποία χαρακτηρίζεται από διάρροια, πονοκέφαλος, έμετος, ναυτία, κοιλιακές κράμπες και χαμηλό πυρετό. Το δονάκιο εκτός του ότι έχει αναγνωριστεί ως η κύρια αιτία πρόκλησης γαστρεντερίτιδας η οποία σχετίζεται με την κατανάλωση θαλασσινών στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής αποτελεί και ένα σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς που μεταδίδονται με τα θαλασσινά προϊόντα σε ολόκληρο τον κόσμο (Kaysner and De Paola, 2001).

Η μετάδοση του *V. parahaemolyticus* στο θαλάσσιο περιβάλλον συσχετίζεται με τη θερμοκρασία του νερού. Σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει αναφερθεί πως είναι σπάνια η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μικρότερη των 15°C. Σε μελέτη που έγινε στο Chesapeake Bay του Maryland αποδείχθηκε ότι το δονάκιο επιζεί στα ιζήματα του νερού κατά την διάρκεια του χειμώνα και απελευθερώνεται στο νερό όταν η θερμοκρασία αυξηθεί πάνω από τους 14°C, στα τέλη της άνοιξης και στις αρχές του καλοκαιριού (Drake *et al.*, 2007). Σε μία άλλη έρευνα που διεξήχθητε μεταξύ 1984-1985 σε εννέα παράκτια κράτη των ΗΠΑ διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού στο νερό παρέμενε μειωμένη (4 κύτταρα / 100 ml) όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν 16 °C. Όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 25 °C η πυκνότητα του παθογόνου στο νερό αυξήθηκε σε 1000 κύτταρα /100 ml (DePaola *et al.* 1990). Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Oregon σε εκτροφές στρειδιών μεταξύ Νοέμβρη 2002-Οκτώβρη 2003 διαπιστώθηκε επίσης η συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας περιβάλλοντος και της ανάπτυξης του παθογόνου. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης

παρουσιάστηκε τους καλοκαιρινούς μήνες (Duan and Su ,2005).

### **Συνθήκες ανάπτυξης**

Το *V. parahaemolyticus* είναι αλόφιλος μικροοργανισμός. Στο περιβάλλον η απαραίτητη περιεκτικότητα του ύδατος σε NaCl για την επιβίωση του είναι 1-8% ενώ η άριστη συγκέντρωση NaCl για την ανάπτυξη του είναι 2-4 %. Δε επιζεί σε αποσταγμένο νερό (Yang *et al.*, 2008).

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου είναι 30-35 °C. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 44 °C και η ελάχιστη είναι 5 °C. Στα τρόφιμα έχει ανιχνευτεί η ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* σε θερμοκρασία 9,5-10 °C Μεταξύ 5-9 °C ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε κατάλληλες συνθήκες pH και περιεκτικότητας NaCl (Yang *et al.*, 2008).

Το *V. parahaemolyticus* έχει άριστο pH ανάπτυξης 7,5-8,6 και η ελάχιστη τιμή pH στην οποία αναπτύσσεται είναι 4,8-11,0. Ο μικρότερος βαθμός ανάπτυξης παρατηρείται σε pH 4,8 όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 30 °C και η περιεκτικότητα σε NaCl είναι 3% (Yang *et al.*, 2008).

Η ελάχιστη τιμή  $a_w$  για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* είναι 0,94, ενώ η άριστη τιμή  $a_w$  είναι 0,992 (Yang *et al.*, 2008).

### **Παθογένεια**

Η διάκριση του μικροοργανισμού σε ορότυπους γίνεται με βάση τα σωματικά (O) και πολυσακχαριδικά αντιγόνα της εξωτερικής κυτταρικής κάψας (K). Μέχρι

σήμερα έχουν περιγραφεί 76 ορότυποι του *V. parahaemolyticus* (Drake *et al.*, 2007). Τα τελευταία χρόνια η διάκριση των οροτύπων του παθογόνου γίνεται με βάση την παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων μερικά από τα οποία συσχετίζονται με την παθογένεια του βακτηρίου (Drake *et al.*, 2007). Οι ορότυποι των παθογόνων στελεχών που έχουν καταγραφεί από τα περισσότερα κρούσματα δηλητηριάσεων στην Αφρική, Ασία και Αμερική είναι το O3:K6 και τα παράγωγα του O4:K68, O1:K25, O1:KUT (Nair *et al.*, 2007).

Τα περισσότερα είδη *V. parahaemolyticus* που απομονώνονται από το φυσικό περιβάλλον ή τα θαλάσσια προϊόντα δεν είναι παθογόνα. (Nichibuchi and Kaper 1995; FDA, 2005). Τα είδη που προκαλούν κλινικά συμπτώματα διαφοροποιούνται από τα άλλα, από την ικανότητα τους να παράγουν μία θερμοανθεκτική αιμολυσίνη (thermostable direct hemolysin - TDH) που μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ Wagatsuma. Η αιμολυτική δράση της TDH ονομάζεται φαινόμενο Kanagawa (Kanagawa phenomenon – KP) και τα στελέχη που παράγουν την τοξίνη αυτή χαρακτηρίζονται ως KP+ στελέχη (Nichibuchi and Kaper, 1995).

Η τοξίνη Kanagawa ή TDH είναι μια πρωτεΐνη που μερικώς μόνο αδρανοποιείται μετά από θέρμανση στους 100 °C για 30 min σε pH 6,0. Επηρεάζει την διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων και προκαλεί οίδημα, ερύθημα και σκλήρυνση του δέρματος. Η διάρροια προκαλείται κυρίως από την διαταραχή που προκαλεί η τοξίνη στην μεταφορά των ιόντων ασβεστίου, νατρίου και μαγνησίου στον εντερικό σωλήνα. Τα στελέχη που παράγουν την τοξίνη (KP+ στελέχη) προκαλούν την νόσο, αν και, περιστασιακά, στελέχη KP- απομονώνονται από κόπρανα ασθενών με διάρροια

(Joseph, 1982). Στην διάρκεια γαστρεντερίτιδας από *V. parahaemolyticus*, διαπιστώθηκε ότι ορισμένα KP- στελέχη παρήγαγαν μια αιμολυσίνη παρόμοια με την τοξίνη TDH, η TRH (TDH-related haemolysin). Πιθανώς η τοξίνη αυτή να είναι ο αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης διάρροιας στους ασθενείς από τους οποίους απομονώνονται μόνο KP- στελέχη του *V. parahaemolyticus* (Joseph, 1982).

Τα γονίδια *tdh* και *trh* ελέγχουν την ικανότητα παραγωγής των TDH και TRH αντίστοιχα και παρουσιάζουν ομοιότητα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους κατά 69% (Nichibusi *et al*, 1990). Η παρουσία των γονιδίων *tdh* ή/και *trh* στην πλειοψηφία των κλινικών στελεχών του *V. parahaemolyticus*, έχει οδηγήσει στην χρήση τους σε παγκόσμια κλίμακα ως δείκτες για τη διάκριση των στελεχών του βακτηρίου σε παθογόνα και απαθογόνα για τον άνθρωπο (Oliver and Kaper, 2007). Όμως, το ποσοστό των στελεχών του μικροοργανισμού που έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά δείγματα ή τρόφιμα και φέρουν τα γονίδια *tdh* ή/και *trh* είναι σχετικά μικρό (<5%) (DePaola *et al.*, 1990).

Και άλλοι παράγοντες εκτός από τις παραπάνω τοξίνες που δεν έχουν διευκρινιστεί μπορεί να συμβάλουν στην παθογένεια του βακτηρίου. Σε πιο πρόσφατες έρευνες που έχουν γίνει βρέθηκε μία θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη (πρωτεάση σερίνης) που αναγνωρίστηκε ως πιθανώς παράγοντας παθογένειας. Η δράση της πρωτεάσης είχε σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ωοθηκών σε πειραματόζωα. Προκαλείται λύση των ερυθροκυττάρων, αιμορραγία των ιστών και θάνατο των ποντικών μετά από ένεση ενδοπεριτοναϊκή και ενδοφλέβια. Ωστόσο δεν έχουν διευκρινιστεί οι κλινικές και περιβαντολογικές επιπτώσεις (Oliver and Kaper, 2007). Επιπλέον η παραγωγή

ουρεάσης θεωρείται σημαντικός φαινοτυπικός δείκτης για τα στελέχη που παράγουν τη τοξίνη TRH. Το γονίδιο που ελέγχει την παραγωγή ουρεάσης των λοιμογόνων στελεχών παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων με το γονίδιο που ελέγχει την παραγωγή της TRH. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί η ουρεάση θεωρείται λοιμογόνος παράγοντας (Okuda *et al.*, 1997).

Σε πειραματική μελέτη που διεξήχθηκε, απομονώθηκαν από 2.720 ασθενείς με διάρροια *Vibrio parahaemolyticus* και το 96 % των στελεχών αυτών ήταν  $K^+$ . Από 650 ιχθείς που απομονώθηκαν *Vibrio* μόνο το 1% ήταν  $K^+$  και τα στελέχη που απομονώθηκαν—από το θαλάσσιο περιβάλλον η πλειονότητα ήταν στελέχη  $K^-$ . Ανιχνευτές νουκλεοτιδίων έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των λοιμογόνων στελεχών του *V. parahaemolyticus* (Drake *et al.*, 2007).

Οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις προκύπτουν από την κατανάλωση μολυσμένων ωμών ή όχι καλά μαγειρεμένων θαλασσινών όπως είναι τα μύδια, τα στρείδια ή τα καβούρια. Ο χρόνος επώασης του βακτηρίου από τη στιγμή της εισόδου στον οργανισμό και μέχρι την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, κυμαίνεται στις 16 ώρες. Τα συμπτώματα διαρκούν από 1- 8 ώρες (Drake *et al.*, 2007).

Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών νοσεί από γαστρεντερίτιδα μετά τη βρώση των μολυσμένων τροφίμων. Εκτός από τη διάρροια που είναι το κύριο σύμπτωμα, άλλα συμπτώματα που μπορεί να εμφανιστούν είναι σπασμοί, ναυτία, γενικευμένη αδυναμία, πονοκέφαλος, μυαλγία, ρίγος, εμετός (Drake *et al.*, 2007).

Η έκθεση ανοιχτών τραυμάτων σε μολυσμένο θαλασσινό νερό αλλά και τα δαγκώματα από καρχαρία ή κροκόδειλο αποτελούν επίσης εναλλακτικές πηγές



μόλυνσης. Αρκετά είδη του γένους *Vibrio* παράγουν μία εξωκυτταρική τοξίνη και ένζυμα που εμπλέκονται στην εκτεταμένη καταστροφή των ιστών αλλά και στη πρόκληση σηψαιμίας. Το *V. parahaemolyticus* προκαλεί σηψαιμία στους ιστούς και μόλυνση του ωτός. Οι αναφορές για επιμόλυνση ανοιχτών τραυμάτων από το *V. parahaemolyticus* είναι πολύ λίγες (Αθανασοπούλου, 2011).

Τα συμπτώματα της επιμόλυνσης ανοιχτών τραυμάτων εμφανίζονται μετά από 3-24 ώρες και χαρακτηρίζονται από πρήξιμο, πόνο, ερύθημα, σχηματισμό φυσαλίδων, νέκρωση και γάγγραινα. Μετά από μικρή περίοδο επώασης 12-48 ωρών οι ασθενείς με σηψαιμία εκδηλώνουν πυρετό, υποθερμία, υπόταση, ταχυκαρδία, σχηματισμό αιμορραγικών φυσαλίδων και εκτεταμένες εκχυμώσεις, οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια και δυσλειτουργία πολλών εσωτερικών οργάνων (Αθανασοπούλου, 2011).

Το *V. parahaemolyticus* αναγνωρίστηκε ως αίτιο τροφικής δηλητηρίασης για πρώτη φορά στην Osaka της Ιαπωνίας το 1951 από κατανάλωση μολυσμένων σαρδέλων. (Daniels *et al.*, 2000). Ο αριθμός των θυμάτων έφτασε τους 272 και αναφέρθηκαν και 20 θάνατοι. Από τότε το ποσοστό μολύνσεων από *V. parahaemolyticus* αγγίζει το 20-30 % των περιπτώσεων που αφορούν τροφικές δηλητηριάσεις στην Ιαπωνία (Alam *et al.*, 2002).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε το *V. parahaemolyticus* στο Maryland το 1971 μετά από 3 επιδημίες γαστρεντερίτιδας. Από τότε γίνονται σποραδικές αναφορές για δηλητηριάσεις και λαμβάνουν χώρα μετά την κατανάλωση ακατέργαστων οστρακοειδών (Molenda *et al.*, 1972). Μεταξύ 1973 και 1998, αναφέρθηκαν 40 επιδημίες από *V. parahaemolyticus* με συνολικό αριθμό

ασθενών 11000. Τα περισσότερα από τα περιστατικά εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια των θερμότερων μηνών και αποδόθηκαν στη κατανάλωση θαλασσινών και ιδιαίτερα οστρακοειδών. Το 1999 πάλι στις ΗΠΑ και την περίοδο Μάρτιου έως Σεπτέμβρη συλλέχθηκαν δείγματα οστρακοειδών από περιοχές που έχουν αυξημένη παραγωγή. Στόχος ήταν έλεγχος της παρουσίας και της πυκνότητας των στελεχών *V. parahaemolyticus*. Από τα δείγματα ανιχνεύθηκαν οι αιμολυσίνες *tdh* και *trh*. Από όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν στελέχη *Vibrio* sp. και σε περιόδους αυξημένης θερμοκρασίας η πυκνότητα των συγκεντρώσεων ήταν μεγαλύτερη. Από τα 156 δείγματα το 35% των στελεχών *Vibrio* ήταν παθογόνα. Τα παθογόνα στέλεχη είχαν ποικιλία οροτύπων και παρήγαγαν ουρεάση. Ο ορότυπος O3:K6 που έχει ενοχοποιηθεί για τα περισσότερα περιστατικά δεν ανιχνεύθηκε. Επικράτησε το *tdh* θετικό. Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις από το παθογόνο συνδέονται με την κατανάλωση νωπών ή ανεπαρκώς θερμικά επεξεργασμένων οστρακόδερμων, μολυσμένων τροφίμων, και έκθεσης των πληγών στο θερμό νερό της θάλασσας (Daniels *et al.*, 2000).

