



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

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ
ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ ΣΕ ΦΙΛΕΤΑ ΥΓΡΑΛΑΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΨΥΞΗ
ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*»**

της
**Ρέτσιου Αποστολίας του ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2015



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

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ
ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ ΣΕ ΦΙΛΕΤΑ ΥΓΡΑΛΑΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΨΥΞΗ
ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΥ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*»**

της
**Ρέτσιου Αποστολίας του ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Στη μνήμη του πατέρα μου

Περίληψη

Η αλάτιση αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησης των αλιευμάτων και ιδιαίτερα του μπακαλιάρου, λόγω του χαμηλού συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w). Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι το συχνότερο αίτιο τροφιμογενούς λοίμωξης που οφείλεται στην κατανάλωση αλιευμάτων παγκοσμίως, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά του *V. parahaemolyticus* σε υγράλατο μπακαλιάρο κατά τη συντήρηση στους 4° C και 10° C.

Δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου ενοφθαλμίστηκαν με το παθογόνο (περίπου 10^4 cfu/g) και συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες (AIR) ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (N₂ 30% - CO₂ 70%- MAP). Οι πληθυσμοί του παθογόνου προσδιορίζονταν κάθε 3 ημέρες κατά τη συντήρηση στους 4° C ή 10° C για 30 ημέρες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος για την οσμή, τη γεύση και τη συνολική αποδοχή δειγμάτων AIR και MAP που δεν είχαν ενοφθαλμιστεί με *V. parahaemolyticus*.

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικής εξέτασης έδειξαν ότι τα δείγματα του AIR και MAP παρέμειναν αποδεκτά για την οσμή, τη γεύση και τη συνολική αποδοχή μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4° C ή 10° C για 30 ημέρες.

Ο μικροβιολογικός έλεγχος των δειγμάτων AIR έδειξε ότι οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* (4 log cfu/g) μειώθηκαν την 3^η ημέρα και από την 12^η και 21^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό στους 4° C και 10° C, αντίστοιχα.

Στα δείγματα MAP, οι αρχικοί πληθυσμοί του παθογόνου μειώθηκαν κατά 1,4 και κατά 0,9 log cfu/g την 3^η ημέρα στους 4° C και 10° C αντίστοιχα, στατιστικά σημαντικά ($P<0.05$) χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* στα δείγματα AIR. Στη συνέχεια, από την 6^η και 9^η ημέρα έως και το τέλος της συντήρησης στους 4° C και 10° C αντίστοιχα, το παθογόνο ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό στα δείγματα MAP.

Λέξεις – κλειδιά : Υγράλατος μπακαλιάρος, συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, *V. parahaemolyticus*

Abstract

Salting is one of the oldest methods of preserving fish, especially cod, by lowering the water activity. *Vibrio parahaemolyticus* is the most common causative agent of seafood-associated bacterial gastroenteritis worldwide, which can grow in high salt concentrations. Objective of this work was to evaluate the effect of modified atmosphere packaging (MAP) against *V. parahaemolyticus* in wet-salted cod during storage at 4 °C and 10°C.

Wet salted cod (*Gadus morhua*) slices were artificially inoculated with *V. parahaemolyticus* (ca 10⁴ cfu/g) and packed aerobically (AIR) or under modified atmosphere packaging conditions (N₂ 30% - CO₂ 70%- MAP). Populations of the pathogen were determined at 3 day intervals during storage at 4 °C or 10°C for 30 days. Sensory evaluation for odor, taste and overall acceptability was also conducted in uninoculated AIR and MAP samples.

Sensory analysis showed that AIR and MAP samples of wet-salted cod remained organoleptically acceptable up to the end of storage at both storage temperatures.

Microbiological analysis of inoculated AIR samples showed that populations of the pathogen after an initial decrease on day 3, from the 12th and 21st day of storage at 4 °C and 10°C respectively, were detected only after enrichment.

Group MAP samples presented significantly lower (P<0.05) populations of *V. parahaemolyticus* than AIR samples on day 3. Thereafter, from day 6 and 9 at 4 °C and 10°C respectively and up to the end of storage, populations of the pathogen were detected only after enrichment.

Key – words : wet-salted cod, modified atmosphere packaging, *V. parahaemolyticus*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

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

ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

1.1	ΓΕΝΙΚΑ	5
1.2	Ο ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ ΤΟΥ ΑΤΛΑΝΤΙΚΟΥ (<i>GADUS MORHUA</i>)	8
1.2.1	ΓΕΝΙΚΑ	8
1.2.2	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	8
1.2.3	ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>G. MORHUA</i>	10
1.3	Ο ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	11
1.4	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	12
1.4.1	ΑΛΑΤΙΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	12
1.4.2	ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	14
1.4.3	ΚΑΠΝΙΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	15
1.5	Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ ΣΗΜΕΡΑ	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : *VIBRIO PARAHAEVOLYTICUS*

2.1	ΓΕΝΙΚΑ	19
2.2	ΒΙΟΛΟΓΙΑ	20
2.2.1	ΣΧΗΜΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	20
2.2.2	ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	21
2.2.3	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	24
2.2.4	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	25
2.2.5	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	27
2.2.6	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ	27
2.3	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	31
2.4	ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΞΑΠΛΩΣΗ	35
2.5	Το <i>V. PARAHAEVOLYTICUS</i> ΣΗΜΕΡΑ	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΥΠΟ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

3.1	ΓΕΝΙΚΑ	42
3.2	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	45
3.3	ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	47
3.3.1	ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (CO ₂) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	47
3.3.2	ΟΞΥΓΟΝΟ (O ₂) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	50
3.3.3	ΑΖΩΤΟ (N ₂) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	50
3.3.4	ΑΛΛΑ ΑΕΡΙΑ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	51
3.4	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ ΣΕ ΨΑΡΙΑ	51
3.4.1	ΓΕΝΙΚΑ	51
3.4.2	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	53

3.5	ΥΛΙΚΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	55
3.6	ΘΕΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ	57
ΜΕΡΟΣ 2^ο		60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		
4.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	60
4.2	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	63
4.3	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	64
4.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
5.1	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	66
5.2	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		
7.1	ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73
7.2	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΤΟ INTERNET	79

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικόλαο Σολωμάκο (επίκουρος καθηγητής Π.Θ.), για την πολύτιμη καθοδήγησή του όσον αφορά τη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Ανδρεάνα Πεξάρá (επίκουρος καθηγήτρια Π.Θ), για την ουσιαστική συμβολή της στην διπλωματική μου εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς, την μητέρα μου Αναστασία Μουχταρέλου Ρέτσιου και τον αδερφό μου Αναστάσιο Κ. Ρέτσιο, για την υπομονή και την κατανόηση που μου επέδειξαν, αλλά και για τη συνεχή συμπαράστασή τους, στα ωραία, στα μεγάλα...

Πίνακας διαγραμμάτων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Διάγραμμα 1 :	Σημαντικότερα είδη αλίευσης από μέλη της ΕΕ στην περιοχή του Βορειοανατολικού Ατλαντικού για το 2013	18
Διάγραμμα 2 :	Αριθμός κοινοποιήσεων που ανακοινώθηκαν από το RASFF για τα δίθυρα μαλάκια το 2012 – 13	37
Διάγραμμα 3 :	Αριθμός περιστατικών αντίχνευσης <i>V. parahaemolyticus</i> και <i>Vibrio</i> spp. για τα έτη 1996 – 2014	38
Διάγραμμα 4 :	Κατανομή 35 κρουσμάτων για μαλακόστρακα, οστρακοειδή, μαλάκια, με βάση τον αιτιολογικό παράγοντα στην Ευρώπη το 2012	39
Διάγραμμα 5 :	Ποσοστιαία μεταβολή λοιμώξεων του 2012 στις Η.Π.Α, σε σχέση με τη μέση ετήσια μεταβολή λοιμώξεων του 2006 – 2008	40
Διάγραμμα 6 :	Οργανοληπτική εξέταση της οσμής των δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου, τα οποία συντηρήθηκαν υπο αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON4C), ή στους 10° C (CON10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP4C) ή στους 10° C (MAP10C)	67
Διάγραμμα 7 :	Οργανοληπτική εξέταση της γεύσης των δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου, τα οποία συντηρήθηκαν υπο αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON4C) ή στους 10° C (CON10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP4C) ή στους 10° C (MAP10C)	67
Διάγραμμα 8 :	Οργανοληπτική εξέταση της συνολικής αποδοχής των δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου, τα οποία συντηρήθηκαν υπο αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON4C) ή στους 10° C (CON10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP4C) ή στους 10° C (MAP10C)	68
Διάγραμμα 9 :	Πληθυσμοί του <i>V. parahaemolyticus</i> σε δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν στους 4° C υπο αερόβιες συνθήκες (CON) ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP)	70
Διάγραμμα 10 :	Πληθυσμοί του <i>V. parahaemolyticus</i> σε δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν στους 10° C υπο αερόβιες συνθήκες (CON) ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP)	71

Κατάσταση πινάκων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1 :	Είδη μπακαλιάρου του γένους <i>Gadus</i>	9
Πίνακας 2 :	Είδη της οικογένειας <i>Gadidae</i>	9
Πίνακας 3 :	Θρεπτικά στοιχεία του <i>G. morhua</i>	11
Πίνακας 4 :	Παγκόσμια παραγωγή (αλίευση και υδατοκαλλιέργεια) του <i>G. morhua</i> κατά τα έτη 2008 – 2011	18
Πίνακας 5 :	Αριθμός περιπτώσεων και επίπτωση/100.000 άτομα για 6 είδη <i>Vibrio</i> το 2011 στις Η.Π.Α	39
Πίνακας 6 :	Αριθμός κρουσμάτων και περιπτώσεων λόγω του <i>V. parahaemolyticus</i> στην Ιαπωνία για τη χρονική περίοδο 1999 – 2005	41

ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ψάρια αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας, λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας και συστήνεται να καταναλώνονται δύο με τρεις φορές την εβδομάδα. Αποτελούν βασική πηγή ζωϊκής πρωτεΐνης, λιπαρών, και θρεπτικών συστατικών ευεργετικά για την υγεία, και λειτουργούν προστατευτικά σε ασθένειες όπως διαβήτης ΙΙ, καρκίνος κ.α. (Altintzoglou et al, 2014).

Ο μπακαλιάρος είναι άπαχο ψάρι, με εξαιρετική γεύση, οσμή, και υψηλή εμπορική αξία (Pereira de Abreu et al, 2011). Η σάρκα του είναι λευκή, και παραδοσιακά ο άνθρωπος το έχει χρησιμοποιήσει για την τροφή του. Στις Μεσογειακές χώρες, καταναλώνεται κυρίως ως αλατισμένος (Andres et al, 2004). Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την καλλιέργεια του συγκεκριμένου ψαριού λόγω της απαίτησης του καταναλωτικού κοινού και της χαμηλής προσφοράς στην αγορά (Bjornsson et al, 2007). Ο μπακαλιάρος *Merluccius merluccius* ανήκει στην οικογένεια *Merlucciidae*, και το είδος του διακρίνεται σε δύο υποείδη, *Merluccius merluccius merluccius* όπου απαντάται στον Ατλαντικό και *Merluccius merluccius smiridus* όπου απαντάται στη Μεσόγειο. Το σώμα του είναι λεπτό, μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 70 εκατοστά, και το κεφάλι του μεγάλο. Το χρώμα του είναι γκρι με καφέ στη ράχη και λευκή κοιλιά, και συνήθως κατά τη διάρκεια της ημέρας κάθονται στο βυθό, ενώ το βράδυ απομακρύνονται. Τρέφονται κυρίως με ρέγγες και άλλα γαδόμορφα και αναπαράγονται την Άνοιξη, τα ψάρια της Μεσογείου, ενώ σε άλλα είδη που ζουν βορειότερα, η αναπαραγωγή γίνεται πιο αργά.

Είναι γεγονός ότι τα ψάρια και τα προϊόντα αλιευμάτων παρότι έχουν μεγάλη σημασία για τη διατροφή του ανθρώπου, είναι υψηλά στη λίστα των τροφίμων που σχετίζονται με τροφιογενείς εξάρσεις κρουσμάτων και νοσήματα (Huss, 1997). Η αλλοίωση των ιχθύων είναι αρκετά πολύπλοκη διαδικασία και επέρχεται κατόπιν τριών βασικών μηχανισμών, της ενζυματικής αυτόλυσης, της οξείδωσης, και της μικροβιακής ανάπτυξης. Η ενζυματική διάσπαση μεγάλων μορίων εμφανίζει χημικές και βιολογικές αλλαγές λίγο μετά την αλίευσή τους. Η αυτολυτική υποβάθμιση περιορίζει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, ακόμη και μετά από σχετικά χαμηλά επίπεδα αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Μεγαλύτερες επιπτώσεις παρατηρούνται στην υφή, μαζί με την παραγωγή υποξανθίνης και φορμαλδεΐδης. Πεπτικά ένζυμα προκαλούν εκτεταμένη αυτόλυση, με αποτέλεσμα το “μαλάκωμα” της σάρκας, ρήξη

του τοιχώματος της κοιλιάς, κ.α. Ένας αριθμός πρωτεολυτικών ενζύμων βρίσκεται στους μυς και στα σπλάχνα, τα οποία συμβάλλουν στην υποβάθμιση των αλιευμάτων κατά την διατήρηση και την επεξεργασία σε ακατάλληλες συνθήκες. Επιπροσθέτως, πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα παράγονται ως αποτέλεσμα της autolysis των μυϊκών πρωτεϊνών (Ghaly et al, 2010).

Ο δεύτερος μηχανισμός είναι σημαντική αιτία αλλοίωσης κυρίως για τα πελαγικά ψάρια με υψηλές περιεκτικότητες αποθηκευμένου λίπους στη σάρκα τους όπως η ρέγγα, το σκουμπρί κ.α. Η οξείδωση συνήθως περιλαμβάνει την αντίδραση του οξυγόνου με διπλούς δεσμούς λιπαρών οξέων. Τα ψάρια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση. Η οξείδωση των λιπιδίων στα ψάρια μπορεί να συμβεί είτε ενζυματικά είτε μη – ενζυματικά. Κατά τη διάρκεια της ενζυματικής υδρόλυσης των λιπών, οι λιπάσες διασπούν τα γλυκερίδια σε ελεύθερα λιπαρά οξέα προκαλώντας οσμές (τάγγιση). Τα λιπολυτικά ένζυμα (τριάκυκλο λιπάση, φωσφολιπάσες) μπορεί να είναι ενδογενή όπως στο ψάρι, ή να προέρχονται από ψυχρότροφους οργανισμούς. Η μη – ενζυματική οξείδωση προκαλείται από την αιμοσφαιρίνη, την μυοσφαιρίνη, και το κυτόχρωμα. Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά την υδρόλυση των λιπιδίων αλληλεπιδρούν με σαρκοπλασμικές και μυοϊνικές πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση (Ghaly et al, 2010).

Η σύνθεση και το περιεχόμενο της μικροχλωρίδας μετά την αλίευση των ιχθύων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον διαβίωσής τους. Η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός βακτηρίων όπως *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Serratia*, και *Micrococcus*, αποτελούν κύρια αιτία αλλοίωσης παράγοντας αμίνες και βιογενείς αμίνες με δυσάρεστες οσμές (Ghaly et al, 2010). Οι *Shewanella putrefaciens* και *Pseudomonas spp.* αποτελούν τους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς (EAM) σε νωπά ψάρια διατηρημένα στον πάγο ανεξάρτητα με την προέλευση του αλιεύματος. Σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, για ψάρια από εύκρατο υδάτινο περιβάλλον, EAM αποτελεί το *Photobacterium phosphoreum*, ενώ για ψάρια από τροπικές περιοχές ή γλυκά νερά EAM είναι τα Gram-θετικά βακτήρια. Για τα ψάρια με υψηλό περιεχόμενο NaCl, σημαντικό είναι η ανάπτυξη αλόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων (Gram & Huss, 1996). Ο Olafsdottir et al (2006) αναφέρει ως κύριο EAM σε αλατισμένα – αποξηραμένα φιλέτα μπακαλιάρου διατηρημένα στους 0.7 και 1.5° C το *Photobacterium phosphoreum*, το οποίο κυριαρχούσε μεταξύ των υπολοίπων. Ο *Pseudomonas spp.*, ήταν υπεύθυνος για τις γλυκές, φρουτώδεις οσμές, ενώ η *S. putrefaciens* ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή H₂S. Τα επίπεδα της τριμυθελαμίνης (trimethylamine-TMA) αποτελούν δείκτη μικροβιακής αλλοίωσης των ψαριών. Πολλά βακτήρια όπως *S. putrefaciens*, *Aeromonas spp.*, βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, και *Vibrios*, αποκτούν ενέργεια μειώνοντας το οξειδίο της τριμυθελαμίνης (TMAO), σε TMA.

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

και θαλασσινών, κυρίως στην Ασία (Balakrish Nair et al, 2007). Για πρώτη φορά παρουσιάστηκε ως τροφιμογενές αίτιο πρόκλησης ασθενειών στην Osaka της Ιαπωνίας το 1950, κατόπιν καταναλώσεως ημι – αποξηραμένης σαρδέλας - shirasu (Balakrish Nair et al, 2007).

Το παθογόνο σχετίζεται με τροφιμογενή γαστρεντερίτιδα μετά από την κατανάλωση νωπών αλιευμάτων ή αλιευμάτων που έχουν υποστεί ατελή θερμική επεξεργασία. Συμπτώματα αναφέρουν πονοκέφαλο, ναυτία, οξύς κοιλιακός πόνος, διάρροια (υδαρής ή αιμορραγική) και εμετός (Solomakos et al, 2012). Η μολυσματική δόση κυμαίνεται από $2 \times 10^5 - 3 \times 10^7$ CFU και τα συμπτώματα εκδηλώνονται σε λιγότερο από 78 ώρες, λόγω του ότι πρόκειται για ένα από τα βακτήρια με το μικρότερο χρόνο επώασης, ο οποίος είναι χαμηλότερος από 10 λεπτά (Solomakos et al, 2012). Η γαστρεντερίτιδα είναι αυτό – περιορισμένη, αλλά σε ορισμένους ανθρώπους με νόσο στο ήπαρ ή ανοσολογικές διαταραχές, μπορεί να προκληθεί σηψαιμία (Solomakos et al, 2012).