Το 1969 για πρώτη φορά έγινε αναφορά και από την Ολλανδία για απομόνωση στελεχών *V. parahaemolyticus* σε ψάρια. Σε μία έρευνα που διεξήχθη από τα 79 δείγματα μυδιών το 3% ήταν μολυσμένο με στελέχη του δονακίου. Κατά τη διάρκεια του 2003-2004 περισσότερες από 1230 περιπτώσεις με γαστρεντερίτιδα αναφέρθηκαν στη περιοχή Sinaloa στο βορειοδυτικό Μεξικό. Όλες οι περιπτώσεις αποδόθηκαν στη κατανάλωση ακατέργαστων η ατελώς μαγειρεμένων θαλάσσιων προϊόντων. Τα στελέχη του *V. parahaemolyticus* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο PCR και από τα περισσότερα ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *tlh* και *tdh*. ( Broek *et al.*, 1978).

Κατά την διάρκεια του 2007 ερευνήθηκε στην Ιταλία και συγκεκριμένα σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Αδριατικής θάλασσας, το ποσοστό περιεκτικότητας των μυδιών σε *Vibrio* spp. Στόχος ήταν να καθοριστούν οι ορότυποι των λοιμογόνων στελεχών του δονακίου. Από τα 559 δείγματα που αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια του 2007, 65 δείγματα (11,6%) ήταν θετικά για το *V. parahaemolyticus*. Δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα στέλεχος γονίδιο *tdh* αιμολυσίνης. Στο 7.7% των δειγμάτων ανιχνεύθηκε το γονίδιο *trh*. Οι ορότυποι των παθογόνων *trh*-θετικών *V. parahaemolyticus* που απομονώθηκαν ήταν O1: KUT (2/3) ,O1: K37 (1/3), O3: KUT. Η επικράτηση από το *trh*-θετικών *V. parahaemolyticus* που από τα μύδια σε αυτήν την μελέτη ήταν υψηλότερη από προηγούμενες μελέτες σε άλλες ευρωπαϊκά και μη χώρες. Το 2008 αναφέρονται 2 περιπτώσεις μόλυνσης από *V. parahaemolyticus* και ορότυπο στελεχών O3: K6 και O1: KUT μετά από κατανάλωση μυδιών ( Donatella *et al.*, 2009).

Στη Γερμανία και συγκεκριμένα στη θαλάσσια περιοχή Wadden λήφθηκαν την περίοδο Ιουνίου 2004 - Μαΐου 2005 από 7 περιοχές, με αυξημένη παραγωγή μυδιών, συνολικά 90 δείγματα. Η ανάλυση περιέλαβε και το μικροβιολογικό έλεγχο για *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio* spp. Το *Vibrio alginolyticus* ήταν το είδος που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό (51.2%), ακολουθούμενο από *Vibrio parahaemolyticus* (39,5%) και *Vibrio to vulnificus* που ανιχνεύθηκε στο 3,5% των δειγμάτων. Τα είδη *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* δεν βρέθηκαν στα δείγματα που συλλέχθηκαν στις χαμηλές θερμοκρασίες ύδατος (Soumaya and Kuhne, 2006).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία τη χρονική περίοδο 2002 έως 2006, εξέτασαν 161 δείγματα διθύρων (στρείδια και μύδια). Από το 30% των

51

δειγμάτων απομονώθηκε *V. parahaemolyticus*. Το γονίδιο *tdh* ανιχνεύθηκε στο 12% των δειγμάτων, ενώ όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στην παρουσία του *trh*. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι τα ποσοστά απομόνωσης του παθογόνου ήταν μεγαλύτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ δεν ανιχνεύθηκε το «πανδημικό» στέλεχος O3:K6 (Wagley *et al.*, 2008).

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν στην Κίνα σε 574 δείγματα (γαρίδες, χέλια, χτένια, θαλάσσιους ιχθύες κ.α.) από ιχθυοπωλεία, ξενοδοχεία και εστιατόρια, αναφέρουν ότι η παρουσία του *V. parahaemolyticus* ήταν 47,2%. Από τα 341 στελέχη που απομονώθηκαν σε αυτή τη μελέτη, 80 έφεραν το γονίδιο *tdh* και 4 το γονίδιο *trh*. (Chao *et al.*, 2009)

Σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Τουρκία εξετάστηκαν 120 δείγματα νωπών και επεξεργασμένων ιχθύων, καθώς και μυδιών από την περιοχή της Μαύρης Θάλασσας. Από το σύνολο των δειγμάτων, 32 βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του *V. parahaemolyticus* με μοριακές μεθόδους. Το 75% των θετικών δειγμάτων προέρχονταν από μύδια και το 25% από τους ιχθύες. Τα 32 στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν εξετάστηκαν για την παρουσία των γονιδίων *tdh* και *trh*. Σε 13 στελέχη ανιχνεύθηκε το *tdh*, σε 6 το *trh*, ενώ στα υπόλοιπα 13 ανιχνεύθηκαν και τα 2 γονίδια (Terzi *et al.*, 2009).

Στην Ελλάδα αναφέρεται η παρουσία του *V. parahaemolyticus* σε 101 δείγματα ιχθύων (γαύρο, γόπα, σκουμπρί κ.α.) σε ποσοστό 14%. Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας εξετάστηκαν 360 δείγματα (θαλάσσιοι ιχθύες, ιχθύες γλυκού νερού, καλαμάρια, μύδια κ.α.). Το παθογόνο ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα

θαλάσσιων ιχθύων (γόπες) ( Papadopoulou *et al.*, 2007).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας αναφέρεται η απομόνωση 729 στελεχών *Vibrio* (696 από δείγματα θαλάσσιων εκτρεφόμενων ιχθύων και 33 από δείγματα θαλασσινού νερού). Από τα 729 στελέχη που απομονώθηκαν το πλέον διαδεδομένο είδος *Vibrio* ήταν το *V. alginolyticus* (61,4%), ακολουθούμενο από το *Vibrio parahaemolyticus* με 18,6%. Σε αυτή τη μελέτη το *Vibrio parahaemolyticus* απομονώθηκε από λαβράκι, τσιπούρα και μυτάκι (Yagnisis *et al.*, 2007)

Σύμφωνα με την νομοθεσία (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 και τροποποίηση του Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007) μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα δεν προβλέπεται ο έλεγχος των αλιευμάτων για *V. parahaemolyticus*. Η αυξανόμενη παρουσία του παθογόνου στην Ευρώπη παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία και υπογραμμίζει την ανάγκη ένταξης του *V. parahaemolyticus* στα προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την πρόβλεψη, με σχετικά συντηρητικές εκτιμήσεις, ότι τις επόμενες δεκαετίες η μέση ετήσια θερμοκρασία των θαλάσσιων υδάτων θα αυξηθεί κατά 4 – 5 °C στις περιοχές της Νότιας Ευρώπης και της Μαύρης Θάλασσας, ενώ στη Δυτική Ευρώπη κατά 2,5 – 3,5 °C (European Commission, 2007).

## Κεφάλαιο 3

### 3.1. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Είναι ελαιώδη και πτητικά υγρά. Το ειδικό τους βάρος είναι συνήθως μικρότερο από 1 και έχουν ισχυρό δείκτη διάθλασης και στροφική ικανότητα. Έχουν αυξημένη διαλυτότητα σε λιπόφιλους διαλύτες και λιπαρά έλαια και ελάχιστη στο νερό (Χαρβάλα 1994). Συνίστανται από πολλές χημικές ουσίες που μπορούν να φθάσουν στις 150, ενώ το υπερσχύον συστατικό καθορίζει και το χαρακτήρα τους. Ο όρος αιθέριο έλαιο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Paracelsus von Hohenheim τον 16<sup>ο</sup> αιώνα για το χαρακτηριστικό του δραστικού συστατικού ενός φαρμάκου. Τα υπερσχύοντα συστατικά είναι δυνατόν να αποτελούν το 85% της συνολικής συγκέντρωσης του ελαίου ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται ως ίχνη (Burt *et al.*, 2004).

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων χωρίζονται σε δύο ομάδες που είναι οι υδρογονάνθρακες ελαιώδους υφής και τους οξυγονωμένους υδρογονάνθρακες στερεάς υφής που συνιστούν το ελαιοπτένιο και το στεαροπτένιο αντίστοιχα. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 3000 γνωστά αιθέρια έλαια από τα οποία τα 300 είναι διαδεδομένα στο εμπόριο ( Prabuseenivasn *et al.*, 2006).

Η παραγωγή των αιθέριων ελαίων από τα φυτά γίνεται με διάφορους μεθόδους όπως απόσταξη ζύμωση, έκθλιψη , εκχύλιση υδρόλυση με αερισμό. Η πιο συχνή μέθοδος είναι η απόσταξη με υδρατμούς. Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό είναι άνθη , κάλυκες, σπόροι, φύλλα κλαδιά, ρίζες, φλοιώδη και ξυλώδη τμήματα. Η απόσταξη ως μέθοδος παραλαβής αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε

πρώτα από τους Αιγύπτιους, Ινδούς και Πέρσες πριν από δύο χιλιετηρίδες και βελτιώθηκε από τους Άραβες τον 9<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα (Burt *et al.*, 2004).

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η εποχή και η ώρα της ημέρας που συλλέγεται το φυτό, η σύσταση του εδάφους και οι μέθοδοι καλλιέργειας, η διαδικασία απόσταξης, οι συνθήκες αποθήκευσης έως την παραγωγή του ελαίου, η μέθοδος παραλαβής και ανάλυσης των επιμέρους συστατικών (Marotii *et al.*, 1994; Daferera *et al.*, 2000).

Οι ομάδες των χημικών ουσιών στις οποίες ανήκουν τα συστατικά των αιθέριων ελαίων περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, φαινόλες, αλδεύδες, κετόνες και εστέρες (Burt *et al.*, 2004).

### **3.1.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ**

Η χρήση των αιθέριων ελαίων σήμερα είναι ευρεία και καλύπτει τους τομείς της κοσμετολογίας, αρωματοποιίας, βιομηχανίας τροφίμων, ποτοποιίας, φαρμακευτικής και ιατρικής. Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε καλλυντικά αρώματα, αποσμητικά, απορρυπαντικά, στοματικά αντισηπτικά διαλύματα και οδοντόκρεμες (Valero, 2003).

Τα βότανα χρησιμοποιούνται για πολλούς αιώνες στα τρόφιμα για την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης και την προστασίας τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα βότανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα σε διάφορες μορφές, όπως αποξηραμένα ή τριμμένα φύλλα και άνθη, εκχυλίσματα με διάφορους διαλύτες ή αιθέρια (Valero, 2003).

Σε μοντέλα τροφίμων έχει δοκιμαστεί η δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων έναντι μικροβίων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα όπως *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimutium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O157:H7*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Photobacterium phosphoreum*. Έχουν γίνει έρευνες σε προϊόντα όπως ταραμοσαλάτα, ημιαποβουτυρωμένο γάλα, μοτσαρέλα και άλλα μαλακά τυριά, γιαούρτι, φιλέτα ψαριών και κρέατος, κιμάς, κ.α. (Daferera *et al.*, 2000).

Η διεθνής αγορά των αιθέριων ελαίων συνεχώς διευρύνεται. Το μέγεθος των συναλλαγών που πραγματοποιούνται σε παγκόσμιο επίπεδο δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα αιθέρια έλαια και γενικότερα τα εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης, αποτελούν σε μεγάλο βαθμό επιμέρους συστατικά άλλων προϊόντων. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών, το 1998 οι εξαγωγές αιθέριων ελαίων σε παγκόσμια κλίμακα ανήλθαν σε περίπου 7,5 δισεκατομμύρια δολάρια. Οι κυριότεροι εξαγωγείς αιθέριων ελαίων είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση και οι Η.Π.Α. με ποσοστό περίπου 65% του συνόλου των εξαγωγών που πραγματοποιήθηκαν το 1998 (Ο.Η.Ε., 1999).

### **3.1.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ**

Τα φυσικά αντιμικροβιακά πριν εφαρμοστούν στα τρόφιμα πρέπει να πληρούν ορισμένα νομοθετικά κριτήρια, αφού φυσικά δεν σημαίνει και απαραίτητα και ασφαλή. Πολλά φυσικά συστατικά είναι δυνατόν να είναι τοξικά ή καρκινογόνα. (Branen, 1993). Η χρήση της καρβακρόλης που αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του αιθέριου



ελαίου της ρίγανης έχει στις ΗΠΑ σύμφωνα με τον Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών (Code of Federal Regulations-CFR), υπό προϋπόθεση να προστίθεται στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration). Γενικά , τόσο η καρβακρόλη όσο και τα βότανα και καρυκεύματα που την περιέχουν έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή (General Regardede as Safe, GRAS) από τους ειδικούς εκπαιδευμένους δοκιμαστές του Οργανισμού Παρασκευαστών Αρωμάτων και Εκχυλισμάτων (Ultee, 2000). Ωστόσο, η νομοθεσία για τα φυσικά αντιμικροβιακά τα θεωρεί ως νέα πρόσθετα τροφίμων όταν χρησιμοποιούνται για νέους σκοπούς στην Τεχνολογία Τροφίμων με αποτέλεσμα η χρήση τους να απαιτεί περαιτέρω τοξικολογικές μελέτες, παρά τη σήμανση τους ως ασφαλή. Η απευθείας χρήση ολόκληρου του φυσικού ιστού που περιέχει το αντιμικροβιακό συστατικό είναι ο πλέον φυσικός τρόπος εφαρμογής τους. Όμως η προσθήκη φυτικών ιστών σε ποσότητες που να αντιστοιχούν στην επιθυμητή συγκέντρωση του εκάστοτε ενεργού συστατικού του αιθέριου ελαίου απαιτεί πολύ μεγαλύτερες ποσότητες πρώτης ύλης , σε σχέση με την απευθείας προσθήκη καθαρού αιθέριου ελαίου, πράγμα που καθιστά ανέφικτη μια τέτοια πρακτική (Ultee, 2000).