Η παρουσία του *V. parahaemolyticus* στο περιβάλλον και στα τρόφιμα εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η ενεργότητα νερού a_w , η εποχικότητα, η τοποθεσία (Miles et al, 1997). Είναι αλόφιλος μικροοργανισμός με βέλτιστη ανάπτυξη συγκεντρώσεων NaCl 2 - 3%. Ωστόσο μπορεί και αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 8% (Solomakos et al, 2011). Τεχνικές παρεμπόδισης όπως ξήρανση, κάπνιση, αλάτιση, είναι ικανές να αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών, ωστόσο λόγω της αλοφιλικής του φύσης το *V. parahaemolyticus* εξακολουθεί να αναπτύσσεται (Miles et al, 1997). Στην Ιαπωνία το *V. Parahaemolyticus* χαρακτηρίστηκε ως η κύρια αιτία για το 75% των κρουσμάτων οφειλόμενα σε τροφιμογενείς λοιμώξεις κατά την διάρκεια καλοκαιρινών μηνών (Okabe, 1974). Ο Colwell et al (1984) παρατήρησε μία συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας νερού και τον αριθμό κρουσμάτων. Η συχνότητα κρουσμάτων ήταν υψηλότερη κατά τη διάρκεια των εαρινών μηνών, οφειλόμενη στον εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus*, μιας και η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι 37° C (Miles et al, 1997). Το εύρος θερμοκρασίας, στο οποίο μπορεί να αναπτύσσεται κυμαίνεται από 15° – 44° C (Solomakos et al, 2012).

Πέραν, όμως, από τις Ασιατικές χώρες, κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης δεκαετίας σποραδικά περιστατικά και επιδημίες εκδηλώθηκαν και στην Ευρώπη, Αφρική, Νέα Ζηλανδία (Martinez – Urtaza et al, 2010). Ο ορότυπος O3:K6 από ασθενείς που εισήχθησαν στο νοσοκομείο στην Calcutta της Ινδίας (Solomakos et al, 2012), εξαπλώθηκε στις περισσότερες νοτιοανατολικές χώρες της Ασίας, καθώς και στο Περού και τη Χιλή (Martinez – Urtaza et al, 2010). Το 1998 εκδηλώθηκε επιδημία στις Η.Π.Α από το *V. parahaemolyticus*, που συσχετιζόταν με την κατανάλωση ατελώς θερμικά επεξεργασμένων στρειδιών στον Galveston Bay, στο Τέξας. Η πανδημία αυτή ήταν το πρώτο ορισμένο περιστατικό για τον συγκεκριμένο ορότυπο και αναφέρθηκε με τον όρο πανδημικό στέλεχος (pandemic clone). Ο “pandemic clone”, κατόπιν αναφέρθηκε και σ’ άλλες χώρες όπως τη Ρωσία, τη Γαλλία, την Ισπανία, τη Μοζαμβίκη, και την Ιταλία. Μέσα σε λίγα χρόνια, αυτό το στέλεχος μετατράπηκε, και κατόπιν ονομάστηκε “clonal complex”. Αξίζει να σημειωθούν τρεις από τις πιο μεγαλύτερες εξάρσεις κρουσμάτων του *V. parahaemolyticus*, οι οποίες δε σχετίζονται με το πανδημικό στέλεχος του μικροοργανισμού. Η πρώτη στις Η.Π.Α

(Pacific Coast), κυρίως από τα στελέχη O4:K12, στη βορειοδυτική Ισπανία με τα στελέχη O4:K11, και η τρίτη στην Αλάσκα με τα στελέχη O6:K18 (Martinez – Urtaza et al, 2010).

Λόγω του ότι το *V. parahaemolyticus* είναι σημαντικό αίτιο τροφιμογενούς λοίμωξης, οξείας γαστρεντερίτιδας, στις Η.Π.Α αλλά και στις Ασιατικές χώρες (Solomakos et al, 2012), αλλά και λόγω του ότι η Μεσόγειος Θάλασσα έχει τις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροβίου όπως θερμοκρασία, θρεπτικά συστατικά, και αλατότητα (Alam et al, 2009), η Ευρωπαϊκή Ένωση θα έπρεπε να ανασυστήσει την νομοθεσία τροφίμων, όσον αφορά, την ένταξη μικροβιολογικών κριτηρίων για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, που όλο και περισσότερο αποτελεί ανησυχία για την Ευρώπη (Solomakos et al, 2012).

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι μία από τις καινούριες μεθόδους για την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του τροφίμου και της χρονικής διάρκειας συντήρησής του, μετατρέποντας την περιβάλλουσα ατμόσφαιρα του προϊόντος, και καθιστώντας την ικανή να διατηρήσει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος για περισσότερο χρόνο και διατηρώντας αναλλοίωτα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στη συσκευασία υγράλατων φιλέτων μπακαλιάρου και κατά του *V. parahaemolyticus* στη συντήρησή τους στην ψύξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η αλίευση του μπακαλιάρου ξεκινά από τους προϊστορικούς χρόνους, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου, καθώς αποτέλεσε σημαντική πηγή πρωτεϊνών. Οστά παραπάνω από 5000 έτη έχουν βρεθεί στον Κόλπο του Μείν, στον Καναδά και σύμφωνα με μετρήσεις και συγκρίσεις με σημερινούς σπονδύλους προκύπτει ότι το ψάρι ήταν σημαντικά μεγαλύτερο απ' ότι σήμερα. Περιοχές με τους κυριότερους σταθμούς αλίευσης στην οικονομία και το εμπόριο μπακαλιάρου, αναφέρονται στον κόλπο του Γάλλου (Frenchman's Bay), του Μείν (Gulf of Maine), και σε πολλές κοινότητες της Μασαχουσέτης, και της Νέας Αγγλίας στην Αμερική (Alexander et al, 2009). Οι Γάλλοι και Πορτογάλοι, κατά τον 16^ο αιώνα, ακολουθώντας τους Άγγλους διέσχισαν τον Ατλαντικό Ωκεανό και σε πολλές αποικίες τους όπως τη Νέα Γη (Newfoundland), ασχολήθηκαν με την αλίευση του μπακαλιάρου (μπακαλιάρος του Ατλαντικού). Το 1624 παραπάνω από 50 σκάφη από το Γκλόστερ της Αγγλίας χρησίμευαν για αλίευση μπακαλιάρου χειρονακτικά, και το 1748 οι πρώτες εκφορτώσεις μπακαλιάρου από την αλίευση στην όχθη του Αγίου Γεωργίου (Georges Bank) ήταν γεγονός (Ryan, 1979). Παρά την τεταμένη κατάσταση από πολυάριθμους πολέμους, συγκρούσεις μεταξύ των Άγγλων Προσκυνητών, των Πουριτανών, Βασιλικών, και αργότερα κι άλλων αποίκων, ήδη από το 1650 και μετά έχουν βρεθεί σημάδια υπεραλίευσης σε περιοχές κοντά στη Βοστώνη. Οι παραπάνω επιπτώσεις δεν εμπόδισαν τον αλιπαστωμένο μπακαλιάρo να αποτελεί τον τέταρτο κυριότερο εξαγωγέα των Αμερικανών αποίκων, και μάλιστα την παραμονή της Αμερικανικής Επανάστασης (1765-83) (Alexander et al, 2009). Ο μπακαλιάρος επηρέασε την ιστορία της Αμερικής περισσότερο από κάθε άλλο ψάρι και χάρισε πλούτο και δύναμη στους αποίκους της Αμερικής. Για την αποικιακή Μασαχουσέτη, υπήρξε το πρώτο προϊόν εξαγωγής και προς τιμήν του, από το 1784 μέχρι και σήμερα, ένα ξύλινο σκάλισμα μπακαλιάρου κοσμεί το κυβερνείο της Μασαχουσέτης (State House of Massachusetts), (Ryan, 1979). Το 1792, η νέα Ομοσπονδιακή Κυβέρνηση (χρηματοδοτούμενη από τους δασμούς) παρείχε ένα πακέτο τόνωσης για την αλιεία μπακαλιάρου. Μεταξύ του 1852 έως και 1866, περισσότερα από 1500 ημερολόγια πλοίου κατατέθηκαν στους τοπικούς τελωνειακούς επιθεωρητές, για την αμοιβή του πληρώματος των σκαφών αλίευσης. Για την χρονική περίοδο 1861 – 1865 τα περισσότερα ημερολόγια πλοίου και συμφωνίες αλίευσης μπακαλιάρου έχουν βρεθεί στον κόλπο του Frenchman's. Τα ημερολόγια αυτά αποτελούν έγκυρα αρχεία για την ιστορική ανάλυση, καθώς εμπεριέχουν σημαντικές πληροφορίες όπως τις καθημερινές εκφορτώσεις, τον καιρό, την τοποθεσία, ημερομηνίες αλίευσης, κι άλλες περιγραφές. Βάση στοιχείων των ημερολογίων πλοίου και χρήσης απλών στατιστικών εργαλείων, εκτιμήθηκαν οι καθημερινές εκφορτώσεις του μπακαλιάρου, η δομή του πληθυσμού και η χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής της αλίευσης τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο (Alexander et al, 2009).

Το 1861 οι εκφορτώσεις μπακαλιάρου στον κόλπο Frenchman's ανέρχονταν στα 9.658 m (εδάφη που καλύπτουν περιοχές εκφορτώσεων), και στον κόλπο του Μείν 62.600 m, ενώ το 2007 φτάνουν τα 3.989 m μόνον σε ολόκληρο τον κόλπο του Μείν.

Η δομή του πληθυσμού του μπακαλιάρου (Atlantic cod), χαρακτηρίζεται από ψάρια με μέση τιμή βάρους 3.7 kg στην ίδια περιοχή, ακριβώς ίδια και με τη μέση τιμή βάρους στον κόλπο του Μείν το 2007. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ιστορική βιβλιογραφία του μπακαλιάρου, στην οποία το ψάρι παρουσιάζεται πολύ μεγαλύτερο. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στη διαφορετική κατανομή του πληθυσμού ανά περιοχή, και στο γεγονός ότι το μέσο βάρος του εποχικού αλιεύματος, διέφερε σημαντικά από σκάφος σε σκάφος απ' όπου συλλέχθηκαν τα δεδομένα. Συγκρίσεις μεταξύ του μέσου βάρους αλιεύματος τη χρονική περίοδο 1861 – 65, και του 2003 – 07, βοήθησαν στην κατάταξη του μπακαλιάρου (βάρος ανά ηλικία) και στη δομή του πληθυσμού. Μεγάλες διαφορές παρατηρήθηκαν σε μικρά ψάρια (< 2 kg), που αποτελούσαν το 15% του αλιεύματος το 1860, ενώ σήμερα λιγότερο το 1% εξαιτίας του ρυθμιζόμενου μεγέθους των διχτύων και της τράτας κατά την αλίευση. Μπακαλιάροι μεγαλύτεροι των 6 kg και των 14 kg ήταν το 38% και 20% της σημερινής τους ποσότητας αντίστοιχα. Ο υπολογισμός του καθημερινού βάρους του μπακαλιάρου έδειξε εποχικές διακυμάνσεις στο μέγεθος του ψαριού. Μπακαλιάροι 6 κιλών και παραπάνω έκαναν την εμφάνισή τους αργά τον Μάρτιο έως και νωρίς τον Απρίλιο και ξανά τον Νοέμβριο, ενώ μικρότεροι κάτω των 4 κιλών αργά το καλοκαίρι έως νωρίς το φθινόπωρο (Alexander et al, 2009).

Τα δολώματα που χρησιμοποιούσαν οι ψαράδες στον κόλπο Frenchman's μας δίνουν πληροφορίες σχετικά με το τι έτρωγε ο μπακαλιάρος γύρω στο 1800. Οι στόλοι για την αλιεία μπακαλιάρου, με την έναρξη των ταξιδιών τους αγόραζαν βαρέλια αλατισμένα με μύδια και ρέγγα, καθώς και με δολώματα που μπορούσαν να προμηθευτούν από την θάλασσα όπως ρέγγα, καλαμάρια και θαλάσσια πτηνά. Κυρίως, προτιμούσαν φρέσκα δολώματα αφενός μεν γιατί το προτιμούσε περισσότερο το ψάρι, αφενός δε διότι δεν υπήρχε χρηματικό κόστος. Σύμφωνα με τους ερευνητές του 19^{ου} αιώνα, η διατροφή του μπακαλιάρου περιελάμβανε διάφορα μαλάκια, καβούρια, γαρίδες, καλαμάρια και μικρές έως μεσαίες ρέγγες. Μεταξύ του 1845 – 95, δειγματοληψίες από το περιεχόμενο στομαχιού 168 μπακαλιάρων, έδειξαν τα είδη της λείας τους. Τα ψάρια συλλέχθηκαν από τέσσερις περιοχές (νησί Long Island, κόλπος του Μείν-Gulf of Maine και όχθη του Γεωργίου-Georges Bank, κόλπος του Αγίου Λόρενς-Bay of St Lawrence, και Σκοτσέζικη υφαλοκρηπίδα-Scotian Shelf, και τα είδη που βρέθηκαν ομαδοποιήθηκαν σε αννελίδες, μαλακόστρακα, εχινόδερμα, ψάρια, υδροειδή, και μαλάκια (Alexander et al, 2009).

Ο μπακαλιάρος του Βορειοανατολικού Αρκτικού (*Gadus morhua*) έχει αποτελέσει την σημαντικότερη πηγή όσον αφορά την αξία αλιευμάτων, τα έσοδα εξαγωγών, και την απασχόληση στη Νορβηγία. Χάρη στην σημαντικότητά του και τη συμβολή του στον κοινωνικό – οικονομικό επίπεδο της χώρας, συνέβαλε στην ανάπτυξη συστημάτων και καθεστώτων διαχείρισης της αλιείας, καθώς και στην ίδρυση σημαντικών ινστιτούτων όπως το Ινστιτούτο Θαλάσσιας Έρευνας (Institute of Marine Research-IMR) και τη Διεύθυνση της Αλιείας (Directorate of Fisheries-DOF), (Standal & Hersoug, 2014).

Η μελέτη του μπακαλιάρου (*G. morhua*), όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της κατανομής, της ωτοκίας, στη νορβηγική θάλασσα και στη θάλασσα του Μπάρεντς (Barents Sea) έχει πραγματοποιηθεί για παραπάνω από 10 χρόνια. Ανοικτά της ακτής Μούρμαν (Murman coast), έχει αποδειχθεί ότι η ένταση και η αποτελεσματικότητα της ωτοκίας του μπακαλιάρου από το 1920 έως το 1970 έχει μειωθεί, λόγω μείωσης

του θερμικού περιεχομένου των υδάτων (Standal & Hersoug, 2014). Όσον αφορά την επεξεργασία εκτρεφόμενου μπακαλιάρου, συμβαίνουν και παρατηρούνται ορισμένες αλλαγές συγκριτικά με τον άγριο μπακαλιάρo. Η διατροφή του καλλιεργούμενου μπακαλιάρου, εξαρτάται από τις ζωοτροφές, γι' αυτό και εμφανίζουν πιο γρήγορη ανάπτυξη. Ο εκτρεφόμενος μπακαλιάρος του Ατλαντικού αναπτύσσεται σε βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, φτάνοντας σε δύο χρόνια μέχρι και 3 kg. Ο άγριος μπακαλιάρος στην ίδια ηλικία δε ξεπερνά το 10% του προαναφερθέντος βάρους. Επιπλέον, έχει χαμηλότερο pH και χαμηλότερο περιεχόμενο οξειδίου τριμυθελαμίνης (TMAO), μόνον 5 – 10% απ' αυτό του άγριου μπακαλιάρου. Όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα αφορούν τη διατροφή και την ηλικία του. Τέλος, ο εκτρεφόμενος μπακαλιάρος βρίσκεται υπο συνθήκες υγιεινής πριν επέλθει η νεκρική ακαμψία. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μεταξύ του άγριου και εκτρεφόμενου μπακαλιάρου παρουσιάζουν διαφορές ελαφρώς στη γεύση και στο χρώμα (Oliveira et al, 2012).

Παράλληλα, η βιομηχανία ιχθυοκαλλιέργειας εκμεταλλευόμενη τους θαλάσσιους πόρους οδήγησε τα τελευταία χρόνια σε μείωση των αλιευμάτων, αύξηση του ανταγωνισμού για αλιευτικούς πόρους, και μια στροφή προς την Ρωσική ζώνη ενάντια στην αύξηση θερμοκρασιών των Αρκτικών θαλασσών (Stroganov et al, 2009).

Το ψάρι ανήκει στην οικογένεια των γαδοειδών (*Gadidae*), και υπάρχουν κυρίως πέντε είδη της συγκεκριμένης οικογένειας με μεγάλη εμπορική σημασία στη Βόρεια Θάλασσα. Ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*), το προσφυγάκι (*Merlangus merlangus*), μπακαλιάρος, βακαλάος (*Melanogrammus aeglefinus*), μαύρος μπακαλιάρος (*Pollachius virens*), σύκο της Νορβηγίας (*Trisopterus esmarkii*), είναι τα σημαντικότερα είδη (Macer & Shepherd, 1987). Σύμφωνα με τον Daan (1973), ο *G. morhua* ανήκει στους πιο πολυάριθμους θηρευτές στην περιοχή, σε πολλά εμπορικά είδη όπως η ρέγγα.

Ο *Merluccius merluccius* με κοινή ονομασία Ευρωπαϊκός μπακαλιάρος (European hake) ανήκει στην υποοικογένεια των γαδοειδών *Merlucciidae* (*Merluccid* hakes). Η πρώτη ονομασία του ήταν “*Marlutiū vulgari*” και δόθηκε από τον Belon (1553). Αργότερα, στα μέσα του 1700, ο Carlo Linnaeus ασχολήθηκε με την περιγραφή του ψαριού. Το κατέταξε στην οικογένεια *Gadidae* συμπεριλαμβάνοντάς το στο γένος *Gadus*. Σύμφωνα με το διωνυμικό σύστημα ονοματολογίας “*Sistema Naturae*”, ονομάστηκε *Gadus merluccius*, μιας και είναι στενά συνδεδεμένο και με άλλα είδη μπακαλιάρου. Τα χαρακτηριστικά της υποοικογένειας *Merlucciidae* περιγράφηκαν από τον Gill (1884), ως μια ξεχωριστή οικογένεια με ορισμένες διαφορές σε σχέση με την οικογένεια *Gadidae* όπως μια πιο μέτρια περιοχή σε σχήμα κώνου στο πίσω μέρος του σώματος, τερματικό στόμα, μέτριο υπο – κογχικό οστό στο κοίλωμα του ματιού, διπλό περύγιο, κ.α. Παρ' αυτά η ταξινόμηση των συγκεκριμένων ειδών αποτέλεσε αντικείμενο συζητήσεων για το αν η *Merlucciidae* θα αποτελεί ξεχωριστή οικογένεια ή θα εντάσσεται μέσα στη *Gadidae*. Η έκταση της κατανομής του *M. merluccius* και όλων των ειδών του γένους *Merluccius* είναι ευρεία. Απαντάται σε όλο τον Ατλαντικό Ωκεανό, στη Μεσόγειο και στην Ερυθρά Θάλασσα. Έχει παρατηρηθεί επίσης, κατά μήκος του ανατολικού Ειρηνικού Ωκεανού και νότια της Νέας Ζηλανδίας. Κάποιες απομονώσεις, επιπλέον, έχουν γίνει από τον Ινδικό Ωκεανό και την νότιο – ανατολική Μαδαγασκάρη (Murua, 2010).