### **3.2. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ**

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, στο γένος *Origanum*. Το γένος *Origanum* περιλαμβάνει 38 είδη ρίγανης, τα περισσότερα εκ των οποίων απαντώνται σε όλη την Μεσόγειο, ενώ 11 είδη από αυτά φύονται στην Ελλάδα (Greuter *et al.*, 1986). Το πιο γνωστό είδος ρίγανης στην Ελλάδα είναι αυτή η οποία

ταξινομείται ως *Origanum vulgare spp. hirtum* (Kokkini, 1994).

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει περισσότερες από 30 χημικές ενώσεις και είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι οι δύο κύριες φαινόλες αποτελώντας το 78-82 % του αιθέριου ελαίου και θεωρούνται υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Adam *et al.* 1998; Yanishlieva *et al.*, 1999).

Επίσης, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο είναι δύο υδρογονάνθρακες που αποτελούν περίπου το 5 % και 7 %, αντίστοιχα του αιθέριου ελαίου και συνεισφέρουν στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης (Adam *et al.*, 1998). Εκτός των φαινολών και υδρογονανθράκων, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει διάφορες αλκοόλες και εστέρες που βρίσκονται σε μικρά ποσοστά, περίπου 1,5 % (Daferera *et al.*, 2000).

### **3.2.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ**

Σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους, ο οποίος τους επιτρέπει να διαχωρίζονται εντός των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διαταράσσοντας τις δομές τους και καθιστώντας αυτές περισσότερο διαπερατές. Τότε μπορεί να επισυμβεί απώλεια ιόντων και άλλων κυτταρικών συστατικών η οποία μπορεί να προκαλέσει τη καταστροφή του κυττάρου (Σακκάς, 2007). Οι μεταβολές στη τιμή του pH και στο ηλεκτρικό δυναμικό της αντλίας πρωτονίων είναι διεργασίες που διατάσσουν επίσης τη λειτουργικότητα του κυττάρου (Lambert *et al.*, 2001).

Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό μεταβολισμό επιτυγχάνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως διαταραχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της αντλίας πρωτονίων, της ροής ηλεκτρονίων της ενεργητικής μεταφοράς και πήξης των συστατικών των κυττάρων. Σημαντικό ρόλο έχει και η παρουσία της υδροξυλομάδας στο μόριο τους και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ενεργά κέντρα ενζύμων (Σακκάς, 2007). Η σχετική θέση της υδροξυλομάδας στο φαινολικό δακτύλιο θεωρείται ότι δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή ισχύ των ενώσεων. Η αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων που περιέχονται στο μόριο των φαινολικών ενώσεων αυξάνει αντίστοιχα και τη δράση τους (Gibbons, 2007).

Μελέτες που αφορούσαν τη δράση των φαινολικών ουσιών έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ουσίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση δομικών και λειτουργικών διαταραχών στη κυτταρική μεμβράνη. Η απέκκριση  $K^+$  είναι συνήθως πρώιμο σημείο βλάβης και συχνά ακολουθείται από απέκκριση κυταροπλασματικών συστατικών (Gill and Holley, 2004).

Οι φαινολικές ενώσεις θυμόλη και καρβακρόλη είναι τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Η καρβακρόλη παρουσιάζει την ισχυρότερη δράση έναντι της *L. Monocytogenes* και ακολουθεί η θυμόλη και η ευγενόλη. Σε αντίστοιχες μελέτες η καρβακρόλη έδρασε παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των *Pseudomonas fluorescens*, *S aureus*, *Bacillus subtilis*. Γενικά τα Gram(+) βακτήρια εμφανίζουν περισσότερη ευαισθησία στη δράση των αιθέριων ελαίων σε σχέση με τα Gram (-) γεγονός που

αποδίδεται πιθανόν στην παρουσία εξωτερικής μεμβράνης των τελευταίων, η οποία προσδίδει στη βακτηριακή επιφάνεια ισχυρό υδρόφιλο χαρακτήρα και λειτουργεί παρεμποδιστικά ως προς την τη διαπερατότητα. Το ριγανέλαιο εμφανίζει παρεμποδιστική δράση έναντι του στελεχούς *E.coli* O157:H7. (Σακκάς, 2007).

Οι μύκητες και τα Gram(+) βακτήρια δεν έχουν τον ίδιο βαθμό αλλαγών στη μορφολογία του κυτταρικού τοιχώματος, κάτι που πιθανώς να οφείλεται στη διαλυτότητα των λιποπολυσακχαριτών της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων στις φαινολικές ουσίες (Σακκάς, 2007).

Τα αιθέρια έλαια αυξάνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τα συστατικά της καρβακρόλης όπως και η πρόδρομη της ένωση π-κυμένιο διαλύονται στο εσωτερικό της και προκαλούν εξοίδηση και περιορισμό της λειτουργικότητας . Η απέκκριση K + και η καταστροφή της βαθμίδωσης του pH προκαλούν εξάντληση των αποθεμάτων ATP και κυτταρικό θάνατο (Ultee et al., 2002). Τα συστατικά των αιθέρων ελαίων φαίνεται ότι δρουν επίσης και σε κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι εμβυθισμένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη περιχαρακωμένα από μόρια λιπιδίων. Οι κυκλικοί υδρογονάθρακες με τα λιπόφιλα μόριά τους μπορούν να συσσωρευτούν στο διπλό διαμοριακό στρώμα των λιπιδίων διαταράσσοντας την αλληλεπίδραση λιπιδίων–πρωτεϊνών, ή να αλληλεπιδρούν άμεσα με υδρόφοβα μέρη των πρωτεϊνών (Σακκάς, 2007)

Το 2001 μελετήθηκε *in vitro* την επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*,

*Micrococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όταν προστέθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα προκάλεσε αναστολή όλων των παραπάνω μικροοργανισμών σε ποσοστό 100 % στα 800 ppm, αναστολή κυμαινόμενη μεταξύ 70 – 100 % στα 400 ppm και αναστολή μόνο της *E. coli* O157:H7 στα 200 ppm (Marino *et al.*, 2001)

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε θρεπτικά υποστρώματα σε συγκέντρωση 0.4% παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μικροοργανισμών *S. aureus*, *Y. enterocolitica* και *A. hydrofila*, ενώ σε συγκεντρώσεις 1% και 2% στη *S. typhimurium* (Ozcan, 2003). Η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης για την ανάρχηση της ανάπτυξης των παθογόνων *A. sobria*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* ήταν 0.12, 0.25, 0.12, 0.12 και 2% αντίστοιχα. Η αντιμικροβιακή δράση της ρίγανης βρέθηκε ισοδύναμη με εκείνη του αντιβιοτικού αμπικιλίνη κατά των παθογόνων *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, ενώ μεγαλύτερη από εκείνη των αντιβιοτικών γενταμυκίνη, καναμυκίνη και αμπικιλίνη στην περίπτωση της *Y. enterocolitica* (Sagdic *et al.*, 2003).

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Brocothrix thermosphacta* και *Salmonella pullorum* σε *in vitro* πειράματα (Dorman and Deans, 2000).

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1,33 – 66,7 (μg/ml) σε θρεπτικό ζωμό, παρουσίασε σημαντική βακτηριοκτόνο δράση κατά ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το αιθέριο έλαιο βρέθηκε δραστικό ακόμα και

κατά σπόρων του παραπάνω παθογόνου στις ίδιες συνθήκες (Friedman *et al.*, 2004).

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του παθογόνου *E. coli* O157:H7 μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές. αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1, 1,5 και 2% είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμό  $10^8$  CFU/ml σε θρεπτικό υπόστρωμα που επώαστηκε στους 37 °C. Στην ίδια εργασία διαπιστώθηκε ότι συγκέντρωση 0,5% του ελαίου παρουσίασε βακτηριοστατική δράση. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά της *E. coli* O157:H7 σε ακόμη μικρότερες συγκεντρώσεις (Sagdic *et al.*, 2002). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται ότι συγκέντρωση 0.05% αιθέριου ελαίου ρίγανης είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμούς 5 log cfu/ml σε ζωμό BHI και επώαστηκε στους 37 °C. Στην ίδια εξάλλου μελέτη, συγκέντρωση 0,03% του αιθέριου ελαίου παρουσίασε βακτηριοστατική δράση. Ενοφθαλμίστηκε *E. coli* O157:H7 ( $10^6$  cfu/ml) σε θρεπτικό ζωμό και παρατήρησαν ότι αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 625 μl/l παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου σε επώαση στους 10, 20 και 37 °C (Skandamis *et al.*, 2001).

Η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε κατεψυγμένα τρόφιμα με χαμηλό pH σε συγκεντρώσεις (0,1-0,7%), αύξησε το ρυθμό θανάτωσης της *E. coli* O157:H7 και μείωσε το χρόνο επιβίωσής της. Είναι γνωστό ότι η *E. coli* O157:H7 επιβιώνει σε χαμηλό pH, για μεγάλο χρονικό διάστημα Σε τρόφιμα με χαμηλό pH το αιθέριο έλαιο ήταν περισσότερο δραστικό κατά της *E. coli* O157:H7, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι σε χαμηλό pH το έλαιο γίνεται περισσότερο υδρόφοβο, με αποτέλεσμα να επιδρά

καλύτερα στη λιπιδική φάση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Juven *et al.*, 1994)

Σε ταραμοσαλάτα με pH 5,3 που είχε ενοφθαλμιστεί με *S. enteritidis* (8 log cfu/g), η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1 και 2% είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού σε 1 log cfu/g κατά τη συντήρηση του προϊόντος σε θερμοκρασία 20 °C για 16 ημέρες. Στις ίδιες συνθήκες, συγκέντρωση του ελαίου ίση με 0.5% μετά από μια αρχική μείωση περίπου κατά 1 log cfu/g του πληθυσμού του παθογόνου δεν είχε στη συνέχεια άλλη επίδραση για όλο το χρονικό διάστημα της συντήρησης του προϊόντος. Αντίθετα, όταν το pH της ταραμοσαλάτας ρυθμίστηκε στο 4.3, η συγκέντρωση αυτή (0,5%) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών του παθογόνου σε επίπεδα της τάξης του 1 log cfu/g (Koutsoumanis *et al.*, 1999).

Σε μία έρευνα ενοφθάλμισαν σε μυττωτό βόειου κρέατος την *L. monocytogenes* σε πληθυσμούς 3.5 log cfu/g και στη συνέχεια, συντήρησαν τα δείγματα στους 5 °C για 16 ημέρες. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε αερόβιες συνθήκες ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (40% CO<sub>2</sub>/ 30% O<sub>2</sub>/ 30% N<sub>2</sub>). Στα δείγματα που είχε προστεθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 0.8%, οι πληθυσμοί του παθογόνου ήταν κατά 1, 3,84 και 4,36 log CFU/g χαμηλότεροι από αυτούς που καταγράφηκαν στους μάρτυρες στο τέλος της συντήρησης (Tsigarida *et al.*, 2000)

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,8% στην επιφάνεια βόειου κρέατος που επιμολύνθηκε τεχνητά με *S. typhimurium*, οδήγησε σε σημαντική μείωση του παθογόνου στη διάρκεια της συντήρησής του στους 5 °C για 15 ημέρες (Skandamis *et al.*, 2002β).

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του *C. botulinum* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των ποσοτήτων των νιτρικών και νιτρωδών αλάτων, που χρησιμοποιούνται στα κρεατοσκευάσματα. Όπως είναι γνωστό, τα άλατα αυτά έχουν κατηγορηθεί για πιθανή καρκινογένεση στον άνθρωπο, όταν ξεπερνούν ορισμένα ποσοστά (Ismael *et al.*, 1990) .

Η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης για την ανάσχεση της ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε θρεπτικό ζωμό βρέθηκε ότι ήταν 0,5% κατά την επώαση στους 5 °C και στους 30 °C για 24 ώρες (Yano *et al.*, 2006). Σε παρόμοια έρευνα το εκχύλισμα ρίγανης με συγκέντρωση φαινολικών συστατικών 0.1 mg/ml μείωσε τους πληθυσμούς *V. parahaemolyticus* σε ζωμό TSB μετά από επώαση στους 30 °C για 10 ώρες σε σχέση με τους μάρτυρες. Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι το εκχύλισμα ρίγανης μείωσε κατά 1 log cfu/g τον αρχικό πληθυσμό ( $10^3$  log CFU/g) του *V. parahaemolyticus* σε φιλέτα μπακαλιάρου και σε γαρίδες, μετά από συντήρηση των δειγμάτων στους 4 °C για 8 ημέρες ( Lin *et al.*, 2005).

Αναφέρεται ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,05% ανέστειλε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Photobacterium phosphoreum* σε φιλέτα μπακαλιάρου που συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 2 °C. Στις ίδιες συνθήκες η προαναφερθείσα συγκέντρωση ρίγανης επιμήκυνε τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων από 11-12 ημέρες στους μάρτυρες σε 21-26 ημέρες (Mejlholm and Dalgaard, 2002).

### 3.2.2 ANTIMYKHTIAKH ΔΡΑΣΗ



Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει επίσης αξιοσημείωτη αντιμυκητιακή δράση. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Penicillium spp.* Η παραγωγή των μυκοτοξινών και ειδικότερα των αφλατοξινών στα τρόφιμα, περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης. Αυτή η παρατήρηση αποδόθηκε στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με ενεργά ένζυμα των μυκήτων *Aspergillus spp.* που οδηγούν σε απενεργοποίηση της παραγωγής των αφλατοξινών (Juglal et al., 2002). Αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2 μl/ml ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και περιόρισε την παραγωγή αφλατοξινών *in vitro* (El-Baroty, 1997).