1.2 ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ ΤΟΥ ΑΤΛΑΝΤΙΚΟΥ (*GADUS MORHUA*)

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο πιο σημαντικός από τους μπακαλιάρους είναι ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), ο οποίος περιλαμβάνει αρκετά υποείδη βάσει γεωγραφικής κατανομής. Κυριότερα υποείδη, ο *Gadus morhua callarias* (Βαλτική θάλασσα), ο *Gadus morhua kildinensis* (νησί Κίλντιν), ο *Gadus morhua marisalbi* (Λευκή θάλασσα), *Gadus morhua ogac* (Γροιλανδία), (Ryan, 1979).

Γενικότερα, τα περισσότερα είδη μπακαλιάρου της οικογένειας *Gadidae* είναι ψάρια με μαλακά πτερύγια, και διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα λόγω του ότι τα μεγάλα πτερύγια στην πυελική χώρα είναι τοποθετημένα κάτω ή μπροστά από τα θωρακικά πτερύγια και όχι από πίσω τους, όπως συμβαίνει με άλλα ψάρια όπως η ρέγγα και ο σολομός. Επιπλέον, είναι ψάρια του κρύου νερού και ζουν κοντά στον πυθμένα (Ryan, 1979).

1.2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Στο βασίλειο *Animalia*, Φύλο των χορδωτών, και κλάση των Ακτινοπτερυγίων (*Actinopterygii*), ανήκει η τάξη των Γαδόμορφων (*Gadiformes* cods), η οποία περιλαμβάνει έντεκα οικογένειες (*Bregmacerotidae*, *Euclichthyidae*, *Gadidae*, *Lotidae*, *Macrouridae*, *Melanonidae*, *Merlucciidae*, *Moridae*, *Muraenolepididae*, *Phycidae*, *Steindachneriidae*). Ανάμεσά τους και η οικογένεια *Gadidae* στην οποία ανήκουν τα είδη μπακαλιάρου. Αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης τάξης, αναφέρονται στα πτερύγια της πυέλου, τα οποία παρεμβάλλονται κάτω ή μπροστά από τα θωρακικά όταν είναι παρόντα, βοηθώντας στον έλεγχο της κατεύθυνσης. Τα περισσότερα ψάρια έχουν μακρά ραχιαία πτερύγια, κυκλοειδή λέπια και σπανίως εμφανίζουν μικροσκοπικές προεξοχές στην άκρη. Το κρανιακό οστό premaxilla σχηματίζεται σε ολόκληρη την άνω γνάθο με προέκταση σε ορισμένα. Όπως και σε πολλά οστεώδη ψάρια στη ραχιαία περιοχή βρίσκεται ένας σάκος - κύστη που γεμίζει αέρα διατηρώντας και ελέγχοντας την πλευστότητα, χωρίς να υπάρχει ο σωλήνας – αγωγός που να τον ενώνει με το πεπτικό σύστημα. Οι οικογένειες της εν λόγω τάξης απαντώνται σε θαλασσινά, υφάλμυρα και γλυκά νερά (<http://www.fishbase.org/Summary/OrdersSummary.php?Order=Gadiformes>).

Στην οικογένεια *Gadidae* ανήκουν οι μπακαλιάροι (cods and haddocks). Υπάρχουν 13 γένη της οικογένειας (*Gadus*, *Gadiculus*, *Merlangius*, *Eleginus*, *Trisopterus*, *Raniceps*, *Pollachius*, *Boreogadus*, *Melanogrammus*, *Micromesistius*, *Microgadus*, *Theragra*, *Arctogadus*). Ορισμένα είδη του γένους *Gadus* παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 1. Απαντώνται στον Ατλαντικό, Ειρηνικό Ωκεανό και στην περιοχή της Αρκτικής. Χαρακτηρίζονται από τρία ραχιαία πτερύγια, το πρώτο πίσω

από το κεφάλι και δεν έχουν αγκάθια. Υπάρχουν δόντια στο οστό της ύνιδας. Το μέγιστο μήκος για τον μπακαλιάρο, και συγκεκριμένα για τον μπακαλιάρο Ατλαντικού είναι μέχρι και 2 m. Τα είδη της οικογένειας *Gadidae* βρίσκονται σε περιοχές γύρω από τον Αρκτικό Ωκεανό, στο Βόρειο Πόλο, και σε εύκρατα νερά. Τα περισσότερα είναι βενθοπελαγικά, και τρέφονται με ψάρια και ασπόνδυλα. Επιπλέον, είναι γνωστή η μετανάστευσή τους σε μακρινές αποστάσεις για ωοτοκία, αναζήτηση τροφής κ.α. (<http://www.fishbase.org>).

Πίνακας 1: Είδη μπακαλιάρου του γένους *Gadus* (<http://www.fishbase.org>)

Είδος	ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΟ ΜΗΚΟΣ (cm)
<i>Gadus macrocephalus</i>	Βόρειος Ειρηνικός	119
<i>Gadus morhua</i>	Βόρειος Ατλαντικός και Αρκτική	200
<i>Gadus ogac</i>	Βορειοδυτικός – Βορειοανατολικός Ατλαντικός	77
<i>Gadus auratus</i>	Βόρειος Ειρηνικός	-
<i>Gadus brandtii</i>	Βόρειος Ειρηνικός	-

Σύμφωνα με τον Bailey et al (1970), τα είδη της οικογένειας *Gadidae* είναι 25 και παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2 με την κοινή τους ονομασία. Παρόλο που οι ευρωπαίοι ιχθυολόγοι κατατάσσουν σε διαφορετικές υποοικογένειες τα είδη που δεν ανήκουν στο γένος *Gadus* λόγω διαφορετικής δομής στο κρανίο, οι Αμερικανοί τα ομαδοποιούν στην ίδια οικογένεια (Ryan, 1979).

Πίνακας 2: Είδη της οικογένειας *Gadidae*

Είδος	Κοινή Ονομασία
<i>Arctogadus borisovi</i>	Οδοντωτός γάδος
<i>Arctogadus glacialis</i>	Πολικός γάδος
<i>Boreogadus saida</i>	Αρκτικός γάδος
<i>Eleginus gracilis</i>	Βαθυκίτρινος γάδος
<i>Gadus macrocephalus</i>	Γάδος του Ειρηνικού
<i>Gadus morhua morhua</i>	Γάδος του Ατλαντικού
<i>Gadus ogac</i>	Γάδος της Γροιλανδίας
<i>Brosme brosme</i>	Μουρούνα
<i>Enchelyopus cimbrius</i>	Τέσσερις γενειάδες γάδος
<i>Lota lota</i>	Κωβιός (ζει στο γλυκό νερό)
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Βακαλάος (haddock)
<i>Merluccius bilinearis</i>	Ασημένιος γάδος (προσφυγάκι)
<i>Merluccius productus</i>	Μερλούκιος του Ειρηνικού
<i>Phycis chesteri</i>	Μπακαλιάρος με μακρύ πτερύγιο
<i>Steindachneria argentea</i>	Φωτεινός μπακαλιάρος
<i>Urophycis regius</i>	Μπακαλιάρος με στίγματα
<i>Urophycis floridanus</i>	Μερλούκιος του νότου
<i>Urophycis eairlli</i>	Μερλούκιος Καρολίνας

<i>Urophycis cirratus</i>	Μπακαλιάρος του κόλπου
<i>Urophycis chuss</i>	Κόκκινος μπακαλιάρος
<i>Urophycis tenuis</i>	Λευκός μπακαλιάρος
<i>Microgadus proximus</i>	Μικρός βακαλάος της Βόρειας Αμερικής του Ειρηνικού
<i>Microgadus tomcod</i>	Μικρός βακαλάος της Βόρειας Αμερικής του Ατλαντικού
<i>Pollachius virens</i>	Μαύρος μπακαλιάρος της Αλάσκας
<i>Theragra chalcogramma</i>	Μπακαλιάρος της Αλάσκας (walleye)

1.2.3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *G. MORHUA*

Το περιβάλλον του *G. morhua* είναι θαλασσινό, και υφάλμυρο βενθοπελαγικό. Το βάθος του συνήθως κυμαίνεται στα 150 – 200 m, και το εύρος του μήκους του είναι μεταξύ 31 – 74 cm, αλλά το πιο σύνηθες για το αρσενικό είναι μέχρι και 100 cm. Το μέγιστο βάρος του μπορεί να φτάσει είναι μέχρι και τα 96 kg, ενώ η μέγιστη ηλικία του 25 έτη. Το ενδιαίτημά του ποικίλει μιας και διανέμεται σε πολλούς οικοτόπους από ακτές μέχρι και υφαλοκρηπίδες. Τα μικρά ψάρια προτιμούν τα ρηχά νερά τα οποία δεν ξεπερνούν σε βάθος τα 30 m, επίσης και σε πιο πολύπλοκες περιοχές όπως θαλάσσια λιβάδια με πέτρες ή και ογκόλιθους, για προστασία από τους θηρευτές. Τα ενήλικα ψάρια βρίσκονται σε βαθύτερα νερά και πιο κρύα. Κατά τη διάρκεια της ημέρας κολυμπούν σε βάθος μέχρι και 30 – 80 m πάνω από τον πυθμένα, και διασπείρονται τη νύχτα για την αναζήτηση της λείας τους. Τρέφονται με ασπόνδυλα (γαρίδες, μύδια, καβούρια, καλαμάρια), ψάρια μικρότερα, καθώς και με νεαρά ψάρια μπακαλιάρου. Κάποιες φορές τρέφονται με πλωτά μαλάκια, τα οποία προκαλούν μια ισχυρή μυρωδιά ιωδίου όταν μαγειρεύονται. Τα ίδια αποτελούν λεία περισσότερο για τους καρχαρίες. Εξαιτίας αλλαγών της θερμοκρασίας των υδάτων, μεταναστεύουν για τοποθεσίες ωτοκίας, διαχείμαση, και αναζήτηση τροφής χωρίς να ξεπερνούν τα 200 km (www.fishbase.org,; www.fishwatch.gov, ; Ryan, 1979).

Το σώμα του είναι βαρύ με μεγάλο κεφάλι, αμβλύ ρύγχος, σχήμα ωοειδές και παρατηρείται ένα λεπτό όργανο κοντά στο στόμα που μοιάζει με μουστάκι, παρόμοιο με αυτό που διαθέτουν συνήθως τα γατόψαρα. Έχει τρία διαφορετικά ραχιαία πτερύγια και σχεδόν τετράγωνη ουρά. Παρουσιάζει μαλακές ραχιαίες και εδρικές ακτίνες από 44 – 55 και από 33 – 45 αντίστοιχα. Οι σπόνδυλοι είναι 51 – 55 και η πλευρική του γραμμή είναι λευκή. Παρατηρείται μία προεξοχή της άνω γνάθου, και το μήκος του πριν τη ραχιαία περιοχή είναι λιγότερο από το 1/3 του συνολικού του μήκους. Το χρώμα του ποικίλλει από καφετί έως πρασινωπό στη ράχη του και στην άνω πλευρά γίνεται πιο χλωμό και ασημί κοιλιακά. Μεταβάλλεται κάθε φορά με το υπόβαθρο του οικοτόπου και την αλλαγή του φυσικού του περιβάλλοντος. Φέρει επάνω του πολλά μικρά στίγματα (www.fishbase.org,; www.fishwatch.gov,; Ryan, 1979).

Το συγκεκριμένο είδος απαντάται στον Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό και γύρω από τον Αρκτικό Ωκεανό. Από τον κόλπο Ουνγκάβα του Καναδά (Ungava Bay) κατά μήκος της ακτής της Βόρειας Αμερικής μέχρι και το ακρωτήριο Χατέρας (Cape Hatteras). Επιπλέον, και στη Βόρεια Καρολίνα δυτικά του Ατλαντικού. Ανατολικά και δυτικά

των ακτών της Γροιλανδίας και γύρω από την Ισλανδία. Κατά μήκος της ευρωπαϊκής ακτής από τη θάλασσα του Μπάρεντς (Barents Sea), συμπεριλαμβανομένου και του νησιού Μπιγιέρνεγια (Bear Island) μέχρι και τον Βισκαϊκό κόλπο (Biscay Bay). Στα ύδατα των Η.Π.Α συνηθέστερα βρίσκεται στην όχθη του Γεωργίου (Georges Bank), και στον κόλπο του Μέιν (Gulf of Maine), (www.fishbase.org/summary/Gadus-morhua,; www.fishwatch.gov).

Η ανάπτυξή του είναι σχετικά γρήγορη, αλλά σε πιο κρύα νερά όπως της Αρκτικής η ωριμότητα επέρχεται τον 6^ο – 8^ο έτος της ηλικίας τους. Το ψάρι είναι ικανό για αναπαραγωγή από το 2 – 3 ετών και έχει υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό. Το θηλυκό μπορεί να παράγει από 3 – 9 εκατομμύρια αυγά όταν ωοτοκεί. Η ωοτοκία γίνεται κοντά στον πυθμένα του ωκεανού σε 50 – 200 m βάθος σ' ένα εύρος θερμοκρασιών από 0 – 12^ο C (προτιμώμενο εύρος 0-6^ο C) από τον χειμώνα έως νωρίς την άνοιξη. Η ανάπτυξη του εμβρύου διαρκεί έως και 14 ημέρες, ενώ των προνυμφών 3 μήνες στους 6^ο και 8^ο αντίστοιχα. Οι προνύμφες τρέφονται με πλαγκτόν κυρίως, ενώ όταν φτάσουν τα 8 cm περίπου, μετακινούνται προς τον πυθμένα όπου τρέφονται με σκουλήκια και μικρές γαρίδες. Η αναλογία των φύλων είναι σχεδόν 50% με μία ελαφρά υπεροχή των θηλυκών (www.fishbase.org, ; Ryan, 1979).

1.3 Ο ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Ο μπακαλιάρος παράγεται κυρίως στην Νορβηγία και την Ισλανδία, αλλά πρωταρχικώς καταναλώνεται από Μεσογειακές χώρες όπως Ισπανία, Πορτογαλία καθώς και από την Λατινική Αμερική (Martinez-Alvarez et al, 2004). Το 1999, η Ισπανία υπήρξε η δεύτερη χώρα, υψηλότερη σε κατανάλωση αλατισμένου μπακαλιάρου. Στις μεσογειακές χώρες, σύμφωνα με τον Andre et al (2005), ο μπακαλιάρος εμπορεύεται ως αλατισμένος με διαφορετικό περιεχόμενο υγρασίας βάση της επέκτασης του σταδίου ξήρανσης (Oliveira et al, 2012).

Ο *G. morhua* είναι ένα άπαχο είδος, έχοντας θρεπτική σάρκα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, με αποθήκη πρωτεϊνών στους μυς και λιπιδίων στο ήπαρ. Η γεύση του είναι ήπια και πιο γλυκιά από τον μπακαλιάρο του Ειρηνικού. Το χρώμα, όταν το κρέας του είναι νωπό είναι λευκό έως ροζ, ημιδιαφανές. Όταν υποστεί θερμική επεξεργασία γίνεται λευκό αδιαφανές. Το άσπρο κρέας του είναι ελαφρώς αρωματισμένο, και προσαρμόζεται σ' όλες τις μορφές μαγειρικής. Το ψάρι είναι διαθέσιμο όλο το χρόνο. Παρακάτω δίνεται ο πίνακας 3 με τα θρεπτικά στοιχεία του μπακαλιάρου του Ατλαντικού (www.fishwatch.gov).

Πίνακας 3: Θρεπτικά στοιχεία του *G. morhua* (www.fishwatch.gov)

Μερίδα	1
Βάρος μερίδας	100 g
Θερμίδες	82
Πρωτεΐνες	17.81 g
Λιπαρά, σύνολο	0.67 g
Κορεσμένα λιπαρά οξέα, σύνολο	0.13 g
Υδατάνθρακες	0 g

Σάκχαρο	0 g
Χοληστερόλη	43 mg
Σελήνιο	33.1 mcg
Νάτριο	54 mg

Η σύνθεση του μπακαλιάρου ποικίλει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την εποχή, τα ύδατα, τη θερμοκρασία, το είδος και την αφθονία της διαθέσιμης τροφής (www.fishwatch.gov).

1.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Η προσπάθεια αποθήκευσης και συντήρησης των ψαριών για μήνες ακόμα και για χρόνια, υπο κατάλληλες συνθήκες εμφανίζεται από αρχαίους χρόνους. Ο μπακαλιάρος προτιμάται ιδιαίτερα ως αποξηραμένος και αλατισμένος, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας και των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών (χρώμα, υφή, άρωμα, και χαρακτηριστική γεύση). Το 1996, η παγκόσμια ετήσια παραγωγή έφτανε τους 250000 τόνους σύμφωνα με τον Vilhelmsson et al, 1996 και μόνον το 10% αυτού ήταν αποξηραμένος. Ο παστός μπακαλιάρος είναι μέχρι και σήμερα δημοφιλής. Σύμφωνα με το Νορβηγικό Συμβούλιο Εξαγωγών (2009), η ετήσια κατανάλωση παστωμένου μπακαλιάρου από τον βορειοανατολικό Ατλαντικό εκτιμάται υψηλότερη από 150000 τόνους (Oliveira et al, 2012).

Στόχος της επεξεργασίας του μπακαλιάρου, δεν είναι μόνον η συντήρησή του για να κατέχει μία σταθερή θέση στο ράφι, αλλά και η διατήρηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά την διάρκεια της αφαλάτωσης και της θερμικής του περαιτέρω επεξεργασίας, κάνοντάς το πολύ αξιόλογο στους καταναλωτές (Oliveira et al, 2012). Κύριες μέθοδοι συντήρησης για το μπακαλιάρο είναι η αλάτιση, ξήρανση, και η κάπνιση.

1.4.1 ΑΛΑΤΙΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Η αλάτιση για το μπακαλιάρο αποτελεί την παλιότερη μέθοδο συντήρησης. Για την παραγωγή αλίπαστου μπακαλιάρου χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη όπως ο *G. morhua*, ο *G. macrocephalus*, και ο *G. ogac*. Τα περισσότερα ψάρια της οικογένειας *Gadidae* είναι θαλάσσια ψάρια και ζουν σε υφάλμυρα νερά, ωστόσο ο *G. morhua* όπως και κάποια άλλα είδη ανέχονται χαμηλές περιεκτικότητες αλατότητας. Αρχικώς, γίνεται η αφαίμαξη και αφαιρούνται από το ψάρι τα εντόσθια, το κεφάλι και ο κορμός και καθαρίζονται. Κατόπιν, αποθηκεύονται είτε σε απλή ψύξη είτε σε θερμοκρασίες κατάψυξης, και αφού γίνει η απόψυξη πλένονται και τεμαχίζονται σε φιλέτα. Η αλάτιση γίνεται είτε με ξηρό ή υγρό αλάτισμα, είτε με εμβάπτιση στην άλμη (χοντρό αλάτι και νερό) κατά τη μεταφορά τους σε δεξαμενές ή μεγάλα βαρέλια στα οποία περιέχεται η άλμη με συγκέντρωση άλατος από 4 – 20% και χρόνο ωρίμανσης από 2 – 21 ημέρες ανάλογα με το περιεχόμενο άλατος. Στόχος είναι η μεταφορά αλατιού στους μυς του ψαριού με διάχυση. Το ποσοστά διείσδυσης του αλατιού αυξάνονται έως και εκατό φορές με το φιλετάρισμα και την εκδορά του ψαριού. Κατόπιν, τα

φιλέτα τοποθετούνται σε στοίβες (1 m περίπου) με λεπτές στρώσεις αλατιού ή τοποθετούνται σε πλαστικά δοχεία με στοίβες ύψους 30 – 40 cm μόνον. Επιπλέον, κι άλλη τεχνική αλάτισης είναι η άλεση των ψαριών και επικάλυψή τους με άλμη. Πλεονέκτημά της είναι η αύξηση της επικαλυπτόμενης επιφάνειας του ψαριού. Κατά την αποθήκευσή του δεν παρατηρείται βακτηριακή αλλοίωση σε χαμηλές θερμοκρασίες (0 – 4° C), με υψηλό ποσοστό άλατος. Η συγκεκριμένη μέθοδος με την άλμη είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στην Ισλανδία. Τέλος, τα φιλέτα αποστραγγίζονται και ακολουθεί η ξήρανση για 10 με 12 ημέρες. Από εκεί και έπειτα ακολουθεί η συσκευασία και η απευθείας διανομή ή και η αφαλάτωση, ψύξη, συσκευασία και αποθήκευση μετά την ξήρανση (Oliveira et al, 2012).

Ο Lorentzen et al (2014), μελέτησε την ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών στον εμπορικά αποξηραμένο – αλατισμένο μπακαλιάρο (dry-salted cod), με στόχο τον προσδιορισμό του περιεχομένου ισταμίνης σε μια παρατεταμένη διατήρησή με επεκταμένη ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών. Στο συγκεκριμένο προϊόν (*G. morhua*), σε αυξημένες θερμοκρασίες είναι δυνατόν να συμβεί ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών σε μια παρατεταμένη διατήρηση. Οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί απαιτούν κατά το ελάχιστο 20 gr / 100 gr προϊόντος και συχνά είναι ισχυρά πρωτεολυτικοί. Επιπλέον, σε αλιεύματα από το περιεχόμενό τους είναι υψηλό σε ελεύθερη ιστιδίνη, μέσω της μικροβιακής αποκαρβοξυλίωσής της σχηματίζεται η ισταμίνη, αποτελώντας κίνδυνο για την ασφάλεια των αλιευμάτων. Το περιεχόμενό της βρέθηκε χαμηλό ακόμη και σε μπακαλιάρο με εκτεταμένη ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών. Αυτό αποδεικνύει ότι η κατανάλωση παστωμένου μπακαλιάρου δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο δηλητηρίασης. Η ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών στον αλατισμένο μπακαλιάρο έχει ως αποτέλεσμα τον κόκκινο χρωματισμό που περιορίζει τη διάρκεια ζωής του. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, ο κόκκινος χρωματισμός δε γίνεται δεκτός και το προϊόν θεωρείται εμπορικά ακατάλληλο. Για την αποφυγή ανάπτυξης αλόφιλων μικροοργανισμών, η συντήρησή τους θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, κατά προτίμηση κάτω των 8° C. Η προέλευση και ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν κυρίως τα γένη *Halobacterium* και *Halococcus*, είναι η αλάτιση. Η απαίτησή τους σε περιεχόμενο NaCl στον αλατισμένο – αποξηραμένο μπακαλιάρο είναι τουλάχιστον 20-25 gr / 100 gr μπακαλιάρου και σε θερμοκρασίες 10 – 50° C, με προτιμώμενη στους 37° C. Η εμφάνισή τους παρατηρείται με κόκκινες κηλίδες στην κομμένη πλευρά του ψαριού. Λόγω της πρωτεολυτικής τους δράσης, επίσης, παράγουν οσμές. Δραστηριότητες ενδογενών και πρωτεολυτικών ενζύμων, και πρωτεάσες, ελευθερώνουν πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα, που οδηγούν σε περαιτέρω ανάπτυξη μικροοργανισμών και στην υποβάθμιση του προϊόντος (Lorentzen et al, 2014).

Σύμφωνα με τον Hernandez – Herrero et al (2002), βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα ισταμίνης στο μπακαλιάρο κατά τη συντήρησή του στον πάγο για 9 ημέρες, ενώ ο Stede & Stockemer (1986), αναφέρει περίπου 100 mg ισταμίνης / kg σε χαλασμένο μπακαλιάρο μετά από 7 ημέρες στους 8° C. Επιπλέον, άλλη μια μελέτη, σύμφωνη με τα παραπάνω μας δείχνουν οι Baixas – Nogueras et al, (2001) στον *Merluccius* και σε πολλά άλλα γοδοειδή. Τα επίπεδα βιογενών αμινών συμπεριλαμβανομένου και της ισταμίνης παραμένουν χαμηλά μετά από συντήρηση σε θερμοκρασίες δωματίου. Βάση του Ευρωπαϊκού Κανονισμού, το περιεχόμενο ισταμίνης δεν πρέπει να ξεπερνά

τα 100mg/kg αλιευτικού προϊόντος, ενώ η αμερικανική υπηρεσία US Food and Drug (FDA) αναφέρει ως επιτρεπόμενο όριο 50 mg / kg (Lorentzen et al, 2014).

Αλοφιλικά και οξυγαλακτικά βακτήρια σχηματίζουν την ισταμίνη στον αποξηραμένο – αλατισμένο μπακαλιάρο, αλλά και σε αλιεύματα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το γένος *Tetragenococcus* (Lorentzen et al, 2014).

Η μικροβιακή ανάπτυξη των αλόφιλων μικροοργανισμών στον αλατισμένο – αποξηραμένο μπακαλιάρο στους 35° C ήταν φανερή, ενώ στους 4° C το επίπεδο παρέμεινε αμετάβλητο σε σχέση με το αρχικό τους περιεχόμενο. Το αρχικό περιεχόμενο των αλόφιλων μικροοργανισμών την πρώτη μέρα (0 ημέρα), σε μερικά δείγματα ανιχνεύθηκε. Από την 14^η μέρα συντήρησης και μετά όλα τα δείγματα περιείχαν αλόφιλους μικροοργανισμούς. Ο κόκκινος αποχρωματισμός ήταν τυχαία κατανεμημένος στην επιφάνεια του μπακαλιάρου (Lorentzen et al, 2014).

Επιπλέον αλλαγές, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν από την 14 ημέρα έως την 21 ημέρα συντήρησης. Ιδιαίτερα έντονες ήταν οι οσμές, η σάρκα έτεινε στο να διαλυθεί, και το δέρμα ήταν σε προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης. Αυτό οφείλεται σε δράσεις πρωτεολυτικών κι άλλων ενζύμων από αλόφιλους μικροοργανισμούς και στην οξείδωση λιπιδίων στους 35° C. Στους μάρτυρες (συντήρηση στους 4° C), όλα τα δείγματα του προϊόντος παρέμειναν αμετάβλητα και μετά από μια καταμέτρηση διαπιστώθηκε ότι μία τιμή των 6.9 CFU/g αλόφιλων μικροοργανισμών δε μπορεί να παρατηρηθεί με κόκκινο χρωματισμό στον αλατισμένο μπακαλιάρο. Τα επίπεδα ισταμίνης παρέμειναν χαμηλά ακόμη και μετά από 35 ημέρες συντήρησης στους 35° C. Αυτό δείχνει ότι οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί αναπτυσσόμενοι στον αποξηραμένο – αλατισμένο μπακαλιάρο δεν παράγουν ισταμίνη. Συμπερασματικά, οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί είναι παρόντες στον αποξηραμένο μπακαλιάρο και πολλαπλασιάζονται γρήγορα στους 35° C και τα τροφιμογενή νοσήματα από ισταμίνη, δε συνδέονται με τον αλατισμένο μπακαλιάρο (Lorentzen et al, 2014).

Μεταξύ του 1970 – 2000 παρατηρήθηκε μείωση της σύλληψης μπακαλιάρου από 3000000 σε 1000000 τόνους ανά χρόνο. Γι' αυτό από το 2000 μέχρι και το 2003 παρουσιάστηκε αύξηση της καλλιέργειας μπακαλιάρου από 169 σε 2565 τόνους. Το 2010 η παγκόσμια παραγωγή σύλληψης γάδου ανήλθε στους 950950 τόνους και εκτιμάται ότι τα επόμενα χρόνια η παραγωγή ψαριού θα προέρχεται από υδατοκαλλιέργειες (Oliveira et al, 2012).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί καινούριες τεχνικές αλάτισης όπως η οσμωτική αφυδάτωση υπο κενό (VOD-Vacuum osmotic dehydration) και η έγχυση αλατιού (Injection salting), οι οποίες παρουσιάζουν ταχύτερη πρόσληψη NaCl απ' ότι οι συνηθισμένες τεχνικές.

1.4.2 ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Τα αποξηραμένα προϊόντα παρουσιάζουν μεγάλη καταλληλότητα στη χρήση, λόγω του ότι είναι ελαφρά και δεν καταλαμβάνουν πολύ χώρο διευκολύνοντας τη

μεταφορά και την αποθήκευση. Πωλούνται λιανικώς σε καταστήματα ασυσκευάστα χωρίς αποθήκευση ή και νωπά μετά από αφαλάτωση ή όχι. Σύμφωνα με τον Di Luccia et al (2005), η Δανία και η Νορβηγία υπήρξαν αυτοί με την υψηλότερη παραγωγή και εξαγωγές σε αποξηραμένο μπακαλιάρο (Oliveira et al, 2012).

Η επεξεργασία ξήρανσης περιλαμβάνει κατά σειρά την αλάτιση, το πλύσιμο, την προξήρανση (water-horsing), την ξήρανση, την ταξινόμηση και τη συσκευασία. Συγκεκριμένα για το μπακαλιάρο, η περίοδος αλάτισης διαρκεί περισσότερο, διότι περιλαμβάνεται και η αφυδάτωσή του μέσα σε μια σήραγγα με θερμό αέρα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σ' αυτό το στάδιο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα κινδύνου, μόλυνσης του ψαριού με μικροοργανισμούς από το περιβάλλον. Κατά την ξήρανση του μπακαλιάρου η θερμοκρασία είναι γύρω στους 20° C και η σχετική υγρασία χαμηλότερη από 70%. Σύμφωνα με τον Jason & Peters (1973) η ξήρανση του μπακαλιάρου εμφανίζεται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο παρατηρείται και ελέγχεται από τη σταθερή απώλεια νερού, εξαρτώμενο από τη συναγωγή του αέρα και τη μεταφορά θερμότητας. Τέλος, το δεύτερο και το τρίτο στάδιο το οποίο ελέγχεται από τον φθίνοντα ρυθμό απώλειας νερού και τη διάχυση του νερού μέσα στο ψάρι. Ο συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος στο δεύτερο από το τρίτο στάδιο και εξαρτάται από το περιεχόμενο λίπους του ψαριού. Στον αποξηραμένο μπακαλιάρο δημιουργείται ένας σχηματισμός αδιαπέραστου στρώματος άλατος – πρωτεΐνης στην επιφάνεια του ψαριού. Συγκεκριμένα, εκτός από την απώλεια νερού συμβαίνει και μια μικρή απώλεια άλατος 2 – 4% περίπου από την επιφάνειά του. Η ξήρανσή του, επίσης, προκαλεί και ορισμένες επιπτώσεις στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά όπως το κιτρίνισμά του. Η σάρκα του σκληραίνει με την ξήρανση, λόγω μετουσίωσης και μείωσης της ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και επιπλέον, η σκληρότητα εξαρτάται και από τη μέθοδο αλάτισης. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της ξήρανσής του είναι η ενεργότητα νερού, η οποία είναι χαμηλότερή από 0.75. Η τιμή αυτή δεν είναι καθόλου ευνοϊκή για την ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών, ωστόσο, ορισμένα αλοανθεκτικά επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε ιδανικότερες συνθήκες. Σύμφωνα με τον Linton & Wood (1945), οι βέλτιστες συνθήκες ξήρανσης για τον αλατισμένο μπακαλιάρο είναι η ταχύτητα αέρα με τιμή 1 – 1.25 m / s, η σχετική υγρασία 45 – 55%, και η θερμοκρασία στους 26° C (Oliveira et al, 2012).

1.4.3 ΚΑΠΝΙΣΗ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Για τον καπνιστό μπακαλιάρο, εφόσον έχει γίνει η εκδορά, τα φιλέτα τοποθετούνται σε 70 – 80% άλμη για 4 – 10 λεπτά, ανάλογα με το μέγεθός τους. Πριν την κάπνιση, αφήνεται να σταθεί όρθιο για να στάξει. Ο χρόνος κάπνισης ποικίλει από 2 – 5 ώρες, και πάλι με βάση το μέγεθος. Η θερμοκρασία μέσα στον κλίβανο κάπνισης ελέγχεται και συνήθως φτάνει τους 27° C (Oliveira et al, 2012).

1.5 Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ ΣΗΜΕΡΑ

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση για τη διατήρηση της φύσης (IUCN-International Union for Conservation of Nature of threatened species), ο *G. morhua* από το 1996 έχει δημοσιευτεί στην κόκκινη λίστα κατηγορίας των ευάλωτων ειδών (Vulnerable-VU). Η ταξινόμηση στην κατηγορία VU δηλώνει ότι το συγκεκριμένο είδος δεν είναι κρισίμως απειλούμενο ή υπο εξαφάνιση, αλλά αντιμετωπίζει υψηλό κίνδυνο εξαφάνισης στο φυσικό του περιβάλλον στο μεσοπρόθεσμο μέλλον (www.iucnredlist.org). Η αλίευση του μπακαλιάρου από ψαράδες των Η.Π.Α ξεκινά από τον 17^ο αι. και αποτελεί ένα από τα πιο προσοδοφόρα προϊόντα κατά την περίοδο της αποικιοκρατίας.

Σύμφωνα με τον Horwood et al (2006), η τρέχουσα κατάσταση του μπακαλιάρου στη Βόρεια Θάλασσα (*G. morhua*) με εξασθενημένο το απόθεμα μπακαλιάρου, αναφέρει επιστημονικές συμβουλές και μέτρα ανάκαμψης, απαντώντας στο ερώτημα εάν είναι ικανά να επιτευχθούν σ' ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Οι περιορισμοί στην αλίευση της Βόρειας Θάλασσας μείωσαν σημαντικά το ποσοστό θνησιμότητας, σχεδόν 37%, ένα ποσοστό ανεπαρκές για την αποκατάσταση του πληθυσμού τις επόμενες δεκαετίες. Κατά τις αρχές της δεκαετίας του '70, η βιομάζα του αναπαραγωγικού αποθέματος (SSB- Stock Spawning Biomass) μειώθηκε από την κορυφή των 250000 τόνων στα επίπεδα των 40000 τόνων το 2006, αρκετά χαμηλά σε σχέση με τη στάθμη του ορίου (70000 τόνοι), με βάση το Διεθνές Συμβούλιο Εξερεύνησης της Θάλασσας (ICES International Council for the Exploration of the Sea). Οι τιμές στο ποσοστό θνησιμότητας, το 2004 κυμαίνονταν από 0.7 – 1.5, παρατηρώντας ότι το 60% του πληθυσμού αλιεύεται (Horwood et al, 2006).

Ήδη, από το 1990 το ICES παρείχε συμβουλές και ενημέρωσε για περικοπές στη θνησιμότητα λόγω αλιείας για το μπακαλιάρο. Ανέφερε, επίσης, ότι αν δεν συνέβαινε το γεγονός να αλιεύεται ο μπακαλιάρος ως μέρος μεικτών ειδών της κάθε αλιείας, τότε τα συνολικά επιτρεπόμενα αλιεύματα (TAC-Total Acceptable Catch), θα ήταν μηδενικά. Το 2002, το ICES και το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο, εξέφρασαν πιο επίσημα συμβουλές για την απαγόρευση της αλιείας, και ότι μόνον με μηδενική θνησιμότητα λόγω αλιείας θα μπορούσε το απόθεμα να επανέλθει σε ασφαλή επίπεδα το γρηγορότερο δυνατό. Την ίδια χρόνια Νορβηγοί επιστήμονες συναντήθηκαν με το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αποκατάσταση του αποθέματος μέσα σε μια δεκαετία, μπορεί να πραγματοποιηθεί με περικοπές στη θνησιμότητα αλιείας γύρω στο 60 – 70%. Τα μέτρα ανάκαμψης που λήφθηκαν ήταν να αυξηθεί το μέγεθος του πλέγματος από τις τράτες και να γίνεται η χρήση κλειστών χώρων για τη διατήρηση του μπακαλιάρου. Τα εφαρμοζόμενα μέτρα διαδραμάτισαν κάποιο ρόλο, αλλά η αποκατάσταση του αποθέματος απαιτούσε χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (Horwood et al, 2006).