### 3.2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η ρίγανη είναι μια φυσική αντιοξειδωτική ουσία (Kokkini 1994; Exarchou et al., 2002). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό στις φαινόλες της και κυρίως στην καρβακρόλη και στη θυμόλη (Adam et al., 1998). Άλλες χημικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, όπως το ροσμαρινικό οξύ, συντελούν επίσης στην αντιοξειδωτική αυτή συμπεριφορά (Exarchou et al., 2002). Η ρίγανη βρέθηκε ότι εμποδίζει την οξείδωση του λίπους σε διάφορα τρόφιμα. Η χορήγηση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με την τροφή σε πτηνά βρέθηκε ότι προστατεύει από την οξείδωση το λίπος του κρέατος τους (Botsoglou et al., 2002α, 2002β; Botsoglou et al., 2003α, 2003β; Papageorgiou et al., 2003; Govaris et al., 2004) στη διάρκεια συντήρησης του κρέατος αυτού στην ψύξη ή την κατάψυξη. Η χορήγηση

αντιοξειδωτικών ουσιών με την τροφή στα ζώα αποδείχθηκε ότι είναι μια πολύ καλή τεχνική για την απορρόφηση και την ενσωμάτωση των ουσιών αυτών στις μεμβράνες των κυττάρων των ιστών, όπου δρουν εμποδίζοντας την οξείδωση (Botsoglou *et al.*, 2002β).

### 3.2.4 ΑΛΛΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Κλινική μελέτη σε ασθενείς ανθρώπους έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης σε γαλάκτωμα είχε αντιπαρασιτική δράση κατά των εντερικών πρωτοζώων *Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni* και *Endolimax nana* (Force *et al.*, 2000). Η χορήγηση καρβακρόλης και θυμόλης με την τροφή βρέθηκε ότι βελτιώνει τις αποδόσεις κρεοπαραγωγών ορνιθίων που είχαν μολυνθεί πειραματικά με ωοκύστες του κοκκιδίου *Eimeria acervulina* (Ibrir *et al.*, 2001). Η χορήγηση αιθέριου έλαιου ρίγανης σε συγκέντρωση 300 mg/kg με την τροφή παρουσιάζει δράση κατά της *E. tenella* σε παχυνόμενες όρνιθες (Giannenas *et al.*, 2003). Σε άλλη σχετική μελέτη με πτηνά διαπιστώθηκε ότι οι φαινόλες της ρίγανης παρουσιάζουν ισχυρή δράση κατά των κοκκιδίων του γένους *Eimeria* (Williams, 1997).

# **Μέρος 2<sup>ο</sup>**

## **Η δική μας έρευνα**

## Κεφάλαιο 4

### 4.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ

#### 4.1 Εισαγωγή

Συνήθως η προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε μικρές συγκεντρώσεις στα αλιεύματα μπορεί να βελτιώσει τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Όμως, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων αιθέριων ελαίων, παρότι δε γεννά αμφιβολίες για την ασφάλεια των καταναλωτών, είναι δυνατόν να επηρεάσει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των τροφίμων. Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων οφείλεται στα συστατικά των αιθέριων ελαίων και ιδιαίτερα στις φαινόλες που παρουσιάζουν χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μυδιών κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στην ψύξη με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης.

#### 4.2 Παρασκευή των δειγμάτων

Μύδια καλλιέργειας (*Mytilus galloprovincialis*) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη και κατά την παραλαβή εξετάστηκε η νωπότητα και βιωσιμότητά τους. Τα νεκρά μύδια απομακρύνθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα εκπλύθηκαν και αφαιρέθηκε η σάρκα τους με τη χρήση στείρου νυστεριού. Στη συνέχεια τα μύδια συσκευάστηκαν σε

αερόβιες συνθήκες τόσο με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης όσο και χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου (CON) και συντηρήθηκαν στους 4 °C για 14 ημέρες.

#### **4.3 Παρασκευή του αιθέριου ελαίου**

Το αιθέριο έλαιο παρασκευάστηκε με απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation) αποξηραμένων φυτών ρίγανης (*Origanum vulgare*). Τα παραπάνω φυτά που αποτελούνταν από στελέχη, μίσους, φύλλα και άνθη αγοράστηκαν από εξειδικευμένο τοπικό κατάστημα. Σε κάθε διαδικασία απόσταξης, ποσότητα 500 γραμμαρίων από κάθε φυτό τεμαχιζόταν, τοποθετούνταν σε δίλιτρη, σφαιρική φιάλη και γινόταν προσθήκη 1 λίτρου απιονισμένου ύδατος. Ακολουθούσε απόσταξη με υδρατμούς σε συσκευή τύπου Clevenger για 3 ώρες. Το αιθέριο έλαιο από κάθε φυτό που παραγόταν με την παραπάνω διαδικασία, συλλεγόταν, αποξηραινόταν με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου, τοποθετούνταν σε φιαλίδια σκούρου χρωματισμού και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

#### **4.4 Οργανοληπτικός έλεγχος**

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των μυδιών γινόταν την 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 και 14 ημέρα της συντήρησής τους. Μια ομάδα από 7 άτομα, που επιλέχθηκαν από άτομα του Εργαστηρίου και του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., εκπαιδεύθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων. Η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών γινόταν σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Caglac et al. (2008). Συνοπτικά,

αξιολογούνταν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των νωπών μυδιών (οσμή, αποδοχή) και των μυδιών μετά από την θερμική επεξεργασία τους (οσμή, γεύση, αποδοχή). Σε κάθε αξιολόγηση χρησιμοποιούνταν 140 g μυδιών (από 20 g σε κάθε αξιολογητή) τα οποία θερμαίνονταν σε εμπορικό φούρνο μικροκυμάτων σε πλήρη ισχύ για 2 λεπτά. Τα δείγματα σερβίρονταν άμεσα στον κάθε δοκιμαστή, που πραγματοποιούσε την αξιολόγηση ξεχωριστά από τους υπολοίπους, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε λευκά πιάτα με ένα τριψήφιο τυχαίο αριθμό. Το κάθε ένα από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκε με μία κλίμακα από 0 έως 5. Στον πίνακα 4.1 φαίνονται οι χαρακτηρισμοί που αντιστοιχούσαν στον κάθε βαθμό της χρησιμοποιηθείσας κλίμακας.

<b>Βαθμολογία</b>	<b>Χαρακτηρισμός</b>
<b>5</b>	Εξαιρετικά ευχάριστο
<b>4</b>	Αρκετά ευχάριστο
<b>3</b>	Οριακά αποδεκτό
<b>2</b>	Δυσάρεστο
<b>1</b>	Αρκετά δυσάρεστο
<b>0</b>	Εξαιρετικά δυσάρεστο

**Πίνακας 4.1** Αντιστοιχία χαρακτηρισμού και βαθμολογίας για κάθε δείγμα κατά την οργανοληπτική εξέταση.

Ως όριο αποδοχής του δείγματος τέθηκε ο βαθμός 3 (οριακά αποδεκτό). Όταν ο μέσος όρος της βαθμολογίας κάποιου δείγματος ήταν χαμηλότερος από το 3 το δείγμα θεωρούνταν ως απορριπτέο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος στα μύδια χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου (CON) και στα μύδια με την προσθήκη (EO) σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,2 και 0,3% που συντηρήθηκαν στους 4 °C για 14 ημέρες. Ο αρχικός οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε ότι τα δείγματα μυδιών ήταν αποδεκτά με την προσθήκη του EO ρίγανης μέχρι και 0,2%. Έτσι στα αποτελέσματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου 0,1 και 0,2%.

#### **4.5 Στατιστική επεξεργασία**

Το κάθε πείραμα του οργανοληπτικού ελέγχου διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις). Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκαν ANOVA και το t-test. Για τον εντοπισμό διαφορών στις μέσες τιμές επιλέχθηκε ένα επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ .

#### **4.5 Αποτελέσματα και συζήτηση**

Η βαθμολογία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή και αποδοχή) των νωπών μυδιών της ομάδας των μαρτύρων (CON) παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 4 °C. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσίασαν οι μάρτυρες και μετά τη θερμική επεξεργασία τους, αφού παρέμειναν αποδεκτοί μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους στην

ψύξη. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οι Caglac et al. (2008) αναφέρουν ότι μύδια (*M. galloprovincialis*) παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά (οσμή, γεύση και εμφάνιση) μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες στην ψύξη. Ομοίως, σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Masniyom et al. (2012) για την επίδραση της προσθήκης αιθέριων ελαίων κουρκούμης και λεμονόχορτου σε μύδια (*Perna viridis*), οι μάρτυρες (χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου) παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτοί μέχρι και την 6<sup>η</sup> κατά την αερόβια συντήρησή τους στους 4 °C.

### **Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης**

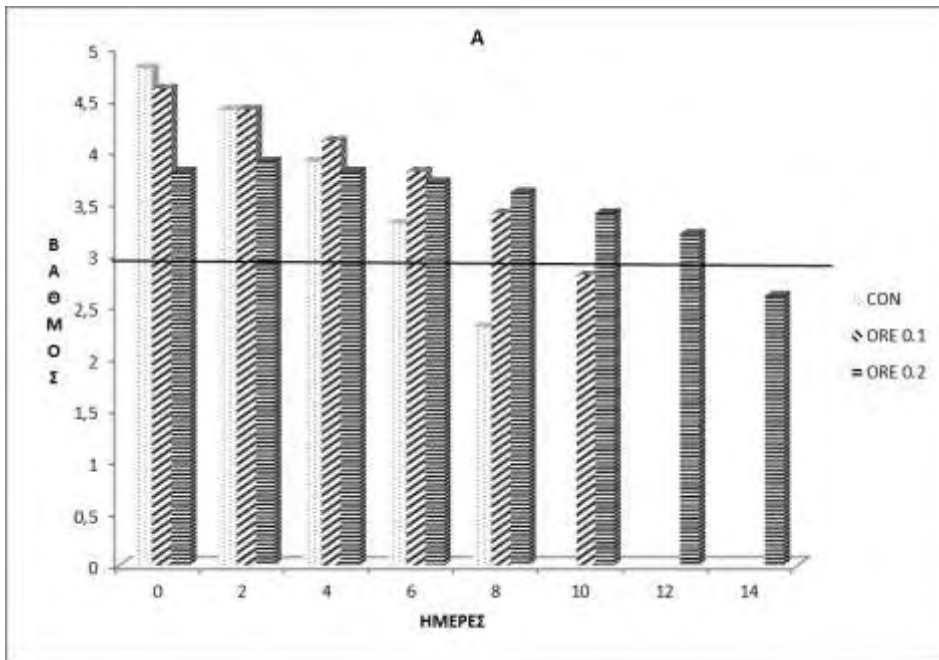
Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στις συγκεντρώσεις 0,1 και 0,2% στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των νωπών μυδιών και των μυδιών μετά τη θερμική επεξεργασία, φαίνονται στα σχήματα 4.1 και 4.2 αντίστοιχα.

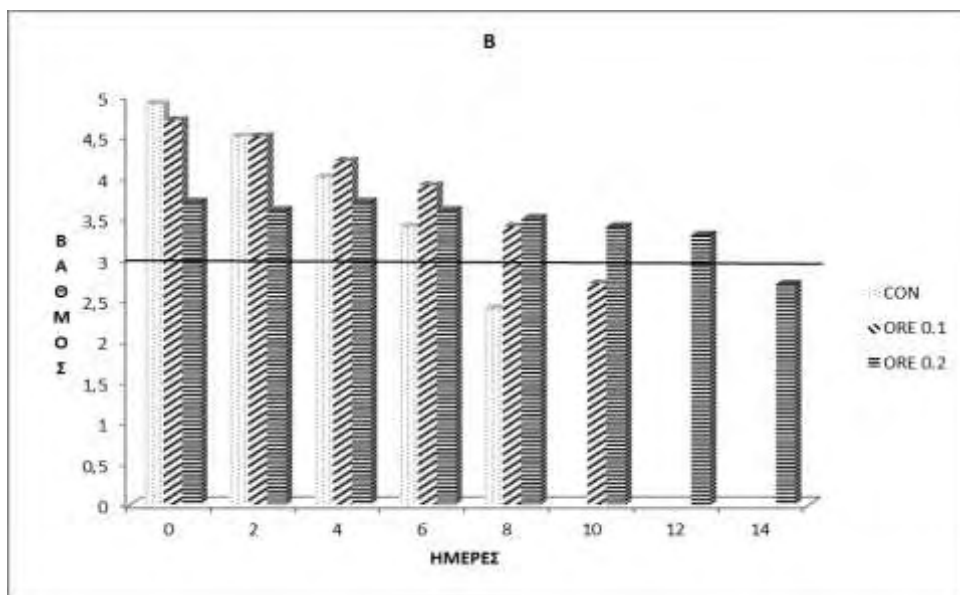
Η βαθμολογία της οσμής και της αποδοχής των νωπών μυδιών από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,1%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ( $P>0,05$ ) μέχρι και την 4<sup>η</sup> ημέρα και στη συνέχεια, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ( $P<0,05$ ), μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη. Ανάλογα αποτελέσματα στα δείγματα των μυδιών με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,1%) καταγράφηκαν και μετά τη θερμική επεξεργασία, αφού τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν (οσμή, γεύση και αποδοχή) παρέμειναν σημαντικά υψηλότερα ( $P<0,05$ ) σε σχέση με τα αντίστοιχα των μαρτύρων μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη. Ο οργανοληπτικός



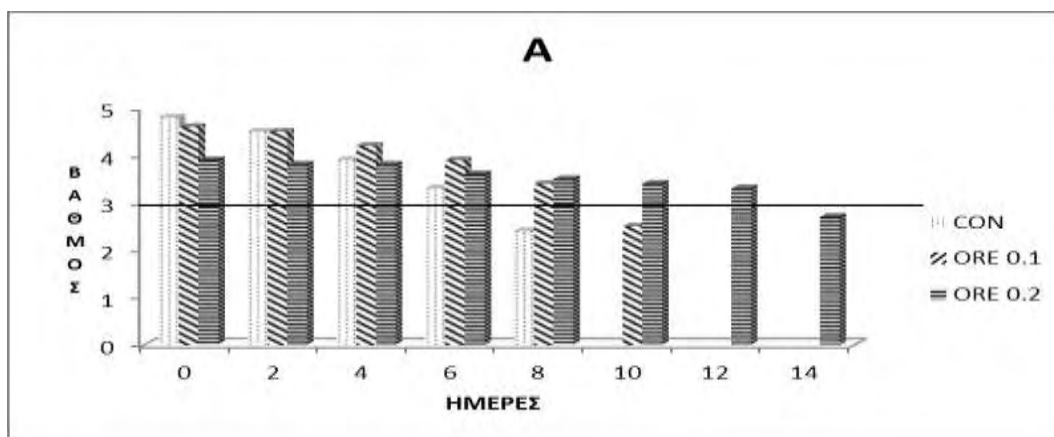
έλεγχος των δειγμάτων έδειξε ότι τα δείγματα των μυδιών με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,1%) παρέμειναν αποδεκτά μέχρι και την 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους.