Η συμφωνία του Δεκεμβρίου 2005 μεταξύ της Νορβηγίας και του Επιτροπής Υπουργών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Committee of Ministers), επιδίωξε την αποκατάσταση του μπακαλιάρου βάση κοινών συμφωνιών και σχεδίων διαχείρισης. Η επίτευξη αυτή έθετε τις τιμές TAC να συμβαδίζουν με το 30% της ετήσιας αύξησης της SSB. Επιπλέον περιορισμοί, στα μεγέθη πλέγματος, αύξηση από 100 σε 120 χιλ. σε τράτες των λευκόψαρων. Γι' αυτούς που χρησιμοποιούν βάρκες με ταχύτητες έχοντας με πλέγμα μεγέθους μεγαλύτερο από 100 χιλ., τους επιτράπη 9 μέρες στη θάλασσα /μήνα, με δίχτυα 16 ημέρες, με δοκότραπεζες 15 ημέρες, και με 70 – 99 mm, 25 ημέρες το μήνα. Όσο για τις μηχανότραπεζες το 2002, το μέγεθος του πλέγματος δεν

επηρεάστηκε, γι' αυτό δεν έχουν παρατηρηθεί βελτιώσεις για την επιλεκτικότητα των ψαριών (Horwood et al, 2006).

Σύμφωνα με τον Shelton et al (2006), η έλλειψη αποκατάστασης του μπακαλιάρου στη Βόρεια Θάλασσα, οφείλεται σ' ένα συνδυασμό παραγόντων όπως η αυξημένη φυσική θνησιμότητα, η μειωμένη ανάπτυξη, και η εκμετάλλευση. Ο Horwood et al, (2006) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι θα ήταν συνετός ένας σχεδιασμός ευθυγράμμισης της θνησιμότητας αλίευσης και της προσπάθειας αποκατάστασης μπακαλιάρου στα επίπεδα των στόχων διαχείρισης της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τη Νορβηγία, λαμβάνοντας υπόψη τις πολύπλοκες υποδομές των αλιευμάτων.

Τα αποθέματα μπακαλιάρου σύμφωνα με τη πιο πρόσφατη επιστημονική αξιολόγηση των αποθεμάτων στον κόλπο του Μέιν (Northeast Regional Stock Assessment Workshop 2013) από το Επιστημονικό Κέντρο Αλιείας, βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Το αναπαραγωγικό απόθεμα ανέρχεται περίπου σε 10000 τόνους, πολύ χαμηλό επίπεδο από το επίπεδο στόχου που είχε τεθεί (περίπου 60000 τόνοι) για την αποκατάσταση στο κόλπο. Βάση εκτιμήσεων το 2012 στον κόλπο του Μέιν και στην όχθη του Γεωργίου αναφέρεται υπεραλίευση (υψηλός ρυθμός αλιείας) και η αποκατάσταση του μπακαλιάρου δεν ανακάμπτει με τον αναμενόμενο ρυθμό. Για τον λόγο αυτό το 2013, οι ποσοτώσεις των αποθεμάτων μειώθηκαν σημαντικά, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει την σημαντική αποκατάστασή τους. Στον κόλπο του Μέιν και στην όχθη του Γεωργίου, οι ποσοτώσεις του μπακαλιάρου μειώθηκαν κατά 80% και 60% αντίστοιχα. Το Συμβούλιο Διαχείρισης Αλιείας της Νέας Αγγλίας συνεχίζει να ασχολείται με μέτρα διαχείρισης για την προστασία αποθεμάτων μπακαλιάρου, και την δημιουργία ευκαιριών για του αλιείς να στοχεύσουν σε άλλα υγιή αποθέματα αλιευμάτων πέραν του μπακαλιάρου και αναπτύσσει πρόγραμμα ανοικοδόμησης για την ανασύσταση του αποθέματος το ταχύτερο δυνατό(www.fishwatch.gov).

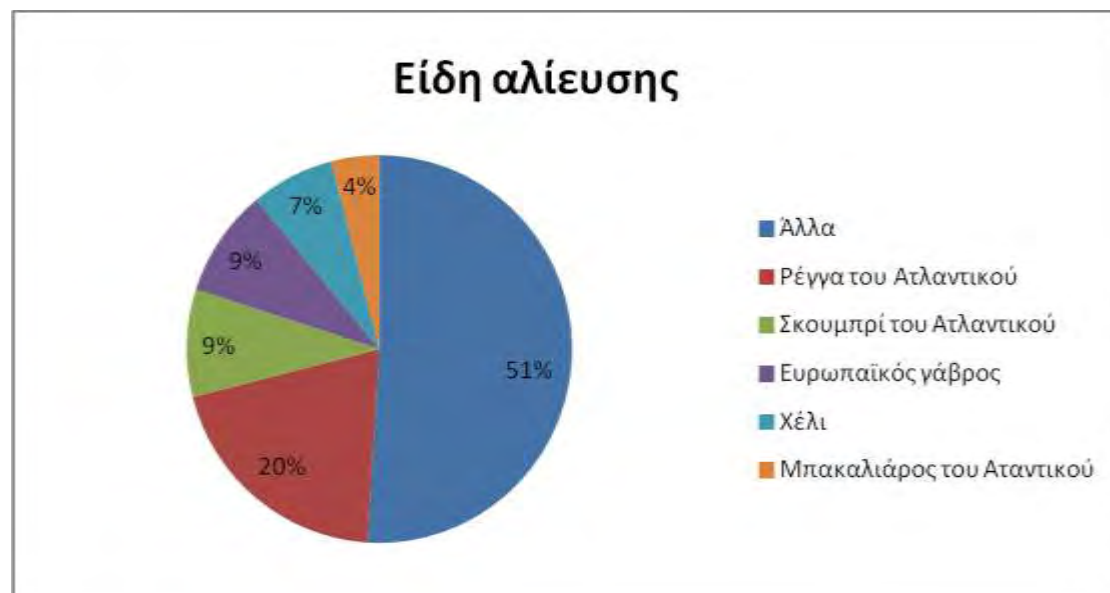
Το 2012, η παγκόσμια παραγωγή της αλίευσης όλων των ειδών μπακαλιάρου (cods, haddocks, hakes), έφτανε τα 7.698.812 τόνους, από τα 91.336.230 τόνους της παγκόσμιας συνολικής αλίευσης, ενώ την ίδια χρονιά ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού (*G. morhua*) κατείχε την 9^η θέση (1.114.382 τόννοι) στην παραγωγή αλίευσης ανάμεσα σε 70 επιπλέον είδη. Η παγκόσμια παραγωγή καλλιέργειας γαδοειδών ανέρχονταν το 2012 στους 11.000 τόνους από τους 66. 633 τόνους συνολικά της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (Food and Agriculture Organization-FAO yearbook 2012), ενώ το 2013 παρατηρήθηκε μείωση στους 4.252 τόνους (FAO, 2015). Για την καλλιέργεια του *G. morhua* συγκεκριμένα, η παραγωγή του σε τόνους έφτανε τους 10.926 και 4.252 τόνους για το 2012 και 2013 αντίστοιχα (FAO, 2015).

Σε Αμερική και Ευρώπη, το 2013, η παγκόσμια παραγωγή (αλίευση και ιχθυοκαλλιέργεια) του *G. morhua* ανέρχονταν στα 1.363.820 τόνους με την Νορβηγία και την Ισλανδία να αποτελούν τους σημαντικότερες περιοχές εκφορτώσεων με παραγωγή 475.376 και 236.533 τόνους αντίστοιχα. Η Ρωσική Ομοσπονδία, επίσης, βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα παραγωγής με 436.466 τόνους (FAO, 2015). Στον παρακάτω πίνακα 4 δίνεται η παγκόσμια παραγωγή του μπακαλιάρου του Ατλαντικού για τη χρονική περίοδο τεσσάρων ετών.

Πίνακας 4 : Παγκόσμια παραγωγή (αλίευση και υδατοκαλλιέργεια) του *G. morhua* κατά τα έτη 2008 - 2011 (FAO, 2015)

Παγκόσμια παραγωγή του μπακαλιάρου του Ατλαντικού για το 2008 – 2011 σε τόνους			
2008	2009	2010	2011
771.884	890.778	974.491	1.067.695

Στο παρακάτω διάγραμμα 2 απεικονίζονται τα 5 κυριότερα είδη αλίευσης από τα μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το 2013 στην περιοχή του Βορειοανατολικού Ατλαντικού, σύμφωνα με το στατιστικό βιβλίο για την γεωργία, δασοκομία και αλιεία (Agriculture, forestry, and fishery statistics, eurostat), έκδοσης 2014. Ανάμεσα στα κυριότερα είδη αλίευσης είναι και ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού αντιπροσωπεύοντας το 4% των σημαντικότερων αλιευμάτων στην περιοχή του Βορειοανατολικού Ατλαντικού.



Διάγραμμα 1: Σημαντικότερα είδη αλίευσης από μέλη της ΕΕ στην περιοχή του Βορειοανατολικού Ατλαντικού για το 2013 (ec.europa.eu/eurostat).

Η αξία της αλίευσης αυξήθηκε σημαντικά για το συγκεκριμένο είδος το 2011. Οι εκφορτώσεις αποτιμήθηκαν στα \$32.600.000 την ίδια χρονία, παρουσιάζοντας μια αύξηση της τάξης των \$4.000.000 (παραπάνω από 16%) σε σχέση με το 2010 (www.fishwatch.gov).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι Gram αρνητικό βακτήριο, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο, μεσόφιλο και δεν σχηματίζει ενδοσπόρια. Ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae*, στην οποία ανήκουν παραπάνω από 30 επιπλέον είδη. Το γένος *Vibrio* (δονάκιο) περιλαμβάνει παραπάνω από 30 είδη, όπως *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. carchariae*, *V. albensis*, *V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. rarus*, *V. proteolyticus*, *V. penaeicida*, *V. orientalis*, *V. nereis*, *V. natriegens*, *V. mediterranei*, *V. inusitatus*, *V. ichthyenteri*, *V. harveyi*, *V. halioticoli*, *V. gazogenes*, *V. fischeri*, *V. ezurae*, *V. diazotrophicus*, *V. comitans*, *V. campbellii*, *V. azureus*, *V. aestuarianus*, *V. costicola*, *V. aerogenes*, *V. anguillarum* κ.α. (Park et al, 2004; Sakata et al, 2011). Ωστόσο, το *Vibrio cholerae*, το *Vibrio parahaemolyticus*, και το *Vibrio vulnificus* είναι τα τρία κυριότερα είδη *Vibrio*, που εμπλέκονται στην πρόκληση τροφιογενών νοσημάτων (Solomakos et al, 2012).

Τροφιογενή νοσήματα σχετίζονται κυρίως με την κατανάλωση ατελώς θερμικά επεξεργασμένων ή με επιμόλυνση κατά την επεξεργασία νωπών αλιευμάτων όπως μπακαλιάρο, σαρδέλα, σκουμπρί, καλκάνι, αχιβάδα, χταπόδι, γαρίδες, καβούρια, αστακοί, χτένια και στρείδια (Liston, 1990). Ιδιαίτερη σημασία διαδραματίζουν τα δίθυρα μαλάκια, τα οποία έχουν την ικανότητα να διηθούν το νερό, για την διατροφή τους, μιας και ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε υδάτινα οικοσυστήματα σε όλη την υφήλιο, και κυρίως σε θαλάσσια παράκτια ύδατα (Solomakos et al, 2012). Ενδημεί κυρίως σε υφάλμυρα νερά, λόγω της αλατότητας που απαιτεί, αλλά και σε νερά των ποταμών (Turner et al, 2013). Βρίσκεται, επίσης σε αιωρούμενα σωματίδια, ζωοπλαγκτόν, ψάρια και οστρακοειδή (Levin, 2007). Επιβιώνει σε θαλάσσια ιζήματα, όταν οι θερμοκρασίες δεν είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές γι' αυτό ($< 15^{\circ}\text{C}$), κυρίως τους χειμερινούς μήνες, τα οποία αποτελούν πηγή για την ανάπτυξη του, όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκότερες. Η σπουδαιότητα της θερμοκρασίας του νερού επιβεβαιώνεται από τα περισσότερα επιδημιολογικά δεδομένα που αναφέρουν εξάρσεις κρουσμάτων τους θερινούς μήνες. Λόγω της συνεχόμενης αύξησης των θερμοκρασιακών επιπέδων των ωκεανών, το *V. parahaemolyticus* έχει εντοπιστεί στα παράκτια ύδατα του Βορρά, αλλά και σε Νότιες ακτές της Αλάσκας. Σε αντίθεση με χώρες της τροπικής ζώνης, η εποχικότητα του *V. parahaemolyticus* αναφέρεται λιγότερο σε σχέση με τη μόλυνση που συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου (Nair et al, 2007). Υπάρχει στα θαλασσινά νερά, κολυμπώντας, με μονό πολιτικό μαστίγιο, ή με πολλά άλλα πλευρικά μαστίγια που αναπτύσσει, μπορεί να έρπει σε επιφάνειες (Broberg et al, 2011). Ενώ ο μικροοργανισμός σχετίζεται με τροφιογενή νοσήματα, πολλά από τα στελέχη του είναι αυστηρά περιβαλλοντικά (Ham et al,

2012). Τα περισσότερα στελέχη του *V. parahaemolyticus*, που απομονώνονται από το περιβάλλον ή από τρόφιμο – θαλασσινά δεν είναι παθογόνα (Nichibuchi et al, 1995)

Μετά και την ανακάλυψή του, το 1950 στην Ιαπωνία, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει γίνει η κύρια αιτία τροφολοιμώξεων που προέρχονται από κατανάλωση θαλασσινών (Broberg et al, 2011).

2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Τρία είδη κυρίως της οικογένειας *Vibrionaceae*, το *V. parahaemolyticus*, το *V. cholerae*, και το *V. vulnificus* αποτελούν τα σημαντικότερα είδη που σχετίζονται με τροφιμογενή νοσήματα (Bauer et al, 2006). Το *V. parahaemolyticus* λόγω του ότι αποτελεί σημαντικό αίτιο πρόκλησης οξείας γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως (Broberg et al, 2011), όπως έχει προαναφερθεί παραπάνω, αξίζει να μελετηθεί η δομή και η λειτουργία του.

2.2.1 ΣΧΗΜΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Όπως και τα περισσότερα είδη *Vibrio*, έτσι και το *V. parahaemolyticus*, είναι ευθύς ή και κοίλο, και το πλάτος κυμαίνεται από 0.5 έως 0.8 μm και το μήκος 1.4 έως 2.6 αντίστοιχα (Solomakos et al, 2012). Είναι μη σπορογόνο και διαθέτει ένα μονό πολικό μαστίγιο, για να κολυμπάει στο υδάτινο περιβάλλον, αντλώντας δύναμη από το στοιχείο νάτριο, το οποίο προμηθεύει από υφάλμυρα νερά και μπορεί να αναπτύσσει μ' αυτό, ταχύτητες μεγαλύτερες από 60 $\mu\text{m/s}$, στο υδάτινο περιβάλλον (Broberg et al, 2011). Όταν οι συνθήκες δεν είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές γι 'αυτό, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξή του σε περιορισμένες συνθήκες σιδήρου, παρουσιάζεται μείωση στο ρυθμό ταχύτητας του μαστιγίου, και παράγεται ένας αριθμός τριχοειδών πλευρικών μαστιγίων, διαφορετικά από το μονό πολικό μαστίγιο, χωρίς να φέρουν μανδύα, εξασφαλίζοντας την κίνησή τους από πρωτόνια που το βοηθούν να έρπει σε στερεές ή ημι – στερεές επιφάνειες (Broberg et al, 2011).

Ιστορικά, η ταξινόμηση των στελεχών του βακτηρίου γίνεται με βάση τον ορότυπο, ενώ πιο πρόσφατα υπήρξαν ταξινομήσεις με κριτήριο την παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα. Τα στελέχη του βακτηρίου θεωρούνται παθογόνα εάν είναι παρόντα τα *tdh* και *trh* γονίδια, για τις TDH και TRH αιμολυσίνες αντίστοιχα (Drake et al, 2007). Η οροτυποποίηση των στελεχών γίνεται με τη χρήση αντισωμάτων που παράγουν. Συγκεκριμένα, με το O σωματικό αντιγόνο, με το K αντιγόνο κάψας, και επιπλέον με το κοινό αντιγόνο μαστιγίου H, που βρίσκεται σε όλα τα στελέχη *V. parahaemolyticus*. Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί 12 σωματικά αντιγόνα O, και παραπάνω από 76 αντιγόνα κάψας K, εντούτοις πολλά στελέχη παραμένουν με μη τυποποιήσιμο ορότυπο (Kaysner et al, 2001).

Ο ορότυπος O3:K6 και οι παραλλαγές του, έχουν χαρακτηριστεί ως πανδημικό στέλεχος που σχετίζεται με την μεγαλύτερη αύξηση μολύνσεων από το *V. parahaemolyticus* παγκοσμίως (Turner et al, 2013). Το 1996 στην Calcutta της Ινδίας

από απομονώσεις ασθενών που νοσηλεύτηκαν με διάρροια, αναλύσεις έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος ορότυπος, ήταν θετικός σε *tdh* γονίδια, σε *trh* και στην ουρεάση αρνητικός (Nair et al, 2007). Ο προσδιορισμός του οροτύπου O3:K6, οδήγησε στην εύρεση κι άλλων οροτύπων – παραλλαγών, οι οποίοι έχουν ταυτόσημα την αλληλουχία του ρυθμιστή *toxRS*, και παρόμοια προφίλ μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης του μικροοργανισμού όπως *ribotypes*, PFGE (pulsed- field gel electrophoresis), καθώς και ανοσολογικών AP – PCR (Arbitrarily primed Polymerase Chain reaction). Τέτοιοι ορότυποι είναι O1:KUT (untypeable), O4:K68, O1:K25 (Nair et al, 2007).

2.2.2 ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Για την προσκόλληση του βακτηρίου σε κύτταρα ξενιστές, αναπτύσσονται μηχανισμοί, και έκκριση τοξινών. Μία πρωτεΐνη, η οποία είναι απαραίτητη για την αρχική επαφή και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου σε κύτταρα ξενιστές ονομάζεται multivalent adhesion molecule (MAM), και αποτελείται από έξι ή επτά περιοχές με τις οποίες μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι η MAM7, υπάρχει σ' ένα αριθμό Gram – παθογόνων και δεσμεύεται και από την ιννεκτίνη και το φωσφατιδικό οξύ και ότι χωρίς τη συγκεκριμένη δέσμευση θα μπορούσε να εμποδιστεί η προσκόλληση του παθογόνου στα κύτταρα ξενιστές. Επιπλέον, μία ετερόλογη έκφραση της MAM7, έδειξε ότι η σύνδεση μη παθογόνων στελεχών *E. coli* σε κύτταρα ξενιστές, κατάφερε να μετριάσει την κυτταροτοξικότητα του *V. parahaemolyticus*, και ότι η λειτουργία της μπορεί να παρέχει έναν αρχικό θεραπευτικό στόχο, όχι μόνο για το συγκεκριμένο βακτήριο, αλλά και για έναν μεγάλο αριθμό Gram – βακτηρίων (Broberg et al, 2011).

Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το *V. parahaemolyticus* μπορεί να παράγει μια κάψα, με παραπάνω από 70 διαφορετικά K αντιγόνα, τα οποία ανιχνεύονται σε διάφορα στελέχη, με την ενεργοποίηση της OpaR πρωτεΐνης (Broberg et al, 2011).

Όλα τα στελέχη του *V. parahaemolyticus* που έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα, παρουσιάζουν την β – αιμολυτική δράση με δύο τοξίνες, την θερμοανθεκτική αιμολυσίνη TDH (Thermostable Direct Haemolysin), και την TRH (TDH – Related Haemolysin) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tdh* και *trh*, αντίστοιχα. Αυτές οι δύο τοξίνες έχουν την ικανότητα να λύουν ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια όταν τοποθετηθούν σε πλούσιο αλατότητας Wagatsuma άγαρ, και η διαδικασία αυτή, ονομάζεται Kanagawa Φαινόμενο (Kanagawa Phenomenon-KP). Το φαινόμενο αυτό είναι ο πιο συνηθής τρόπος για να προσδιοριστεί το *V. parahaemolyticus* στα θαλασσινά, καθώς και σε δείγματα ασθενών. Δεν είναι όμως, ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό των παθογονικών οροτύπων μιας και είναι ένα φαινοτυπικό και όχι γενοτυπικό test (Broberg et al, 2011).

Η TDH είναι μία τοξίνη που αποτελείται από άμυλο, και συνδέεται με χοληστερόλη και λιπίδια. Παραμένει ανενεργή στους 100° C για 10 λεπτά και η δράση της στα ερυθροκύτταρα δεν ενισχύεται με την παρουσία λεκιθίνης (Nishibuchi et al, 1995). Η ώριμη δομή της TDH αποτελείται από 165 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένου και ενός

ενιαίου ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού (Yanagihara et al, 2010). Η κρυσταλλογραφική της δομή με ακτίνες – X, δείχνει ότι είναι ομοτετραμερής, με έναν κεντρικό πόρο. Ο κεντρικός πόρος του τετραμερούς έχει διάμετρο 23 Å και βάθος 50 Å (Yanagihara et al, 2010). Αυτός ο κεντρικός πόρος, με σχετικά μεγάλη διάμετρο, και περιέχοντας μόρια νερού, λειτουργεί σαν ένα κανάλι που επιτρέπει τη ροή νερού και ιόντων μέσω μιας μεμβράνης χαμηλής αντίστασης, και πιθανολογείται ότι είναι ο μηχανισμός πρόκλησης διάρροιας στο έντερο, λόγω της αλλαγής ροής ιόντων. Ο τετραμερής σχηματισμός της και ο κεντρικός πόρος σχετίζεται με την αιμολυτική της ικανότητα και για την βιολογική της δραστηριότητα (Yanagihara et al, 2010). Οι TDH και TRH τοξίνες που εκκρίνονται από το βακτήριο, επιτρέπουν στα ιόντα από τους πόρους να διαχυθούν εύκολα στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και να προκαλέσουν αιμόλυση ή κυτταροτοξικότητα. Η TDH τοξίνη θεωρείται ο σημαντικότερος μολυσματικός παράγοντας για την παθογένεια του εν λόγω βακτηρίου, παρόλο που μελέτες έδειξαν ότι απουσία *tdh* γονιδίων δεν επηρέασε την κυτταροτοξικότητα σε HeLa κύτταρα (Broberg et al, 2011).

Η TRH τοξίνη δρα με παρόμοιο τρόπο, και αυτό οφείλεται στο ότι παρουσιάζεται υψηλή ομολογία ανάμεσα στα *tdh* και *trh* γονίδια κατά 68%. Έχει ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με την TDH και είναι ευαίσθητη στους 60° C (Bhowmik et al, 2014). Σε απομονώσεις του μικροοργανισμού από ασθενείς, έχει βρεθεί ότι τα στελέχη που παράγουν την τοξίνη TRH είναι αρνητικά στο KP φαινόμενο. Ο Shirai et al (1990) αναφέρει ότι το 24.3% σε απομονώσεις κλινικών στελεχών από ασθενείς, είχε την παρουσία μόνον των *trh* γονιδίων. Αυτό υποδηλώνει την τοξίνη TRH ως έναν μολυσματικό παράγοντα (Su & Liu, 2007).

Άλλη μια τοξίνη, η TLH (thermolabile haemolysin), η πρωτεάση της σερίνης κωδικοποιείται από τα γονίδια *tlh* και βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του *V. parahaemolyticus*. Τείνει να μιμηθεί το περιβάλλον των κυττάρων ξενιστών, και είναι εξίσου σημαντική στην λειτουργία της ανθρώπινης μόλυνσης, ωστόσο λίγα μονό είναι γνωστά γι' αυτήν (Broberg et al, 2011). Η πρωτεάση της σερίνης έχει σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη ωοθηκών κινέζικων hamster, σε HeLa, Vero, και Caco-2 κύτταρα, και επιπλέον λύει ερυθροκύτταρα, προκαλεί αιμορραγία ιστών, και θάνατο σε ποντίκια, όταν γίνεται έγχυση ενδοπεριτονιακά και ενδοφλέβια. Ωστόσο κλινικές περιπτώσεις δεν έχουν προσδιοριστεί (Su & Liu, 2007).

Ο τύπος III του συστήματος έκκρισης του *V. parahaemolyticus* (Type III Secretion System – T3SS), αποτελεί ακόμη ένα μολυσματικό παράγοντα. Πρόκειται για ένα οργανίδιο του βακτηρίου που έχει ως στόχο τη μεταφορά πρωτεϊνών – τελεστών, από το κυτταρόπλασμά του, απ' ευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή χωρίς να απελευθερώνονται στον εξωκυττάρικο χώρο. Υπάρχουν παραπάνω από 100 πρωτεΐνες – τελεστές του τύπου III συστήματος έκκρισης. Το βασικό σώμα του αποτελείται από 20 – 30 πρωτεΐνες, και εκτείνεται τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, ένας αγωγός που λειτουργεί σαν βελόνα μεταξύ του βακτηρίου και του ευκαρυωτικού κυττάρου, και ένας πόρος που εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Δομικά, η συγκεκριμένη συσκευή ομοιάζει με το μονό πολικό μαστίγιο (Broberg et al, 2011).

Το γονιδίωμα του στελέχους RimD2210633, το οποίο αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα, αποκάλυψε ότι το πρώτο χρωμόσωμα κωδικοποιεί το τύπου III

εκκριτικό σύστημα 1 (T3SS1), και συγγενείς τελεστές του, ενώ το δεύτερο χρωμόσωμα κωδικοποιεί το τύπου III εκκριτικό σύστημα 2 (T3SS2) και συγγενείς τελεστές επίσης, καθώς και *tdh* γονίδια. Επιπλέον, υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων για το T3SS2, T3SS2α και T3SS2β (Broberg et al, 2011).

Το τύπου III Secretion System (T3SS1), βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του *V. parahaemolyticus*, προκαλεί κυτταροτοξικότητα, παρουσιάζει ομοιότητα με το εκκριτικό σύστημα της *Yersinia*, και παρακινείται από αυξανόμενες υγρές καλλιέργειες με χαμηλά επίπεδα ασβεστίου στους 37° C. Η H₂N₂ (Heat – stable Nucleoid Structuring) είναι μία πρωτεΐνη που απαντάται σε Gram – αρνητικά βακτήρια, και είναι γνωστή, για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων T3SS1 (Broberg et al, 2011).

Τα περισσότερα Gram – παθογόνα επιφέρουν κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις, προφλεγμονώδεις ανταποκρίσεις, και κυτταρικό θάνατο διαταράσσοντας την κανονική φυσιολογία του εντερικού βλεννογόνου. Αυτές οι κυτταρικές επιδράσεις προκαλούνται από τις πρωτεΐνες – τελεστές (Nair et al, 2007).

Το τύπου III Secretion System (T3SS2), κωδικοποιείται από τα γονίδια Vp – PAI, και έχει μεγάλη ομοιότητα με το σύστημα Hrp 1, του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*. Προκαλεί εντεροτοξικότητα σε κουνέλια, κυτταροτοξικότητα σε Caco - 2 κύτταρα καθώς και διατάραξη σε καλλιεργημένες μονοστοιβάδες κυττάρων. Έχει βρεθεί στις περισσότερες κλινικές απομονώσεις, και στελέχη με την παρουσία του, σχετίζονται με πανδημίες και εκρήξεις ασθενειών. Εν απουσία του, στελέχη του βακτηρίου δεν παρουσιάζουν παθογονικότητα. Οι ρυθμιστές μεταγραφής VtrA (VPA1332) και VtrB (VPA1348), ενεργοποιούν τη μεταγραφή των *tdh* γονιδίων, τα T3SS2 δομικά γονίδια, και τις πρωτεΐνες – τελεστές VopC, VopT, VopA, VopL (Broberg et al, 2011).

Η VopC επιφέρει στο κύτταρο απορύθμιση του δικτύου ακτίνης, τροποποίηση του μιτοχονδριακού δικτύου, εμποδίζοντας την υδρόλυση της GTP (guanosine triphosphate) με την εξωτοξίνη CNF1, η οποία βρίσκεται και σε μερικά παθογόνα στελέχη *E. Coli*. Η VopT παρουσιάζει, επίσης κυτταροτοξικότητα, αναστέλλοντας σημαντικές λειτουργίες όπως κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση κ.α. Η VopA εμποδίζει το MAPK (mitogen – activated protein kinases) μονοπάτι αποτρέποντας τη φωσφορυλίωσή του, και την επαγωγή κυτοκινών, και η VopL μπορεί να αλλάξει το σχήμα του κυττάρου και να επιφέρει πολυμερισμό της ακτίνης, επιμηκύνοντας το σχήμα της. Επιπλέον, ένα ομόλογο από το *V. cholerae* παρουσιάζει ανώμαλες προεξοχές ακτίνης στην επιφάνεια του κυττάρου (Broberg et al 2011).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία VP – PAI γονιδίων, και συγκεκριμένα για το T3SS2, στα στελέχη του *V. parahaemolyticus*, είναι ανίκανα να επιβιώσουν με την παρουσία μαστιγοφόρων και κροσσωτών πρωτίστων, καθώς και με αμοιβάδα. Από μελέτες σε ποντίκια, με ενδοπεριτονική έγχυση έχει βρεθεί ότι το T3SS1 και η TDH συμβάλλουν στη θνησιμότητα, ενώ σε κουνέλια είναι απαραίτητο το T3SS2 για τη συσσώρευση υγρού στον ειλεό. Σε μολυσμένα χοιρίδια στοματογαστρικά με στελέχη *V. parahaemolyticus*, που εξέφραζαν μόνον το T3SS2, προκλήθηκε οξεία γαστρεντερίτιδα, με παρόμοια συμπτώματα όπως σε ανθρώπους (Broberg et al, 2011).

Ακόμη ένας καθοριστικός παράγοντας παθογένειας, είναι ο μηχανισμός απόκτησης σιδήρου, που είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για όλους τους οργανισμούς. Το *V. parahaemolyticus* παράγει το σιδεροφόρο vibrioferrin. Για τη μεταφορά του σιδεροφόρου κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης, το βακτήριο διαθέτει υποδοχείς, συνδεδεμένοι με κασέτα (ATP-binding cassette) η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες, απαραίτητες για τη μεταφορά. Επιπλέον, το *V. parahaemolyticus* μπορεί να αποκτήσει σιδηροφορείς, οι οποίοι παράγονται από μύκητες και διαφορετικά είδη βακτηρίων ή επίσης και από την πρόσληψη αίμης. Ο ferrichrome και aerobactin είναι δύο σιδηροφορείς που μπορούν να ανακτηθούν από το βακτήριο (Broberg et al, 2011).

Η παραγωγή της ουρεάσης (urease), επιφέρει την υδρόλυση της ουρίας (Solomakos et al, 2012). Σε στελέχη που απομονώθηκαν από Ασιατικές χώρες, βρέθηκε μια δυνατή συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *trh* και της ουρεάσης (*ureR* genes), αν και η μεταγραφή των *trh* γονιδίων δε σχετίζεται με τα *ureR* γονίδια. Αυτό είναι ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό για το *V. parahaemolyticus* (Bisha et al, 2007). Οι Cal και Ni (1996) αναφέρουν ότι σε κλινικές απομονώσεις στελεχών αρνητικά στο KP και θετικά στην ουρεάση, βρέθηκε συγκέντρωση εντερικού υγρού στον ειλέο σε κουνέλια. Επιπλέον, σε θηλάζουσα ποντίκια παρατηρήθηκε μια ασθενής θετική ανταπόκριση. Υψηλές συσχετίσεις, επίσης, διεξήχθησαν μεταξύ ιόντων αμμωνίας και τοξικών επιδράσεων στην διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου, επιφέροντας σημαντικές γαστρεντερικές φλεγμονώδεις αλλοιώσεις. Σε κλινικές προοπτικές θετικά στην ουρεάση στελέχη, παρουσιάζουν αυξημένη μολυσματικότητα (Bhowmik et al, 2014). Τα περισσότερα κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη είναι αρνητικά στην ουρεάση. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες όπως Colwell (1970), Joseph et al (1982) έχουν δείξει ότι το 97% σε απομονώσεις του μικροοργανισμού, τα στελέχη ήταν θετικά στην ουρεάση, όπως και 13/19 στελέχη θετικά στην ουρεάση αντίστοιχα. Ο Abbott (1989) αναφέρει ότι κλινικά στελέχη από West Coast of California και Mexico, τα οποία ήταν ο υπερισχύων βιότυπος το 1983 σε εξάρσεις κρουσμάτων, ήταν θετικά στην ουρεάση. Από 45 απομονώσεις στελεχών του βακτηρίου, 32 στελέχη θετικά στην ουρεάση ανήκαν στον ορότυπο O4:K12 (Bisha, 2007).

2.2.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Το *V. parahaemolyticus* είναι ένα Gram – αρνητικός, αλόφιλος μικροοργανισμός. Είναι αερόβιο βακτήριο και προαιρετικά αναερόβιο και μπορεί να παράγει οξειδάση, καταλάση, και ζυμώσεις γλυκόζης χωρίς την παραγωγή αερίου (Solomakos et al, 2011). Αναλόγως από το στέλεχος και τον ορότυπο, είναι ορνιθίνη και λισίνη δεκαρβοξυλάση θετικός και ευμετάβλητος στην ουρεάση (Bisha et al, 2011).

Η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία μπορεί το βακτήριο να αναπτυχθεί είναι 8.3° C, ενώ η μέγιστη 45.3° C. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξή του κυμαίνονται από 37 – 39° C. Ο χρόνος διπλασιασμού του βακτηρίου σε βέλτιστες θερμοκρασίες είναι μικρότερος από 10 λεπτά (Solomakos et al, 2012). Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί, έχει βρεθεί ότι σε ακραίες θερμοκρασίες, η πυκνότητα του πληθυσμού δεν είναι τόσο μεγάλη όπως σε κανονικές θερμοκρασίες. Η παρουσία και η κατανομή του στο θαλάσσιο περιβάλλον και στα οστρακοειδή σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία

του νερού. Σε θερμοκρασίες νερού χαμηλότερες των 15° C, ο μικροοργανισμός δεν ανιχνεύεται, κυρίως τους χειμερινούς μήνες, ωστόσο επιβιώνει σε ιζήματα, και απελευθερώνεται στο νερό σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 15° C, νωρίς την Άνοιξη. Σε μελέτες, έχει βρεθεί, ότι σε θερμοκρασίες κάτω των 16° C, η χαμηλότερη μέση πυκνότητα του μικροοργανισμού είναι 4 κύτταρα/100ml, ενώ σε θερμοκρασίες γύρω στους 25° C φτάνει τα 1000 κύτταρα/100 ml (Su & Liu, 2007).

Ο συντελεστής ενεργότητας ύδατος (a_w), είναι ένας παράγοντας επίσης για την επιβίωση και ανάπτυξη του βακτηρίου. Για την ανάπτυξή του, το εύρος είναι 0.936 – 0.987. Οι βέλτιστες τιμές είναι μεταξύ 0.982 – 0.987 (Miles et al, 1997).

Η συγκέντρωση του NaCl είναι απαραίτητη για την ανάπτυξή του. Απαντάται κυρίως σε υφάλμυρα νερά, και έχει βρεθεί ότι μπορεί να επιβιώσει και σε συγκεντρώσεις πάνω από 8%, ωστόσο η ιδανικότερες τιμές συγκέντρωσης κυμαίνονται από 2 – 3% (Yang et al, 2010). Η ελάχιστη τιμή NaCl είναι 0.5% και η μέγιστη 10% .

Το εύρος pH κυμαίνεται 6.5 – 8.9 (Miles et al, 1997), με ελάχιστη τιμή για την ανάπτυξή του 4.8 (Jay et al, 2005). Σύμφωνα με τον Desmarchelier (1997), οι βέλτιστες τιμές pH είναι μεταξύ 7.8 – 8.6 και οι ακραίες 4.8 – 11. Η ανάπτυξη του βακτηρίου μπορεί να ανασταλεί με την παρουσία ακετικού οξέος στην τιμή pH 5.1. Η ανάπτυξη στην ελάχιστη τιμή pH, σχετίζεται με την τιμή της θερμοκρασίας και της συγκεντρώσεως NaCl. Έχει παρατηρηθεί μέτρια ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην τιμή pH 4.8 σε θερμοκρασία 30° C και συγκέντρωση NaCl 3% και ελάχιστη ανάπτυξη όταν η τιμή pH είναι 5.8 και 7% η συγκέντρωση NaCl (Jay et al, 2014).

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω το βακτήριο *V. parahaemolyticus* είναι αερόβιος μικροοργανισμός και προαιρετικά αναερόβιος. Στην ατμόσφαιρα αναπτύσσεται με ή χωρίς την παρουσία οξυγόνου, αλλά οι βέλτιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες.