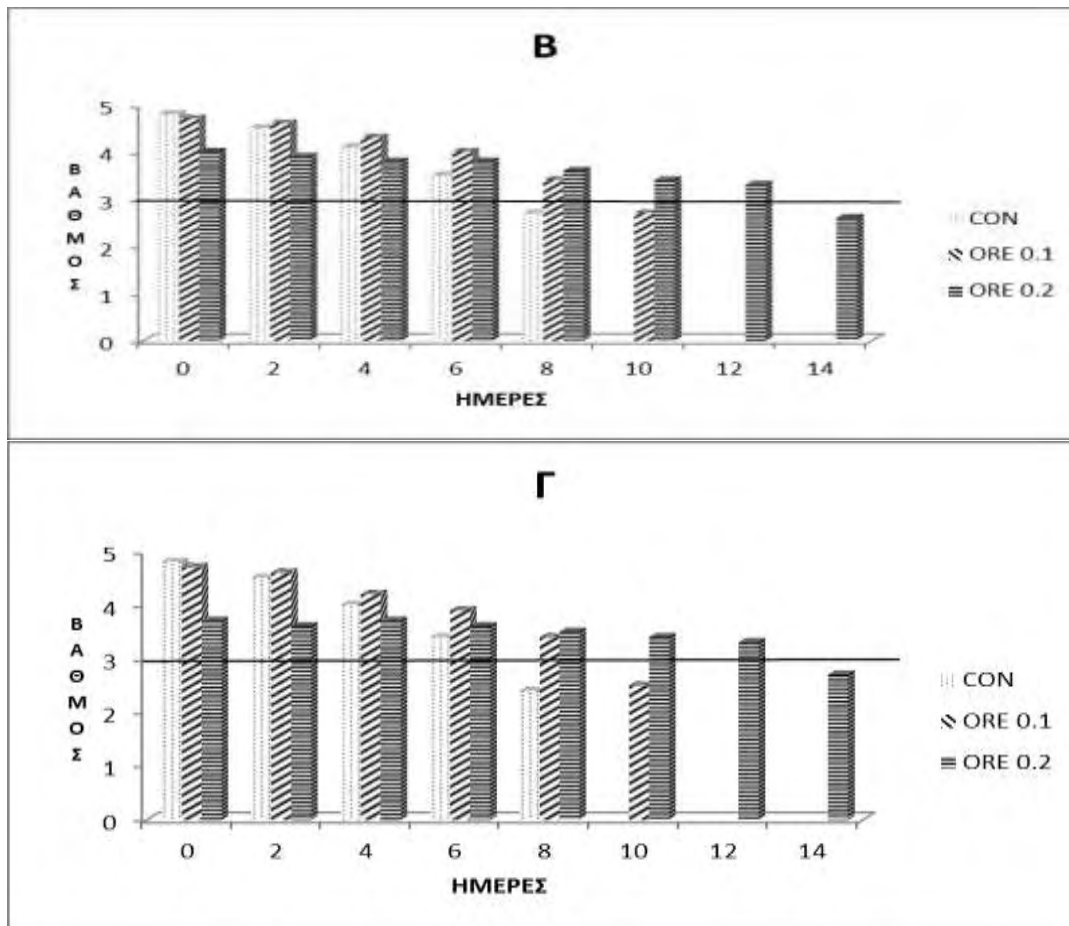
Η βαθμολογία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μυδιών με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0,2%) τόσο νωπών όσο και μετά από τη θερμική επεξεργασία, παρέμειναν πάνω από όριο απόρριψης (3) μέχρι και την 12<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στους 4 °C. Σε σύγκριση με την αντίστοιχη βαθμολογία των μυδιών του 0,1% και των μαρτύρων παρέμεινε σημαντικά μικρότερη ( $P<0,05$ ) μέχρι και την 4<sup>η</sup> ημέρα, δε διέφερε σημαντικά ( $P>0,05$ ) την 6<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ( $P<0,05$ ). Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια άλλη μελέτη με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μύδια που να είναι σε γνώση της συγγραφέως. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Masnigom et al. (2012) με την προσθήκη αιθέριων ελαίων κουρκούμης και λεμονόχορτου σε μύδια (*Perna viridis*), αναφέρεται ότι ήταν αποδεκτή συγκέντρωση 0,5%. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (οσμή και γεύση) των μυδιών που εξετάστηκαν με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων στην υψηλή συγκέντρωση 0,5% παρέμειναν αποδεκτά μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους στην ψύξη σε αερόβιες συνθήκες. Το μεγαλύτερο αυτό διάστημα μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου που χρησιμοποιήθηκε.





**Σχήμα 4.1** Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων νωπών μυδιών στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% (ORE 0.1), 0,2% (ORE 0.2) και των μαρτύρων (CON): **A.** οσμή, **B.** αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (3).





**Σχήμα 4.2** Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων μυδιών μετά από θερμική επεξεργασία στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.1% (ORE 0.1), 0.2% (ORE 0.2) και των μαρτύρων (CON): **Α.** οσμή, **Β.** γεύση, **Γ.** αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (3).

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>

### 5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΕΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ

## 5.1 Εισαγωγή

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,2% που ήταν οργανοληπτικά αποδεκτές, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στη μικροβιολογική κατάσταση των μυδιών (O.M.X., ψυχρόφιλα βακτήρια και *Enterobacteriaceae*) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στην ψύξη (4 °C) σε αερόβιες συνθήκες.

## 5.2 Παρασκευή των δειγμάτων

Τα δείγματα των μυδιών παρασκευάζονταν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2. Στη συνέχεια, τα δείγματα των μυδιών τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher και ακολουθούσε η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0% (CON), 0,1% ή 0,2%. Τα ενοφθαλμισμένα δείγματα μυδιών μέσα στις σακούλες stomacher υποβάλλονταν σε ήπια μάλαξη όπως περιγράφεται από τους Attouchi and Sadoe (2011) για 2 λεπτά για την ομοιόμορφη κατανομή του αιθέριου ελαίου, συσκευάζονταν σε αερόβιες συνθήκες και συντηρούνταν στην ψύξη.

## 5.3 Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων για τους πληθυσμούς της Ολικής

Μεσόφιλης Χλωρίδας, των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων πραγματοποιούνταν σε διαστήματα 2 ημερών μετά τον οργανοληπτικό έλεγχο και μέχρι το τέλος της συντήρησής τους στους 4 °C. Σε κάθε δειγματοληψία, ποσότητα 25 g από κάθε δείγμα τοποθετούνταν ξεχωριστά σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher (χωρητικότητας περίπου 400 ml) και γινόταν προσθήκη 225 ml πεπτονούχου ύδατος 0,1% (Merck, Darmstadt, Germany), ώστε να επιτευχθεί μια αρχική αραιώση 1:10. Τα δείγματα ομογενοποιούνταν σε συσκευή stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical Ltd., London, UK) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τον προσδιορισμό του πληθυσμού της O.M.X., των Ψυχρόφιλων βακτηρίων και των *Enterobacteriaceae* ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε πεπτονούχο ύδωρ (0,1%) και στη συνέχεια, γινόταν ενοφθαλμισμός δείγματος 1 ml σε διπλά τριβλία υποστρώματος Plate Count Agar (PCA, Merck) για την O.M.X. και τα ψυχρόφιλα βακτήρια καθώς και σε Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck) για τα εντεροβακτηριοειδή. Η καταμέτρηση των πληθυσμών γινόταν μετά από επώαση των τριβλίων για 72 ώρες στους 30°C για την O.M.X., για 7 ημέρες στους 7 °C για τα ψυχρόφιλα βακτήρια και για 24 ώρες στους 37°C για τα εντεροβακτηριοειδή.

#### **5.4 Στατιστική Ανάλυση**

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το test του Bartlett. Για τον έλεγχο

των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ .

### 5.5 Αποτελέσματα και συζήτηση

Οι πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων στους μάρτυρες εμφάνισαν ανάπτυξη στη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, όπως φαίνεται στα σχήματα 5.1, 5.2 και 5.3 αντίστοιχα. Οι αρχικοί πληθυσμοί της O.M.X. (4 log cfu/g), των ψυχρόφιλων βακτηρίων (3,2 log cfu/g) και των εντεροβακτηρίων (1,8 log cfu/g) βρίσκονται σε συμφωνία με αυτούς που αναφέρονται από άλλους ερευνητές σε μύδια 1 ημέρα μετά από την συλλογή τους (Caglac et al. 2008, Goulas 2008, Masniyom et al. 2012). Έτσι, οι αρχικοί πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων στους μάρτυρες αναπτύχθηκαν και έφθασαν τους 8,2 log cfu/g, τους 7,6 log cfu/g και 4,3 log cfu/g στην 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στην ψύξη, αντίστοιχα. Μετά την 8<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης των μαρτύρων στους 4 °C σταμάτησε η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, αφού δεν ήταν αποδεκτά κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων των μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε την 8<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους έδειξε ότι οι πληθυσμοί τόσο της O.M.X., όσο και των ψυχρόφιλων βακτηρίων ήταν μεγαλύτεροι από 7 log cfu/g που θεωρείται το ανώτερο όριο αποδοχής των αλιευμάτων (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF 1986). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οι Caglac et al. (2008) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί της O.M.X. και

των ψυχρόφιλων βακτηρίων σε μύδια που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ήταν μεγαλύτεροι από το όριο των 7 log cfu/g την 8<sup>η</sup> ημέρα συντήρησής τους στην ψύξη.

### **Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης**

Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στους πληθυσμούς της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων σε μύδια που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4 °C παρουσιάζεται στα σχήματα 5.1, 5.2 και 5.3 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1% οι αρχικοί πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων των μυδιών μειώθηκαν κατά 0,8 log cfu/g, 0,7 log cfu/g και 0,4 log cfu/g τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί αυτοί αυξήθηκαν και έφτασαν τους 8,1, 7,6 και 4,1 log cfu/g τη 10<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα. Από τη 2<sup>η</sup> ημέρα και καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης οι πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ( $P<0.05$ ) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2%) οι αρχικοί πληθυσμοί της O.M.X. και των ψυχρόφιλων βακτηρίων μειώθηκαν κατά περίπου 1,7 log cfu/g και 1,1 log cfu/g τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων που είχε προστεθεί το αιθέριο έλαιο σε συγκέντρωση 0,1%. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί της O.M.X. και των ψυχρόφιλων βακτηρίων αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 8,9 και 7,9 log

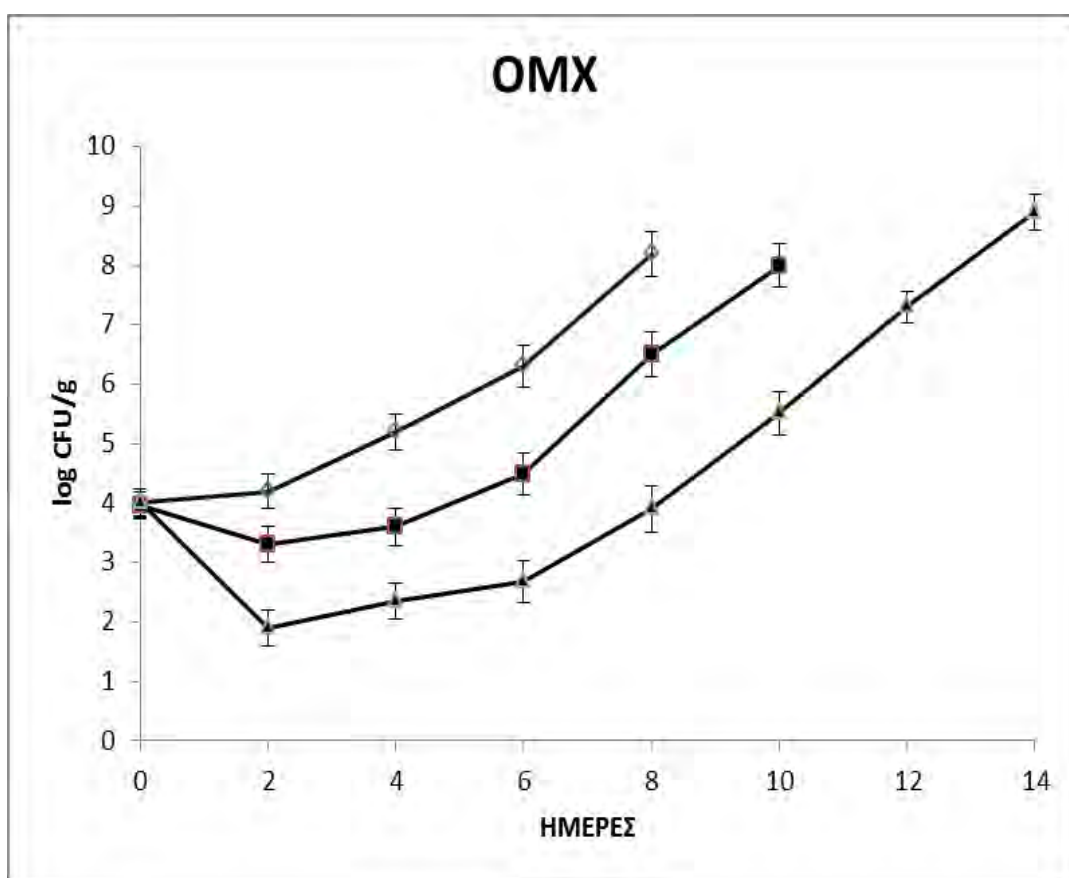


cfu/g στο τέλος της συντήρησης (14<sup>η</sup> ημέρα). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2%) παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των εντεροβακτηρίων, αφού μείωσε τους πληθυσμούς τους κάτω από το όριο ανίχνευσης από τη 2<sup>η</sup> μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Στη συνέχεια οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 4,5 log cfu/g τη 14<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Οι πληθυσμοί της O.M.X., των ψυχρόφιλων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων στα μύδια που προστέθηκε το αιθέριο έλαιο (0,2%) παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ( $P<0,05$ ) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς με την προσθήκη της συγκέντρωσης 0,1% καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη.