2.2.4 ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Μια από τις μεθόδους για την καταστροφή και εξάλειψη του μικροοργανισμού είναι η θερμική επεξεργασία. Σε θερμοκρασίες από 0 – 5° C, το βακτηριακό κύτταρο καταστρέφεται. Η θέρμανση στους 65° C απενεργοποιεί αποτελεσματικά τον μικροοργανισμό. Έχουν βρεθεί οι τιμές D σε θερμοκρασία των 65° C (τιμή D< 1min) και σε θερμοκρασία των 55° C (τιμή D 2.5min). Οι τιμές D αυξάνονται, όταν οι τιμές του pH αυξάνονται από 5.0 – 8.0. Με βάση τους Vanderzant και Nickelson (1972), η θερμική επεξεργασία στους 60, 80 ή και 100° C μπορεί να θανατώσει αποτελεσματικά μικρούς πληθυσμούς του οργανισμού (5×10^2 cfu/g). Σε μεγαλύτερους πληθυσμούς (2×10^5 cfu/g), μπορεί να παρατηρηθεί επιβίωση ορισμένων βακτηριακών κυττάρων στους 60 ή ακόμη και στους 80° C για 15 λεπτά (Vanderzant & Nickelson, 1972).

Σε στρείδια, η θερμική επεξεργασία, όπως η ψύξη, και η χαμηλής θερμοκρασίας παστερίωση, μπορούν να μειώσουν την παρουσία διάφορων ειδών *Vibrio*. Η ήπια θερμική επεξεργασία σε στρείδια έχει το πλεονέκτημα ότι παράλληλα μπορεί να τα

θανατώσει και να αποχωριστούν το κέλυφος, όμως έχει επίπτωση στο οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στην υφή, εξαιτίας της μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Ο Andrews et al (2000) αναφέρουν ότι το βακτήριο από 1.2×10^5 MPN-most probable number/g μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, κάτω από 3 MPN / g, όταν τα στρείδια υποβλήθηκαν σε ήπια παστερίωση (55°C). Σύμφωνα με τους Thomson και Vanderzant (1976), οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε χωρίς κέλυφος στρείδια μειώθηκε από 11000 σε 0.36 MPN / g μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 3°C . Σε άλλη μελέτη των από τους Muntada – Garriga et al (1995), αναφέρεται ότι βιώσιμα κύτταρα *V. parahaemolyticus* (10^{5-7} cfu/g) σε ομογενοποιημένα στρείδια, ήταν πλήρως αδρανοποιημένα, κατόπιν κατάψυξης στους -18°C και στους -24°C για 15 – 28 εβδομάδες (Su & Liu, 2007).

Σε θερμοκρασίες κατάψυξης επιβιώνει ο μικροβιακός πληθυσμός, ωστόσο διαπιστώνεται μείωση κατά 10 – 100 φορές. Παρατηρείται μεγάλη επίδραση του ρυθμού θανάτου σε γαρίδες στους -10° έως -20°C . Ωστόσο, στους -10°C , ο ρυθμός θανάτου είναι μεγαλύτερος απ' ό,τι στους -20°C εξαιτίας του σχηματισμού μεγάλων κρυστάλλων πάγου που δημιουργεί διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και μεγάλη διαφορά ωσμωτικής πίεσης στον ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό χώρο, επιφέροντας επιπτώσεις στο κύτταρο (Boonyawantang et al, 2011).

Ο συντελεστής ενεργότητας ύδατος (a_w) έχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του μικροοργανισμού διότι είναι πολύ ευαίσθητο βακτήριο στην αποξήρανση και δεν είναι ικανό να επιβιώσει σε αποσταγμένο νερό (Jay et al, 2014; Vanderzant & Nickelson, 1972).

Η υψηλή υδροστατική πίεση (High-pressure processing), επίσης είναι μία μη θερμική επεξεργασία, που μπορεί να καταστρέφει παθογόνους μικροοργανισμούς, σε τρόφιμα, παρατείνοντας έτσι το χρόνο ζωής τους, χωρίς να επιφέρει αλλαγές σε θρεπτικά συστατικά, στην οσμή και στην εμφάνιση, μιας και δεν έρχεται σε επαφή με το τρόφιμο (Su & Liu, 2007). Σε μελέτη του Cook (2003), εφαρμόστηκε υψηλή υδροστατική πίεση (HPP) σε στρείδια, 300 MPa για 180 δευτερόλεπτα, η οποία ήταν επαρκής για να μειώσει στελέχη O3:K6 στελέχη *V. parahaemolyticus*, κατά 5 λογαρίθμους. Παρόμοια με την θερμική επεξεργασία, η HPP συμβάλλει στην αποκελύφωση των στρειδιών, καταστρέφοντας τους μυς, αλλά το κύριο μειονέκτημα της συγκεκριμένης εφαρμογής είναι το υψηλό κόστος της έρευνας, το οποίο δεν μπορεί να υποστηριχτεί από παραγωγούς στρειδιών (Su & Liu, 2007).

Άλλη μια επεξεργασία μη θερμική είναι η ακτινοβολήση (irradiation) στην οποία καταστρέφονται παθογόνα βακτήρια. Το *V. parahaemolyticus* είναι πολύ ευαίσθητο βακτήριο στην γ – ακτινοβολία. Σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολήσης, χαμηλότερες των 3 KGreys, δεν σκοτώνει τα στρείδια ούτε επηρεάζει τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Ανάμεσα σε 146 εθελοντές που συμμετείχαν σε οργανοληπτική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν tests, για την διάκριση ακτινοβολημένων και μη στρειδιών. Η απροθυμία των καταναλωτών για την κατανάλωση ακτινοβολημένων τροφίμων σημειώθηκε, παρόλο που η ακτινοβολήση μπορεί να εξαλείψει τον μικροοργανισμό σε στρείδια (Su & Liu, 2007).

2.2.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Οι ασθένειες που προκαλούνται μετά από μόλυνση με *V. parahaemolyticus*, είναι κυρίως οξεία γαστρεντερίτιδα, που προκύπτει μετά από κατανάλωση νωπών ή ατελώς θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων, κυρίως αλιευμάτων (Broberg et al, 2011; Nordstrom et al, 2007). Η μολυσματική δόση κυμαίνεται από 2×10^5 - 3×10^7 CFU (Solomakos et al, 2011). Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται είναι κοιλιακές κράμπες, ναυτία, εμετός, χαμηλός πυρετός, κεφαλαλγία, και διάρροια περιστασιακά αιμορραγική, τα οποία εκδηλώνονται 4 – 96 ώρες μετά από την κατανάλωση των μολυσμένων τροφίμων. Τα δονάκια προσβάλλουν το επιθήλιο, και τα κόπρανα είναι δυνατόν να είναι αιματηρά (Solomakos et al, 2011). Η εκδήλωση της ασθένειας μπορεί να διαρκέσει μέχρι και τρεις ημέρες, και συνήθως άτομα με καλή ανταπόκριση του ανοσοποιητικού δε χρήζουν περίθαλψη νοσοκομειακή (Broberg et al, 2011). Είναι το πιο κοινό σύνδρομο που προκαλείται από το *V. parahaemolyticus*, διαφέρει όμως από άλλα που προκαλούνται από δυσεντερίες *Shigella spp.* ή αμοιβάδωση (Nair et al, 2007).

Λόγω του ότι το νόσημα είναι μέτριας σοβαρότητας, στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση αντιμετωπίζεται με ενυδάτωση από το στόμα. Η εντερίτιδα παρουσιάζει τάση αυτοπεριορισμού σε 1 – 4 ημέρες χωρίς άλλη θεραπεία παρά μόνον με την αποκατάσταση του ισοζυγίου ύδατος και ηλεκτρολυτών. Ωστόσο, κάποιες φορές απαιτείται χορήγηση αντιβιοτικών, όπως δοξοκυκλίνη, σιπροφλοξασίνη, και ερυθρομυκίνη (Velazquez-Roman et al, 2014).

Μόλυνση με *V. parahaemolyticus* μπορεί να προκληθεί επίσης, από τραύματα, τα οποία είναι συνηθισμένα κυρίως σε ψαράδες. Η μόλυνση από μικροτραυματισμούς μπορεί να περιοριστεί σε κυτταρίτιδα, αλλά κάποιες φορές μπορεί να εξελιχθεί νεκρωτική απονευρωσίτιδα, μια λοίμωξη των μαλακών ιστών με ταχεία εξάπλωση των βακτηρίων που παρουσιάζει φλεγμονή και νέκρωση των ιστών (Broberg et al, 2011).

Λιγότερο σύνηθες είναι η πρόκληση σηψαιμίας και συμβαίνει όταν το μικρόβιο εισέρχεται στο αίμα και μεταφέρεται σε όλο το σώμα. Το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται και οδηγεί σε φλεγμονή και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ολιγαιμικό σοκ, ανεπάρκεια ζωτικών οργάνων και θάνατο. Μεγαλύτερη πιθανότητα για την εμφάνιση σηψαιμίας έχουν άτομα κάτω από υποκείμενες κλινικές συνθήκες όπως ανοσοκατασταλμένα, με ασθένεια στο ήπαρ, διαβήτη, καρκίνο, και πρόσφατα χειρουργημένοι στο γαστρεντερικό σύστημα. Επιπλέον, άτομα με κίρρωση του ήπατος και τον ιό της ηπατίτιδας βρίσκονται σε μεγάλο κίνδυνο (Broberg et al, 2011).

2.2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Εξαιτίας των επιδημιών που προέκυψαν κυρίως την δεκαετία του '90, από τον μικροοργανισμό *V. parahaemolyticus* μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, κυρίως στρειδιών, πολλές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του βακτηρίου (Bisha et al, 2011).

Για την απομόνωση και ανίχνευση του μικροοργανισμού οι κλασικές μέθοδοι που ακολουθούνται είναι οι καλλιεργητικές. Αρχικώς, έχουν ληφθεί υπόψη η αλόφιλη φύση του βακτηρίου, η αντοχή του σε αλκαλικό περιβάλλον, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα με την πρόσθεση επιφανειοδραστικών ουσιών όπως νάτριο θειϊκό δωδεκύλιο (SDS, sodium dodecyl sulphate), αλκυλοβενζο σουλφονικό (alkylbenzene sulphonate), χολικά άλατα, χρωστικές όπως metachrome yellow II RD, και αντιβιοτικά όπως η κολιστίνη ή η πολυμυξίνη B, που αυξάνουν την εκλεκτικότητα. Για τον διαχωρισμό μη παθογόνων από παθογόνα στελέχη, αρχικώς το αιματούχο Wagatsuma άγαρ χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της TDH/TRH. Πλέον, η μέθοδος έχει αντικατασταθεί από μοριακές μεθόδους. Αρκετοί εκλεκτικοί εμπλουτιστικοί ζωμοί όπως alkaline peptone water (APW), salt polymyxine broth (SPB), salt colistin broth, glucose salt teepol broth σε συνδυασμό με χολικά άλατα όπως sodium taurocholate (ST broth) χρησιμοποιούνται για την απομόνωση παθογόνων στελεχών (Bisha et al, 2011).

Επί του παρόντος για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των ειδών *Vibrio* χρησιμοποιείται μία ή και περισσότερες καλλιεργητικές μέθοδοι, και ακολουθεί μοριακή μέθοδος για την ανίχνευση των μολυσματικών παραγόντων (Bisha et al, 2011).

Μια από τις πιο κοινές μεθόδους ανίχνευσης του *V. parahaemolyticus* είναι η Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (Most Probable Number-MPN). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει περιγραφεί από τον US FDA (Food and Drug Administration Bacterial Analytical Manual). Η τεχνική που ακολουθείται για την απομόνωση και απαρίθμηση του *V. parahaemolyticus* από νωπά οστρακοειδή, περιγράφεται συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Η τεχνική που ακολουθείται εκτελείται εις τριπλούν με εμπλουτιστικό ζωμό alkaline peptone water (APW). Πραγματοποιούνται δεκαπλάσιες αραιώσεις των δειγμάτων σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, και ενοφθαλμίζονται στον εμπλουτιστικό ζωμό. Επωάζονται για 18 – 24 ώρες στους 35 – 37° C, και κατόπιν σπέρνονται στο στερεό υπόστρωμα TCBS άγαρ. Οι ύποπτες αποικίες ταυτοποιούνται με περεταίρω βιοχημικά test (Bisha et al, 2011). Για τον βιοχημικό προσδιορισμό τρεις ή περισσότερες αποικίες υποβάλλονται σε δοκιμή οξειδάσης, αργινίνης-γλυκόζης (AGS-arginineglucose slant), ορνιθίνη δεκαρβοξυλάση, O/129 Vibriostat sensitivity (Drake et al, 2007). Παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως ότι το στερεό υπόστρωμα TCBS agar δε μπορεί να διαφοροποιήσει το *V. parahaemolyticus* από ορισμένα στελέχη *V. mimicus* και *V. vulnificus* και είναι αρκετά χρονοβόρο (Su & Liu, 2007). Επιπλέον, οι αποικίες είναι δύσκολο να διακριθούν από άλλες βακτηριακές αποικίες λόγω της κίτρινης χρωστικής που εμφανίζεται στο τριβλύο λόγω της σακχαρόζης των βακτηριδίων ζύμωσης. Λόγω των παραπάνω προβλημάτων, αναπτύχθηκαν πολλοί εμπλουτιστικοί ζωμοί και στερεά υποστρώματα όπως το CHROMagar™ VIBRIO. Έχει αναφερθεί ότι εμπλουτιστικές καλλιέργειες που τοποθετήθηκαν στο CHROMagar™ VIBRIO, έδειξαν υψηλότερες συχνότητες απομονώσεων απ' ότι στο TCBS άγαρ από δείγματα αλιευμάτων (Bisha et al, 2011).

Στην Ευρώπη, ιδιαίτερα, χρησιμοποιείται η μέθοδος ISO 21872-1:2007 του Διεθνούς οργανισμού ISO (International Organization for Standardization). Σύμφωνα με τη μέθοδο ISO, χρησιμοποιούνται δύο εμπλουτιστικά υποστρώματα στα οποία τα δείγματα θα επωαστούν στους 35° C για 7 – 8 ώρες ή 18 ώρες για βαθιά κατεψυγμένα προϊόντα. Τα εμπλουτιστικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ζωμός όπως αλατούχος πολυμυξίνη (salt polymyxin B), αλκαλικό αλατούχο διάλυμα πεπτόνης (alkaline saline peptone) ή καλλιέργειας γλυκόζης με νάτριο δωδεκυλ θειικό άλας (saline glucose culture medium with sodium dodecyl sulfate). Τα εμπλουτισμένα δείγματα τοποθετούνται σε στερεά υποστρώματα όπως TCBS (Thiosulfate-bile salts-sucrose agar) ή TSAT (Triphenyltetrazolium chloride soya tryptone agar). Επωάζονται στους 35° – 37° C για 18 ώρες και 20 με 24 ώρες στα στερεά υποστρώματα αντίστοιχα. Οι αποικίες που εμφανίζονται στο TCBS άγαρ είναι λείες, με πράσινο χρώμα και διάμετρο από 2 έως 3 mm, ενώ στο TSAT είναι λείες, επίπεδες με σκούρο κόκκινο χρώμα και με 2 έως 3 mm διάμετρο, επίσης. Οι ύποπτες αποικίες με τη συγκεκριμένη μέθοδο χρειάζεται να επιβεβαιωθούν με περαιτέρω αναλύσεις βιοχημικών tests. Βιοχημικά tests kits διαθέσιμα στο εμπόριο, είναι ικανά για τον ταχύ προσδιορισμό του βακτηρίου. Τέτοια είναι api[®]20E, api[®] NE, RapIDTMNF PLUS System, Crystal Enteric/Non - Fermenter ID Kit. Τα παραπάνω kits χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον προσδιορισμό του *V. parahaemolyticus*. Επιπλέον, αυτοματοποιημένα και ημι – αυτοματοποιημένα συστήματα όπως VITEK 2 microbial ID/AST System και Microstation (Biolog) αντίστοιχα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Παρέχουν αποτελεσματικότητα και αξιοπιστία, με ακριβό όμως το κόστος επένδυσης των συγκεκριμένων συστημάτων (Su & Liu, 2007).

Άλλα εκλεκτικά υποστρώματα για τη διαφοροποίηση του *V. parahaemolyticus* από άλλα είδη *Vibrios* είναι άγαρ τρυπτικής σόγιας με σακχαρόζη, χλωριούχο νάτριο ή και χλωριούχο τριφαινυλοτετραζόλιο στο οποίο το *V. parahaemolyticus* δίνει σκούρες κόκκινες αποικίες, ενώ το *V. alginolyticus* αποικίες με ροζ κέντρο (Bisha et al, 2011).

Το Bio-Chrome Vibrio medium (BCVM), είναι χρωμογόνο υπόστρωμα, το οποίο διαφοροποιεί το *V. parahaemolyticus* από άλλα είδη με το σχηματισμό μωβ αποικιών. Σε μελέτη του Duan και Su (2005), 296 δείγματα από υφάλμυρο νερό, ίζημα, και στρείδια ανιχνεύθηκαν για την παρουσία *V. parahaemolyticus* με τη μέθοδο MPN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ειδικότητες για τα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν BCVM και TCBS, ήταν 94% και 77% αντίστοιχα, καθώς και οι ακρίβειες 84% και 54%. Επιπλέον, το Double Layer Agar Plate (DLAP), είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί σε αναμιγμένες καλλιέργειες που περιέχουν και άλλα βακτήρια (όχι *Vibrio*). Το υπόστρωμα DLAP προετοιμάζεται με αρχικό στρώμα μη εκλεκτικό όπως άγαρ τρυπτικής σόγιας και επιπλέον εκλεκτικό BCVM. Παρατηρείται ο σχηματισμός μωβ αποικιών, από βακτήρια που δεν ανήκουν στο γένος *Vibrio*. Επιπλέον, απευθείας σπορά στο DLAP, έδειξε αποτελεσματική ανάκτηση τραυματισμένων βακτηριακών κυττάρων μετά από θέρμανση ή ψύξη, κάτι που δεν παρατηρείται σε BCVM και TCBS άγαρ (Su & Liu, 2007).