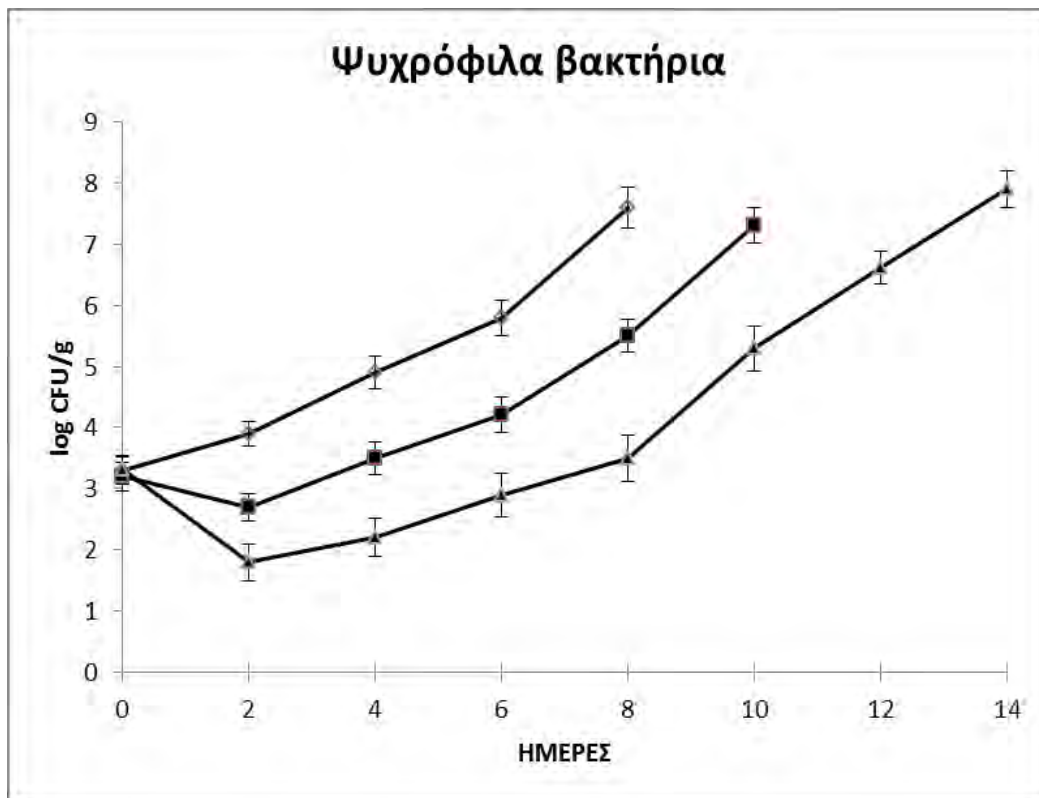
Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα εργασία για την επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μικροβιολογική κατάσταση των αλιευμάτων αναφέρονται και από άλλους ερευνητές. Οι Mexis et al. (2009) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,4% σε φιλέτα ιριδιζουσας πέστροφας (*Onchorynchus mykiss*) που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ( $P<0,05$ ) πληθυσμούς για την O.M.X και τα εντεροβακτήρια σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Ομοίως, οι Atrea et al. (2009) αναφέρουν ότι σε χταπόδι (*Octopus vulgaris*) που συσκευάστηκε υπό κενό, η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,2% και 0,4% παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ( $P<0,05$ ) πληθυσμούς για την O.M.X και τα εντεροβακτήρια σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε μια μελέτη που εξετάστηκε η επίδραση της

προσθήκης αιθέριων ελαίων (κουρκούμης και λεμονόχορτου σε συγκέντρωση 0,5%) σε μύδια (*Perna viridis*) κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες διαπιστώθηκε ότι στα δείγματα των μυδιών με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων, οι πληθυσμοί της O.M.X. και των ψυχρόφιλων βακτηρίων παρέμειναν σημαντικά ( $P<0,05$ ) χαμηλότεροι σε σχέση με τους μάρτυρες καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C (Masniyom et al. 2012).

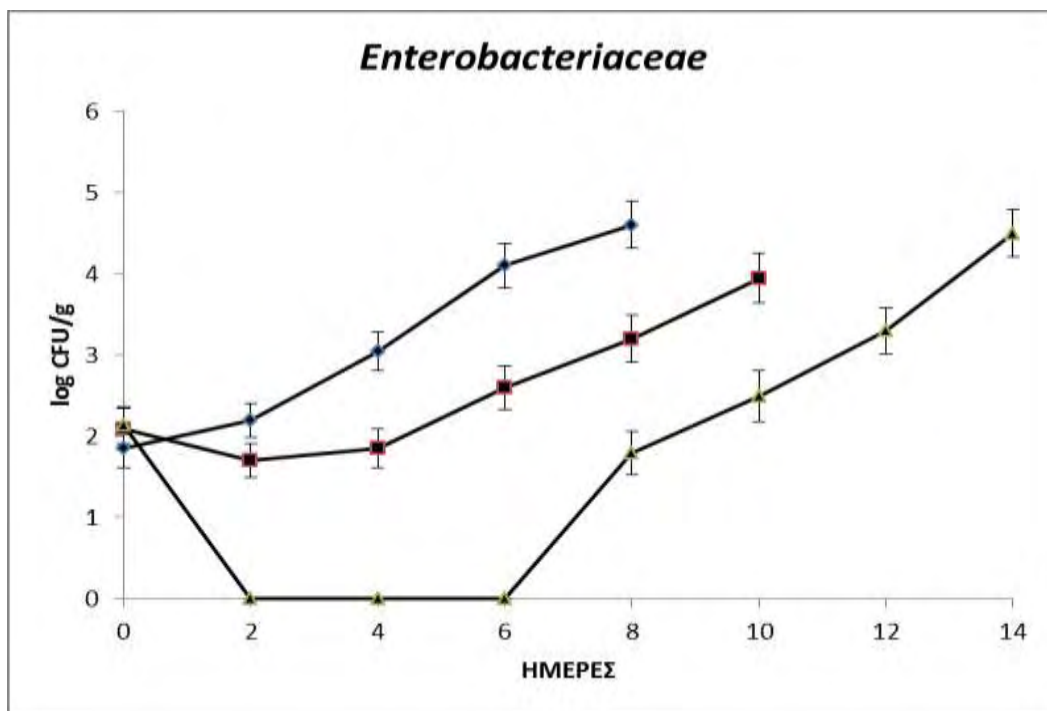
Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στα φαινολικά συστατικά τους. Ο μηχανισμός δράσης των φαινολικών αυτών συστατικών αποδίδεται στην προσβολή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της (Knobloch et al. 1986, Sikkema et al. 1994). Η βλάβη που προκαλείται στην βακτηριακή μεμβράνη οδηγεί σε απώλεια ζωτικών συστατικών και ιόντων και συνεπώς στη λύση του κυττάρου (Gustafson et al. 1998, Helander et al. 1998, Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001, Skandamis et al. 2001, Ultee et al. 2002). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη που αποτελούν τις κύριες φαινολικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και του θυμαριού παρουσίασαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά της O.M.X. σε δείγματα φιλέτων κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) που συντηρήθηκαν στους 5 και 10 °C σε αερόβιες συνθήκες (Mahmoud et al. 2004). Στη μελέτη αυτή, η προσθήκη του συνδυασμού καρβακρόλης 0,5% και θυμόλης 0,5% ( $P<0,05$ ) στα φιλέτα του κυπρίνου εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερους ( $P<0,05$ ) πληθυσμούς της O.M.X. σε σχέση με τους μάρτυρες σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων στους 5 και 10 °C, επιμηκύνοντας τη διάρκεια ζωής τους κατά 8 και 4 ημέρες, αντίστοιχα.



**Σχήμα 5.1** Επίδραση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στην Ο.Μ.Χ. σε μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη συντήρηση στους 4 °C. (-○-) μάρτυρας (CON), (■) ρίγανη 0,1%, (-^-) ρίγανη 0,2%.



**Σχήμα 5.2** Επίδραση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στα ψυχρόφιλα βακτήρια σε μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη συντήρηση στους 4 °C. (-◇-) μάρτυρας (CON), (■) ρίγανη 0,1%, (-^-) ρίγανη 0,2%.



**Σχήμα 5.3** Επίδραση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στα εντεροβακτήρια σε μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη συντήρηση στους 4 °C. (-◇-) μάρτυρας (CON), (■) ρίγανη 0,1%, (-^-) ρίγανη 0,2%.

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

### 6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *V. parahaemolyticus* *in vitro*.

#### 6.1 Εισαγωγή

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης τεσσάρων συγκεντρώσεων του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2, 0,4, 0,6% και 0,8 %) κατά του παθογόνου βακτηρίου *V. parahaemolyticus* σε *in vitro* συνθήκες.

#### 6.2 *V. parahaemolyticus*

Το στέλεχος του παθογόνου *V. parahaemolyticus* υποβαλλόταν σε αναζωογόνηση με επώαση σε 50 ml ζωμού Tryptic Soya Broth (TSB) (Oxoid, Basingstoke, UK) με χλωριούχο νάτριο (NaCl) 2% (Scharlau, Sentmenat, Spain) στους

37° C για 24 ώρες με δύο διαδοχικές καλλιέργειες αναζωογόνησης. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα που προέκυπτε από τη φυγοκέντρηση, πλενόταν δύο φορές με 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) (Oxoid), pH 7 και αραιωνόταν με PBS σε  $1,0 \times 10^8$  cfu/ml. Το κυτταρικό εναιώρημα χρησιμοποιούταν για την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος (καλλιέργεια χρήσεως). Ο προσδιορισμός του πληθυσμού του παθογόνου του ενοφθαλμίσματος γινόταν με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε πεπτονόχο ύδωρ (0,1%) 1:10 και καταμέτρηση σε διπλά τριβλία με Tryptone Soy Agar (TSA) (Oxoid) με την προσθήκη NaCl 2% (Scharlau, Sentmenat, Spain). Η καλλιέργεια χρήσεως περιείχε τελικό βακτηριακό πληθυσμό περίπου  $10^4$  cfu/ml.

### **6.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζωμό TSB**

Σε 40 ml αποστειρωμένου ζωμού TSB (Oxoid, Basingstoke, UK) με την προσθήκη NaCl 2%, σε γυάλινους περιέκτες (100 ml) με βιδωτό πώμα, γινόταν προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0, 0,2, 0,4, 0,6% και 0,8 %.

Στη συνέχεια γινόταν ο ενοφθαλμισμός του παθογόνου *V. parahaemolyticus* και ακολουθούσε επώαση στους 37 ° C για 32 ώρες. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων γινόταν την 0, 4, 8, 12, 16, 24 και 32 ώρα της επώασης στους 37 °C. Τα δείγματα αραιώνονταν με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε στείρο πεπτονόχο ύδωρ (0.1%) και στη συνέχεια γινόταν ενοφθαλμισμός 0,1 ml στην επιφάνεια διπλών τριβλίων εκλεκτικού υποστρώματος TCBS (Scharlau, Sentmenat, Spain). Τα τριβλία

στην συνέχεια επωάζονταν στους 37 °C για 24 - 48 ώρες.

#### **6.4 Στατιστική επεξεργασία**

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις). και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.

#### **6.5 Αποτελέσματα και συζήτηση**

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2, 0,4, 0,6 και 0,8%) στο θρεπτικό ζωμό κατά του παθογόνου *V. parahaemolyticus* παρουσιάζεται στο σχήμα 6.1.

Οι αρχικοί πληθυσμοί του παθογόνου βακτηρίου (4,2 log cfu/ml) στο θρεπτικό ζωμό χωρίς την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης αναπτύχθηκαν ανά τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C φτάνοντας τους 9,4 log cfu/ml την 32<sup>η</sup> ώρα.

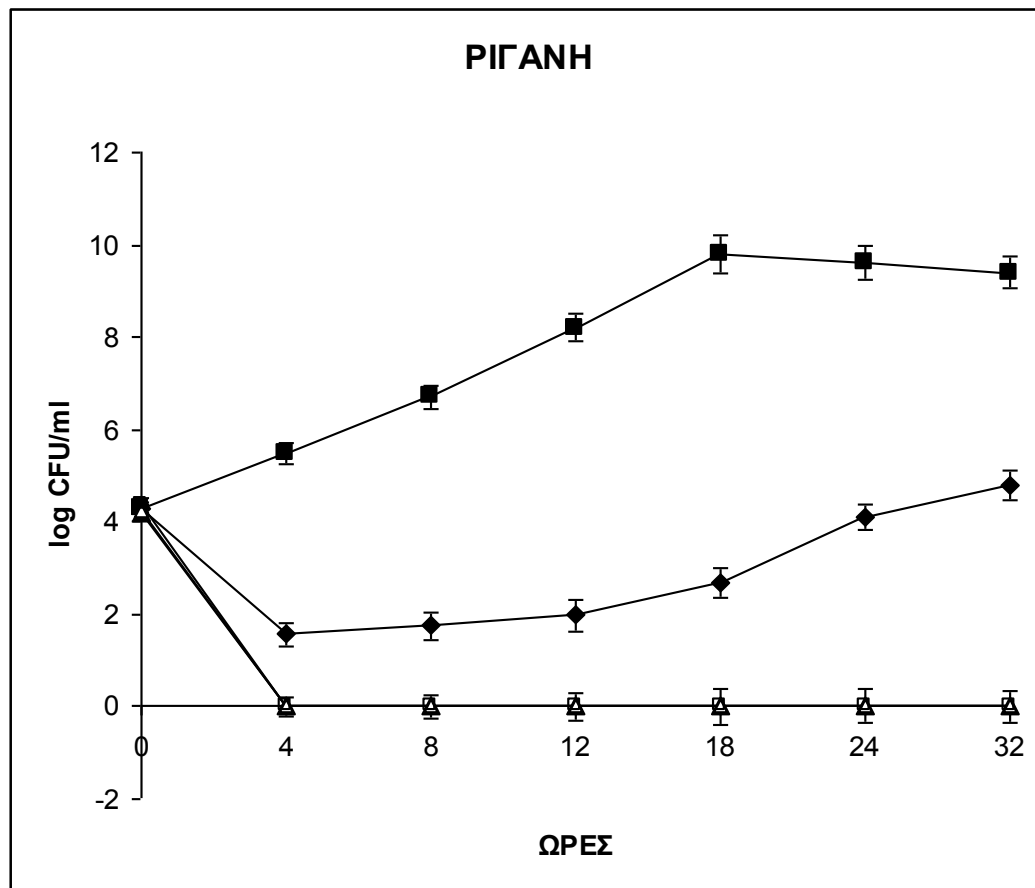
Με την προσθήκη 0,2% του αιθέριου ελαίου ρίγανης στο ζωμό TSB οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* μειώθηκαν περίπου κατά 2,7 log cfu/ml την 4<sup>η</sup> ώρα και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 4,82 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί του παθογόνου που καταμετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου σε συγκέντρωση 0,2% ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0.05$ ) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων από την 4<sup>η</sup> και μέχρι την 32<sup>η</sup> ώρα της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση από την προσθήκη 0,2% ελαίου ρίγανης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής καθόσον οι πληθυσμοί του



*V. parahaemolyticus* παρά την αρχική μείωση (4<sup>η</sup> ώρα επώασης) αναπτύχθηκαν και έφτασαν σε υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης στους 37 °C.

Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου σε συγκέντρωση 0,4% παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου μειώνοντας τους αρχικούς πληθυσμούς κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4<sup>η</sup> μέχρι την 18<sup>η</sup> ώρα επώασης. Στη συνέχεια οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 3,1 log cfu/ml την 32<sup>η</sup> ώρα επώασης.

Η προσθήκη 0,6% και 0,8% του αιθέριου ελαίου ρίγανης στο TSB μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C.



**Σχήμα 6.1** Αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του *V. parahaemolyticus* *in vitro* στους 37 °C για 32 ώρες. (-■-) μάρτυρας, (-◆-) ρίγανη 0,2 %, (-^) ρίγανη 0,4 %, (-Δ-) ρίγανη 0,6 %, (-□-) ρίγανη 0,8 %.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οι Yano et al. (2006) αναφέρουν την αναστολή του *V. parahaemolyticus* από το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 0,5% *in vitro* κατά την επώαση στους 5 °C και 30 °C. Ομοίως, οι Paredes-Aguilar et al. (2007) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου βακτηρίου σε συγκέντρωση 0,2 % σε 90

θρεπτικό υπόστρωμα κατά την επώαση στους 5 °C και 35 °C, η οποία ήταν ισχυρότερη στους 35 °C. Τέλος, οι Lin et al. (2005) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1% παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus* σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Tryptic Soya Broth) κατά την επώαση στους 37 °C.

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup>

### 7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΚΑΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *V. parahaemolyticus* ΣΕ ΜΥΔΙΑ

#### 7.1 Εισαγωγή

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,2% που ήταν οργανοληπτικά αποδεκτές όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, σε μύδια κατά του *V. parahaemolyticus* στη συντήρησή τους στην ψύξη (4 °C) υπό αερόβιες συνθήκες.

#### 7.2 Παρασκευή των δειγμάτων

Τα δείγματα των μυδιών παρασκευάζονταν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2. Πριν την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης ή τον ενοφθαλμισμό με το *V. parahaemolyticus*, τα μύδια υποβάλλονταν στην επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας για 15 λεπτά, όπως περιγράφεται από τους Lin et al. (2005) για τον περιορισμό της φυσιολογικής χλωρίδας τους. Επίσης, πριν τον ενοφθαλμισμό και την προσθήκη του αιθέριου ελαίου γινόταν μικροβιολογικός έλεγχος των δειγμάτων για την Ο.Μ.Χ. και την παρουσία του παθογόνου.

Στη συνέχεια, τα «στείρα» δείγματα μυδιών τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher ακολουθούσε η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0% (CON), 0,1% ή 0,2%. και ο ενοφθαλμισμός τους με το *V. parahaemolyticus* σε πληθυσμούς 4 log cfu/g. Τα ενοφθαλμισμένα δείγματα μυδιών

μέσα στις σακούλες stomacher υποβάλλονταν σε ήπια μάλαξη όπως περιγράφεται από τους Attouchi and Sadoc (2011) για 2 λεπτά για την ομοιόμορφη κατανομή του αιθέριου ελαίου, συσκευάζονταν σε αερόβιες συνθήκες και συντηρούνταν στην ψύξη για 14 ημέρες.

### **7.3 Μικροβιολογική ανάλυση**

Σε κάθε δειγματοληψία, ποσότητα 25 g από κάθε δείγμα τοποθετούνταν ξεχωριστά σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher (χωρητικότητας περίπου 400 ml) και γινόταν προσθήκη 225 ml πεπτονόχου ύδατος 0,1% (Merck, Darmstadt, Germany), ώστε να επιτευχθεί μια αρχική αραιώση 1:10. Τα δείγματα ομογενοποιούνταν σε συσκευή stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical Ltd., London, UK) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε πεπτονόχο ύδωρ (0.1%) και στη συνέχεια, γινόταν ενοφθαλμισμός δείγματος 0.1 ml στην επιφάνεια διπλών τριβλίων εκλεκτικού υποστρώματος TCBS (Scharlau, Sentmenat, Spain). Τα τριβλία στην συνέχεια επωάζονταν στους 37 °C για 24 - 48 ώρες.

### **7.4 Στατιστική επεξεργασία**

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις) και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.

### **7.5 Αποτελέσματα και συζήτηση**

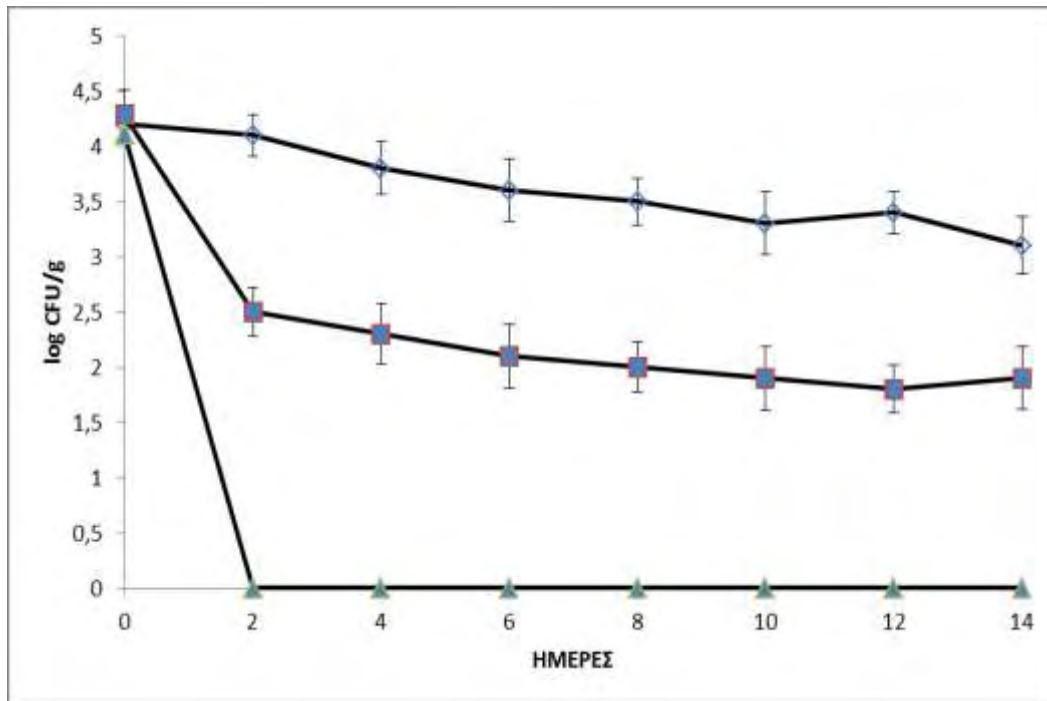
Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στους πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* σε μύδια που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4 °C παρουσιάζεται στο σχήμα 7.1.

Στα δείγματα με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1% οι αρχικοί πληθυσμοί του παθογόνου (4 log cfu/g) μειώθηκαν κατά 1,5 log cfu/g τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Στη συνέχεια, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ( $P<0,05$ ) φτάνοντας τους 2 cfu/g τη 14<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στην ψύξη. Στα δείγματα με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0,1%) οι πληθυσμοί του βακτηρίου ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ( $P<0,05$ ) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης των μυδιών στους 4 °C.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2%) οι αρχικοί πληθυσμοί του παθογόνου (4 log cfu/g) μειώθηκαν τη 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και μέχρι το τέλος της συντήρησης (14<sup>η</sup> ημέρα) κάτω από το όριο ανίχνευσης. Συνεπώς, η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0,2%) παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus*, αφού μείωσε τους πληθυσμούς του κάτω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη.

Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του *V. parahaemolyticus* σε μύδια. Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Lin et al. (2005) κατά του παθογόνου σε γαρίδες και φιλέτα βακαλάου. Τα αποτελέσματα του πειραματισμού έδειξαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1% παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση παρουσιάζοντας

σημαντικά χαμηλότερους ( $P < 0,05$ ) πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* σε σχέση με τους μάρτυρες κατά τη συντήρηση των παραπάνω αλιευμάτων στους 4 °C για 8 ημέρες. Μάλιστα η προσθήκη συνδυασμού (σε συγκέντρωση 0,1%) του αιθέριου ελαίου ρίγανης με αιθέριο έλαιο από φίγγι, μείωσε τους πληθυσμούς του παθογόνου κάτω από το όριο ανίχνευσης από την 6<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη σε αερόβιες συνθήκες.



**Σχήμα 7.1** Αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του *V. parahaemolyticus* σε μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) κατά τη συντήρηση στους 4 °C. (-◇-) μάρτυρας (CON), (■) ρίγανη 0,1%, (-▲-) ρίγανη 0,2%.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ahmed F (1991) Safety food. Institute of Medicine. Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products. Washington, D.C. National Academy Press.

Alam MJ, Miyoshi S, Shinoda S (2003) Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. *Environmental Microbiology*. 5: 706–710.

Attouchi M and Sadok S (2011) The effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Food and Bioprocess Technology*. In Press.

Backer LC, Fleming LE, Rowan AD and Baden DG (2003) Epidemiology, public health and human diseases associated with harmful marine algae. *Manual on Harmful*



Marine Microalge. UNESCO. Edited by G.M. Hallegraef, D.M. Anderson and A.D. Cembella. ISBN 92-3-103871-0, p 723-729.

Baden DG, Fleming LE and Bean JA (1995) Marine toxins. Handbook of Clinical Neurology. 21: 141-167.

Bayne BL (1973) Physiological changes in *Mytilus edulis* induced by temperature and nutritive stress. Mar. Biol. ASS. U.K., p 39-58.

Bayne BL, Thomson RJ, Widdows J (1973) Some effects of temperature and food on the rate of oxygen consumption by *Mitilus edulis* L. In: Wieser, W. ed Effects of temperature on ectothermic organisms Springer – Verlag . Berlin. p 181- 193.

Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB (2002 $\alpha$ ) The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. Meat Science. 62: 259-265.

Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki G, Spais AB (2002 $\beta$ ) Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and atocopherol acetate supplementation. Food Research International. 36: 207-213.

Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou E, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G (2003 $\alpha$ )  
Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate  
supplementation in longterm frozen turkey meat. *Journal of Agricultural and  
Food Chemistry*. 51: 2930-2936.

Botsoglou NA, Grigoropoulou SH, Botsoglou EN, Govaris A, Papageorgiou G (2003 $\beta$ )  
The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in lipid  
oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*.  
65: 1193-1200.

Broek MJM, Mossel DAA, Eggenkamp ALI (1978) Occurrence of *Vibrio*  
*parahaemolyticus* in Dutch Mussels, *Applied and Environmental Microbiology*.  
22: 438-442.

Burdach JE, Ryther J.H, MCLarney (1972) *Aquaculture : The Farming and Husbandry  
of freshwater and marine organisms*. Wiley- Interscience. New York. p.300

Burt S (2004) Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in  
foods –a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.

- Caglak E, Cakli S, Kilinc B (2008) Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*. 226:1293–1299.
- Chao G, Jiao X, Zhou X, Yang Z, Huang J, Zhou L, Qian X (2009) Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. *Food Control*. 20: 907–912.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000) The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 88: 170–175.
- Daferera D, Zigas B, Polissiou M, (2000) GC- MS Analysis of essential oils from some Greek Aromatic Plants and their Fungitoxicity on *Pencillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2576-2581.
- Daniels NA, Ray B, Easton A, Marano N, Kahn E, McShan L, Del Rosario L, Baldwin T, Kingsley MA, Puhr ND, Wells JG, Angulo FJ (2000) Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA*. 284: 1541–1545.

- Delamotte M. (1994) Κοχύλια από τις Ελληνικές θάλασσες. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Αθήνα, p. 320.
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM (1990) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in the U.S. coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2299–302.
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers JC, Cook DW (2000) Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997, 1998). *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4649–4654.
- Donatella O, Francescal L, Rocchegianni E, Cenonico C, Mioni R, Carraturo A (2010) Prevalence serotyping and molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels from Italian growing areas, Adriatic Sea, *Environmental Microbiology Reports*. 17: 192-197.
- Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G, Salamoura A., Kansouzidou A., and Levidiotou S ( 2003) Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 12: 273-279.

- Dorman HJD and Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 8: 308– 316.
- Drake SL, DePaola A, Jaykus LA., (2007), An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comp Rev Food Sci Food Saf*. 6: 120 -144.
- El-Baroty GE (1997) Antimicrobial and antioxidant activities of some essential spice oils. *Journal of Agricultural Science of Mansoura University*. 22, 1223-1233.
- Eto K (1977) Pathology of Minamata disease. *Toxicology Pathology*. Nov-Dec. 256:614-23.
- European Commission (2007) Adapting to Climate Change in Europe – Options for EU Action. Green Paper from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions, COM(2007)354 final, SEC(2007) 849, European Commission Brussels.
- Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D (2002) Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and Summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5294-5299.

FAO (1998) Food Quality and Safety Systems – A Training Manual on Food Hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System Publishing Management Group, FAO Information Division. ISBN 92-5-104115-6. Rome.

FAO (2000) The state of World Fisheries and Aquaculture 2000, UN Food and Agriculture Organisation document number ISBN 92-5-104492-9.

FDA (Food and Drug Administration), (2006) *Vibrio cholerae* Serogroup O1. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition.

Fernández ML, Shumway S, and Blanco J (2003) Management of shellfish resources. Manual on Harmful Marine Microalgae. Edited by G.M. Hallegraeef, D.M. Anderson and A.D. Cembella. ISBN 92-3-103871-0, UNESCO, p 668-672.

Force M, Sparks S, Ronzio R (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano *in vivo*. *Phytotherapy Research*. 14; 213-214.

Friedman M, Buick R, Elliott T (2004). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 67: 1774-78.

Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB (2003) Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *E. tenella*. Archives of Animal Nutrition. 57: 99-106.

Gibbons S (2007) Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weakness and opportunities Hanta med,73:798.

Gill AO, Holley A (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham.IntS. Food Microbial, 73:83-92.

Goulas AE (2008) Combined effect of chill storage and modified atmosphere packaging on mussels (*Mytilus galloprovincialis*) preservation. Packaging Technology and Science. 21: 247–255.

Govaris A, Botsoglou N, Papageorgiou G, Botsoglou E, Ambrosiadis I (2004) Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or alpha-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 55: 115-123.

Greuter W, Burdel HM. (1986) Medial Checklist. In Editions of *Conservatoire de Jardin Botaniques de la vile de Geneve* Vol 3.

Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 194–198.

Hallegraeef GM (2003). Harmful algal blooms: a global overview. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Edited by G.M. Hallegraeef, D.M. Anderson and A.D. Cembella. ISBN 92-3- 103871-0. UNESCO, p 25-27.

Halstead B (2002) The Microbial Biogenesis of Aquatic Biotoxins. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 12:2, 135 – 153.

Harrigan WF, and Park WA (1991). *Making Safe food: A management guide for microbiological quality*. London San Diego Academic Press. ISBN, p. 122-130.

Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3590–3595.

Hervio D., Zidane M., Lozach S., Vaillant V., Pommepauy M. ( 2005) Toxi-infection salimentaires collectives liees a la consommation des moules contaminees par *Vibrioparahaemolyticus*. *Bulletin Epidemiologique* No 17 Juin. Hiras K, Takeman M. 1998, *Spice science and technology* New York :Markel Denker



Ibrir F, Greathead HMR, Forbes JM (2001) The effect of thymol/carvacrol on the performance of broiler chickens infected with *Eimeria acervulina*. Proceedings of workshop on alternatives to feed antibiotics and anticoccidials in the Pig and Poultry Meat Production, Oslo, Norway.

ICMSF- International commission on microbiological specifications for foods (1986) Sampling plans for fish and shellfish. In *ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*, Vol. 2, ICMSF (ed.). University of Toronto Press: Toronto, Canada, 1986: 181–196.

Ifremer (2003) Guide pour les toxines paralysantes (PSP). Direction de l'Environnement. p 345-394.

Ismael A A, Pierson MD (1990) Effect of sodium nitrite and organisme oil on growth and toxin production of *Clostridium bolulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of food Protection* .p. 958-960

Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB (1982) *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. *Crit Rev Microbiol*. 10: 77–124.

Juglal S, Govinden R, Odhav B (2002) Spice oils for the control of co-occurring Mycotoxin-Producing Fungi. *Journal of Food Protection*. 65: 683-687.

Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H (1994) Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76: 626– 631.

Kaysner CA, DePaola A (2001) *Vibrio*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Downes FP, Ito K (Eds.), 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC, p. 405–420.

Koff RS, (1992), Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine* 10 (Suppl 1):S15-17.

Kokkini S (1994) Herbs of the Labratae, In *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. p. 2342-2348.

Koutsoumanis K, Lambropoulou K, Nychas GJE (1999). A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*. 49, 63-74.

Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1: 119– 128.

Kumangai M, Yanagi T, Murata M, Yasumoto T, Kat M and Rodriguez-Vazquez JA. (1986) Okadaic Acid as the Causative Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. *Agriculture Biological Chemistry*. 50(11):2853- 2857.

Lambert RJV, Skandamis PN, Coote Pj, Nychas G-JE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J appl Microbiol*. 91:453-462.

Lin YT, Labbe RG, Shetty K (2005) Inhibition of *V. parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 453 – 458.

Marotii M., Piccaglia R, Giovanelli E, Deans SG, Eaglesham E., (1994), Effects of planting time and mineral fertilization on Peppermint Essential oil Composition and its Biological Activity, *Flavour Fragsance*. 9:125-129.

Martinez-Urtaza JM, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Carrera-Flores D, Rey-Alvarez C, Pousa A (2005) Pandemic

*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. Europe. Emerg Infect Dis. 8: 1319–1320.

Mahmoud B.S.M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik, S., Dong-Suk C., Suzuki T.,  
(2004) Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension  
by essential oils compounds. Food Microbiology. 21: 657–666.

Masniyom P, Benjama O, Maneesri J (2012) Effect of turmeric and lemongrass  
essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel  
(*Perna viridis*). International Journal of Food Science and Technology. 47:  
1079–1085.

Mejlholm O and Dalgaard P (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the  
seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media  
and fish products. Letters in Applied Microbiology. 34, 27– 31.

Mexis SF, Chouliara E, Kontominas MG (2009) Combined effect of an oxygen  
absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets  
stored at 4 °C. Food Microbiology. 26: 598–605.

Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, Yamai S (1969) In vitro  
hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with  
human pathogenicity. J Bacteriol. 100: 1147–1149.

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya S, Dutta B, Takeda Y and Sack DA (2007) Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *J Clin Microbiol Rev.* 20: 39–48.

NAS (1980) The international Mussel Watch .National Academy of sciences, Washington,DC.

Nishibuchi M, Kaper JB (1995) Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Mini review. *Infect Immunol.* 63: 2093–2099.

Normanno G., Parisi A., Addante N., Quaglia N.C., Dambrosio A., Montagna C., Chiocco D., (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 219-222.

Ozcan G, Sagdic O, Ozcan M (2003). Note: Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International.* 9:85-88.

Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S,  
109

Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M (1997) Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group.

Oliver JD and Kaper J (2007) *Vibrio* species. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd edn. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (eds). Washington, DC, USA: American Society of Microbiology, p. 343–379.

Ono C, Yoshimatsu S and Matsuoka S (1996) Monitoring system of harmful and toxic phytoplankton in Kagawa Prefecture, Japan. Harmful and Toxic Algal Blooms, *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*.

Papadopoulou C, Economou E, Zakas G, Salamoura C, Dontorou C, Apostolou J (2007) Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. *J Food Qual.* 30: 28–42.

Papaevangelou G (1992) Epidemiology of hepatitis A in Mediterranean countries. *Vaccine* 10 Suppl. 1:S63-6.

Paredes-Aguilar MDLC, Gastélum-Franco MG, Silva-Vázquez R, Nevárez-Moorillón GV (2007) Antimicrobial effect of Mexican oregano (*Lippia*

berlandieri Schauer) and its essential oil against five *Vibrio* species. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 261-267.

Prabuseenivasum S, Jagakumar M, Ignacimuthus S (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils *BNC Complem Altren Med*. 6:39-50.

Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R., and Donelli G ( 2005) Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment. *Oceans and Health-Pathogens in the Marine Environment*. Edited by Belkin and Colwell, Springer, New York, p 227-229.

Ripabelli G., Sammarco M.L., Grasso G.M., Fanelli I., Caprioli A., Luzzi I., (1999), Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* harvested from Adriatic Sea, Italy. Elsevier. *International Journal of Food Microbiology*. 49:43-48.

Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S (2002) Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 19:473-480.

Seed (1969) The ecology of *Mytilus edulis* Lamellibranchata on exposed rocky shores 11: growth and mortality. *Oecologia*. p 317- 356.

Seed (1976) Ecology of marine mussels In :B.l Bayne (Ed). Marine mussels: their ecology and physiology . Cambridge University Press London. p 13-65.

Sherman P.W, Billing J (1999) Darwinian gastronomy: why we use spices, BioSci. 49:453-463.

Sidari L, Nichetto P, Cok S, Sosa S, Tubaro A, Honsell G, end Della Loggia R (1998) Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning, Marine Biology. 131: 103-111.

Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biology and Chemistry. 269: 8022–8028.

Skandamis PN, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas GJE (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Italian Journal of Food Science. 13:65-75.

Skandamis PN, Tsigarida E, Nychas GJE (2002β) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. Food Microbiology. 19: 97-103.



- Skandamis PN, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas GJE (2001) Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Italian Journal of Food Science. 13: 65-75.
- .
- Snoussi M, Hajlaoui H, Noumi E, Usai D, Sechi LA, Zanetti S, Bakhrouf A (2008) In-vitro anti-Vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. World Journal Microbiology Biotechnology. 24: 3071–3076.
- Soumaya K, Kuhne M ( 2009) Occurrence of *Vibrio spp.* In blue mussels (*Mytilus Edulis*) from German Wadden Sea, International Journal of Food Microbiology. p 297-300.
- Su YC, Duan J, Wu WH (2005) Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Protect. 68:1454–1456.
- Terzi G, Buyuktanır O and Yurdusev N (2009) Detection of the tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey. Lett Appl Microbiol. 49: 757–763.
- Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano

essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*. 89:901–909.

Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 174: 233– 238.

Ultee A, Bennik MKJ, Moezelaar R (2002) The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol is Essential for action against the Food-Born Pathogen *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol*. 68: 1561-1568.

Valero M, Salmeron MC (2003) Antibacterial activity of essential oils against *Bacillus cereus*. *Ints Food Microbial*. 85:73-81

Wagley S, Koofhethilea K, Winga JB and Rangdalea R (2008) Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK *Internat. Journal of Environmental Health Research*. 18: 283–293.

Walne PR (1974) *Culture of bivalve molluscs : 50 years experience at Comyy West Bytleet*. Fishing News (Books), p 179.

Yagnisis M, Alexis M, Solomakos N, Govaris A, Golomazou H, Athanassopoulou F (2007) *Vibrio* species of medical importance, isolated from seawater and

marine fish in Greece. Proceedings of the 13th National Congress on Ichthyology, p. 515-518.

Yanishieva NY, Martinova EM, Gordon MH, Reneva VG (1999) Antioxidant phenolic glycosides from sage. *Journal of Natural Products*. 62:454-456.

Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Gu RX (2008) Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. *International Journal of Food Microbiology*. 125:279–285.

Yano Y, Satomi M, Oikawa H (2006) Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 111:6–11.

Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978) Occurrence of a new type of Shellfish poisoning in the Tohoku District. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 44:1249-1255.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

Αθανασοπούλου Φωτεινή (2007) Ζωοανθρωπονόσοι προερχόμενες από το υδάτινο περιβάλλον, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Κτηνιατρικής, Καρδίτσα.

Αναγνωστόπουλος Κ (1999) Μικροβιολογικός φόρτος των οστρακοειδών. Ημερίδα με θέμα τη μυδοκαλλιέργεια. Πύδνα 27/05/1999. Οργάνωση: Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Πιερίας.

Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ ( 2001) Ασφάλεια Τροφίμων. Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Εκδόσεις University Studio Press A.E. Θεσσαλονίκη. ISBN: 960-12-0913-1, σελ. 15, 212-217.

Αρσένη Α.,(1994)Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των Λοιμώξεων, Ιατρικές Εκδόσεις «ΖΗΤΑ», 4η Έκδοση, ΑΘΗΝΑ.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή ( 2001) Κρατική ενίσχυση Ν 332/2000 – Ελλάδα. Ζημιές στον τομέα της μυτιλοκαλλιέργειας/οστρεοκαλλιέργειας, Βρυξέλλες SG, (2001) D/290912.

Ο.Η.Ε (1999) United Nations International Trade Yearbook, 1999.

Κοβάτσης Α (1992) Στοιχεία τοξικολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ.168-185

Κριάρης Ν (1973) *Mytilus galloprovincialis* και εποχιακές διακυμάνσεις των προνυμφών του. Ελληνική Ωκεανολογία και Λιμνολογία. Πρακτικά του Ινστιτούτου Ερευνών Ωκεανολογίας και Αλιευμάτων, Αθήνα, σελ. 167-177.

Κυριαζή-Παπαδοπούλου Α (2002) Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση της σάρκας του μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*). Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Θεσσαλονίκη.

Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ (1992) Γενική Ζωολογία, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ.147-150.

Μητσούδη Σ (1999) Οι μυδοκαλλιέργειες του νομού Θεσσαλονίκης. Ημερίδα με θέμα τις μυδοκαλλιέργειες και την προστασία του φυσικού περιβάλλοντος, Δήμος Χαλάστρας Θεσσαλονίκης.

Νικολαΐδης Γ (1999) Σχεδιασμός και υλοποίηση του προγράμματος παρακολούθησης των μυδοκαλλιεργειών στο Θερμαϊκό κόλπο σχετικά με το τοξικό φυτοπλαγκτόν. Ημερίδα με θέμα τη μυδοκαλλιέργεια και τις προοπτικές της. 27/05/1999, Πύδνα, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Πιερίας.

Παπαναστασίου Δ (1990) Τεχνολογία και ποιοτικός έλεγχος αλευμάτων. Τόμος Β΄,

Εκδόσεις «ΙΩΝ», Αθήνα. σελ.: 63-115.

Σακκάς Η (2007) Η μελέτη της Αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων.

Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Σαρρής Κ, Ηλιάδης Ν, Μπουρτζή-Χατζοπούλου Ε, Κουμπατή-Αρτοποιού Μ (1986)

Μαθήματα γενικής και ειδικής μικροβιολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Θεσσαλονίκης, Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2005) Η ανάπτυξη των

οστρακοκαλλιεργειών στην Ελλάδα. Έκδοση Αγροτικής Τράπεζας.

Χαρβαλά Α (1994) Αλκαλοειδή και μη μορφοποιημένες δρόγες, Διδακτορική

Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