Με την μοριακή μέθοδο PCR (Polymerase Chain Reaction), ξεπεράστηκαν τα παραπάνω μειονεκτήματα της MPN μεθόδου (Su & Liu, 2007). Η PCR είναι η πλέον

πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και τον ακριβή προσδιορισμό (ταυτοποίηση), των συγκεκριμένων γονιδίων που υπάρχουν στο δείγμα. Επιτρέπει τον γρήγορο και επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA που βρίσκονται στο δείγμα σε απειροελάχιστη ποσότητα. Έχει υψηλή ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια, ενώ το επίπεδο ειδικότητας εξαρτάται από την επιλογή του DNA στόχου που θα προσδεθεί με το ζεύγος εκκινητών. Ο πολλαπλασιασμός αλληλουχίας DNA περιοχών επιτυγχάνεται με το ένζυμο πολυμεράση και την επιλογή κατάλληλων εκκινητών (πρόσδεση με το DNA στόχο).

Για την ανίχνευση παθογόνων στελεχών *V. parahaemolyticus* η PCR στοχεύει στα *tdh* και *trh* γονίδια που κωδικοποιούν της TDH και TRH αιμολυσίνες αντίστοιχα. Η διαδικασία ανάλυσης όμως δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για στελέχη του βακτηρίου που δεν φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια. Με την multiplex PCR μέθοδο επιτρέπεται η ταχεία ανίχνευση μεγάλου γονιδίου με πολλαπλούς εκκινητές – primers. Χρησιμοποιήθηκε από τον Taniguchi et al (1985) για την ανίχνευση όλων των στελεχών (παθογόνων και μη) του μικροοργανισμού σε οστρακοειδή στοχεύοντας σε *tdh*, *trh*, *tlh* γονίδια όπου τα τελευταία κωδικοποιούν την TLH θερμοευαίσθητη αιμολυσίνη. Παρόλο που η συγκεκριμένη αιμολυσίνη δεν αποτελεί μολυσματικό παράγοντα του μικροοργανισμού, ωστόσο είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για την ανίχνευση ειδών *Vibrio*. Επιπλέον, κι άλλες αναλύσεις δειγμάτων από περιβαλλοντικές, κλινικές πηγές και τρόφιμα με την PCR μέθοδο έδειξαν ότι όλα τα στελέχη διαθέτουν το 285-bp τεμάχιο εντός του γονιδίου *gyrB* που κωδικοποιεί την B υπομονάδα της DNA γυράσης. Ειδικοί εκκινητές έχουν αναπτυχθεί για την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του 285-bp, επιτυγχάνοντας την ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* (Su & Liu, 2007).

Η μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) έχει εφαρμοστεί σε συνδυασμό με την MPN για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροοργανισμού. Κατόπιν, αναπτύχθηκε η διαδικασία ανάλυσης της έντασης φθορισμού του δείγματος σε πηκτή αгарόζης, όπου υπάρχει μία γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έντασης φθορισμού και του βακτηριακού πληθυσμού σε λογάριθμο. Οι Wang και Levin (2004) σύγκριναν την ένταση φθορισμού του DNA στόχου (*tlh* γονίδια), σε σχέση με τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων *V. parahaemolyticus*, όπου παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση. Τα τελευταία χρόνια εμφανίστηκε η Real Time PCR, RT – PCR (τεχνική PCR πραγματικού χρόνου), η οποία πλέον αποτελεί την κατ' εξοχήν τεχνική ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης DNA. Η ανάπτυξη της έχει βρει εφαρμογή στον ταχύ ποσοτικό προσδιορισμό του *V. parahaemolyticus* σε τρόφιμα. Η ένταση του φθορισμού εκτιμάται κατά την διάρκεια της PCR αντίδρασης με μόρια (ανιχνευτές) που αλληλεπιδρούν με DNA. Ο φθορισμός είναι ανάλογος με την ποσότητα του δείγματος και αυξάνεται ανάλογα μ' αυτή σε κάθε κύκλο. Σε μελέτη του Takahashi et al (2005), εφαρμόστηκε real time PCR μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροοργανισμού σε υφάλμυρο νερό και οστρακοειδή στοχεύοντας σε γονίδια της *toxR*. Το όριο ανίχνευσης αναφέρεται στα 36 κύτταρα/ml σε καθαρή καλλιέργεια ή και σε υφάλμυρο νερό (Su & Liu, 2007).

Για την ειδική ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος υβριδοποίησης DNA (DNA hybridization) με την επιλογή κατάλληλων олиγοδεσοξυριβονουκλεοτιδίων – ανιχνευτών με στόχο *tdh* γονίδια. Δυο μη ραδιοενεργοί ανιχνευτές (αλκαλική φωσφατάση-AP και διγοξιγενίνη-DIG), έχουν

χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση *tlh* γονιδίων. Επιπλέον, κι άλλες διαδικασίες όπως η HGMF-hydrophobic grid membrane ανιχνεύουν τον μικροοργανισμό, με υβριδοποίηση μεταξύ του DNA του *V. parahaemolyticus* (το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στο υδροφοβικό μέρος της μεμβράνης), και του ανιχνευτή διγοξιγενίνης, στοχεύοντας σε *tlh* γονίδια (Su & Liu, 2007).

Αναλύσεις που στοχεύουν στην ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* ή των τοξινών του, βάση των αντιδράσεων με αντισώματα, αναπτύσσουν οι ανοσολογικές μέθοδοι. Σ' αυτήν την κατηγορία εφαρμόζεται η μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), στοχεύοντας σε αντιγόνα του δείγματος με την πρόσδεσή τους σε ειδικά αντισώματα. Ο Honda et al (1985) εφήρμοσε την συγκεκριμένη μέθοδο για την ανίχνευση της TDH. Η δοκιμή «σάντουιτς» ELISA έχοντας ως στόχο τη μέτρηση δισθενών και πολυσθενών αντιγόνων, έδειξε αποτελεσματική ανίχνευση της TDH σε ακατέργαστα μίγματα, και επιπλέον έδωσε θετικά αποτελέσματα δειγμάτων στα οποία είχε εφαρμοστεί η απομόνωση του *V. parahaemolyticus* με την παραδοσιακή μέθοδο στο Wagatsuma άγαρ. Ο Chang et al, (1994) για την ανίχνευση του βακτηρίου εφήρμοσε μια ανοσολογική δοκιμή αναπτύσσοντας ένα γαλακτώδη χυμό συγκόλλησης. Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του *V. parahaemolyticus* απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε κουνέλια. Παρατηρήθηκε συγγένεια - αντίδραση μεταξύ σωματιδίων του γαλακτώδη χυμού και των πολυκλωνικών αντισωμάτων. Όταν αξιολογήθηκε η δοκιμή σε 173 στελέχη του *V. parahaemolyticus*, μεταξύ αυτών και άλλα είδη *Vibrio* οι τιμές των ψευδώς-αρνητικών και ψευδώς-θετικών ήταν 1.4% και 3.1% αντίστοιχα (Bisha et al, 2011).

Το *V. parahaemolyticus* μπορεί να ανιχνευθεί και ορολογικά από το Η αντιγόνο μαστιγίου που βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του μικροοργανισμού. Ο Datta et al (2008) παρήγαγε μονοκλωνικά αντισώματα, με στόχο την αντίδραση και πρόσδεσή τους σε Η αντιγόνα μαστιγίου. Παρατηρήθηκε 100% προσκόλληση από δείγματα 41 απομονώσεων τα οποία γενετικά χαρακτηρίστηκαν ως *V. parahaemolyticus*. Τα αντισώματα, επιπλέον, εμφάνισαν διασταυρούμενες αντιδράσεις και με άλλα είδη *Vibrio* όπως *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii* καταλήγοντας στο συμπέρασμα έχουν κοινά αντιγόνα μαστιγίου (Bisha et al, 2011).

2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το *V. parahaemolyticus* έχει αναγνωριστεί ως αιτία τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως και ιδιαίτερα σε χώρες της Άπω Ανατολής, όπου η κατανάλωση αλιευμάτων είναι υψηλή (Nair et al, 2007). Ο αλόφιλος μικροοργανισμός πρωτοεμφανίστηκε στην Οσάκα της Ιαπωνίας το 1950, όπου νόσησαν 272 άτομα εκ των οποίων 20 απεβίωσαν, μετά από κατανάλωση ημι – αποξηραμένης σαρδέλας shirasu. Αρχικά, ονομάστηκε *Pasteurella parahaemolytica* και κατόπιν *Vibrio parahaemolyticus* λόγω της αλοφιλικότητάς του (Martinez-Urtaza et al, 2010).

Μέχρι και το 1970 στην Ιαπωνία τα κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων με *V. parahaemolyticus* μετά από κατανάλωση αλιευμάτων αντιπροσώπευε το 70% των περιπτώσεων κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (Solomakos et al, 2012).

Τον Αύγουστο του 1971 τρεις εξάρσεις κρουσμάτων στο Μέρυλαντ των Ηνωμένων Πολιτειών, σχετίζονταν με τροφιμογενή γαστρεντερίτιδα. Ως αιτιολογικός παράγοντας χαρακτηρίστηκε το *V. parahaemolyticus*. Τα τρία περιστατικά κρουσμάτων αποτελούν τις πρώτες επιβεβαιωμένες επιδημίες λόγω *V. parahaemolyticus* στις Η.Π.Α. Επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι τα δύο πρώτα περιστατικά αφορούσαν καβούρια μαγειρεμένα στον ατμό ενώ στο τρίτο ως ύποπτο “όχημα” θεωρήθηκε σαλάτα με καβούρια που σερβιρίστηκε σε ιατρικό ίδρυμα. Ο Dadisman et al (manuscript in preparation) αναφέρει λόγω ακατάλληλων τεχνικών χειρισμού των τροφίμων είναι η σημαντικότερη αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων, καθώς στην πρώτη και τη δεύτερη περίπτωση κρουσμάτων τα καβούρια απεστάλησαν και αποθηκεύτηκαν με ζωντανά καβούρια. Στο τρίτο κρούσμα τα καβούρια συλλέχτηκαν και συσκευάστηκαν σε μεταλλικά δοχεία χωρίς περαιτέρω θερμική επεξεργασία. Κλινικές απομονώσεις έδειξαν ορότυπους όπως O4:K11, O3:K30, O3:K33 και ένας μη τυποποιημένος ορότυπος. Ο πρώτος ορότυπος ήταν θετικός στο KP⁺ φαινόμενο και στην εμφάνιση εντεροπαθογονικότητας. Οι υπόλοιποι ορότυποι βρέθηκαν αρνητικοί KP⁻. Απομονώσεις σε τρόφιμα έδειξαν ορότυπους O3:K30, O2:K28, οι οποίοι ήταν στο KP φαινόμενο αρνητικοί (Molenda et al, 1972). Από το 1972 και μετά σποραδικά κρούσματα αναφέρθηκαν στο το Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention-CDC), που σχετίζονταν με την κατανάλωση νωπών οστρακοειδών ή μαγειρεμένων θαλασσινών. Μεταξύ του 1973 και 1998 αναφέρθηκαν συνολικά 40 περιστατικά κρουσμάτων από μόλυνση *V. parahaemolyticus* οφειλόμενα σε κατανάλωση νωπών αλιευμάτων ή αλιευμάτων θερμικά επεξεργασμένων με διαστυρομένη επιμόλυνση (Su & Liu, 2007). Στην Λουιζιάνα και το Τέξας το '93 περιστατικά κρουσμάτων με *V. parahaemolyticus*, εκ των οποίων το 50% των περιστατικών αναφέρει κατανάλωση καραβίδας (Velazquez-Roman et al, 2014). Τα τέσσερα μεγαλύτερα κρούσματα σημειώθηκαν στο Gulf Coast, Pacific Northwest, και Atlantic Northeast μεταξύ του 1997 – 98 και περιλάμβαναν παραπάνω από 700 περιπτώσεις νοσημάτων. Συγκεκριμένα, στο Όρεγκον, Ουάσινγκτον, Καλιφόρνια, και Βρετανική Κολομβία του Καναδά, το καλοκαίρι του 1997, σημειώθηκαν 209 κρούσματα και ένας θάνατος από μόλυνση με *V. parahaemolyticus* μετά από κατανάλωση νωπών στρειδιών (Su & Liu, 2007). Ο ορότυπος που κυριαρχούσε στις περισσότερες κλινικές απομονώσεις από ασθενείς ήταν ο O4:K12 και ο O1:K56 (Velazquez-Roman et al, 2014). Το 1998 δυο εξάρσεις κρουσμάτων στην Ουάσινγκτον και το Τέξας με 459 περιπτώσεις κρουσμάτων συνολικά μετά από κατανάλωση νωπών στρειδιών. Τέλος, λίγα κρούσματα των 8 περιπτώσεων, στο Κονέκτικατ, το Νιου Τζέρσεϊ, και τη Νέα Υόρκη μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου του '98 μετά από κατανάλωση στρειδιών και αχιβάδων που συγκομίσθηκαν από το Λόνγκ Άιλαντ της Νέας Υόρκης (Su & Liu, 2007).

Στην Ευρώπη, καθ' όλη τη διάρκεια του '70 αναφέρονται σποραδικά κρούσματα σε χώρες, όπως η Ισπανία και η Γαλλία (Solomakos et al, 2012). Στην Ισπανία, το 1989, οκτώ περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας αναφέρονται σχετικές με κατανάλωση ψαριών και οστρακοειδών. Κρούσματα μετά από κατανάλωση στρειδιών με 64 περιστατικά νοσημάτων στην Γαλικία της Ισπανίας το 1999. Μετά την εφαρμογή μοριακών μεθόδων βρέθηκε ότι οι λοιμώξεις οφείλονται στον ορότυπο O4:K11. Μεταξύ του 1997 έως 2000 στη συγκεκριμένη νοτιοδυτική πόλη της Ισπανίας με τη μεγαλύτερη παραγωγή οστρακοειδών, κατεγράφησαν 84 περιπτώσεις λοιμώξεων από *V.*

parahaemolyticus (Baker-Austin et al, 2010). Στην Γαλλία το 1997 συνέβη σοβαρή έξαρση κρουσμάτων μετά από κατανάλωση γαρίδας που εισήχθη από την Ασία (Su & Liu, 2007). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, από τα πρώτα κρούσματα που σημειώθηκαν σχετικά με λοιμώξεις *Vibrio* (*V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*), αφορούσε την κατανάλωση καβουριών το 1973. Πιο πρόσφατα τον Ιούλιο του 2004, στην Ισπανία 80 περιπτώσεις λοιμώξεων με *V. parahaemolyticus*, στο οποίο εμπλέκονταν εστιατόριο μετά από εκδηλώσεις γάμων. Σε έρευνες που διεξήχθησαν μέχρι σήμερα, διαπιστώθηκε η χαμηλή παρουσία περιβαλλοντικών στελεχών με παθογόνα χαρακτηριστικά σε Ευρωπαϊκές χώρες. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε Γαλλία, Νορβηγία και στην Γαλικία διαπιστώθηκε μια γεωγραφική κατανομή στελεχών *V. parahaemolyticus* (*tdh+*, *trh+*), κατά μήκος της ακτής της Ευρώπης.

Το Φεβρουάριο του 1996, στην Καλκούτα της Ινδίας, πρωτοεμφανίστηκαν στελέχη του ορότυπου O3:K6 (Levin, 2007). Ο ορότυπος εμφανίστηκε με συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες όπως *tdh*⁺, *trh*⁺, urease negative, *toxRS/New*, *orf8*. Ο συγκεκριμένος ορότυπος θεωρήθηκε υπεύθυνος για το 50 – 80% των μολύνσεων στην Καλκούτα τους επόμενους μήνες. Ο O3:K6, με παρόμοια χαρακτηριστικά γρήγορα εξαπλώθηκε στην Νοτιοανατολική Ασία και στις Η.Π.Α, ακόμη και στην Ευρώπη, Αφρική, και κεντρική και Νότια Αμερική (Velazquez-Roman et al, 2014). Ωστόσο, αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι ο O3:K6 ορότυπος απομονώθηκε το 1995 από έναν ταξιδιώτη που επέστρεφε από την Ινδονησία στην Ιαπωνία. Συγκρίνοντας στελέχη του O3:K6 από απομονώσεις στην Calcutta, με στελέχη του ορότυπου O3:K6 που απομονώθηκαν από το 1982 – 1993, βρέθηκε ότι ο ορότυπος O3:K6 ήταν ταυτόσημος με τον ορότυπο O3:K6 σε απομονώσεις που αποκτήθηκαν από τους ταξιδιώτες το 1995, αλλά διέφεραν με απομονώσεις από στελέχη μέχρι και το 1993. Το συμπέρασμα αυτής της σύγκρισης αποκάλυψε ότι ο ορότυπος O3:K6 ήδη επικρατούσε σε χώρες όπως Ινδονησία, Ταϊλάνδη, Σιγκαπούρη, απ' όπου επέστρεψαν οι ταξιδιώτες. Βάση αυτών των γεγονότων ο ορότυπος O3:K6 και οι παραλλαγές του διαπιστώθηκε ότι προκαλούν πανδημία (Nair et al, 2007). Αν και ο Nair et al (2007), αναφέρει ότι πανδημικός χαρακτηρίζεται ένας ορότυπος ο οποίος εμφανίζεται σε ευρεία γεωγραφική περιοχή πλήττοντας υψηλό ποσοστό του πληθυσμού, ο O3:K6 δεν έχει και τα δύο χαρακτηριστικά. Ενώ έχει απομονωθεί από ένα μεγάλο γεωγραφικό εύρος, η θνησιμότητά του είναι πολύ μικρή και το νόσημα που προκαλεί αρκετά σπάνιο και δεν ομοιάζει με τα πανδημικά στελέχη El Tor biotypes *V. cholerae* και *V. cholerae* O139 (Nair et al, 2007).

Μετά το γεγονός στην Καλκούτα της Ιαπωνίας, μεταξύ 1997 – 98 ο αριθμός μολύνσεων από το παθογόνο ξεπέρασε των αριθμό μολύνσεων από *Salmonella* που ήταν μέχρι τότε η κύρια αιτία τροφιμογενούς λοίμωξης. Στην Ταϊβάν την περίοδο 1995 – 97, σημειώθηκε αύξηση των λοιμώξεων από τον O3:K6 ορότυπο, αποτελώντας σχεδόν στο 85% των λοιμώξεων κατά το τελευταίο αναφερόμενο έτος. Στο Μπαγκλαντές, επίσης αναφέρθηκαν κρούσματα γαστρεντερίτιδας μέσα στην ίδια χρονική περίοδο. Κατά τη διάρκεια του 1997 – 98, κλινικά δείγματα του ορότυπου O3:K6 από Ταϊβάν, Λάος, Ιαπωνία, Ταϊλάνδη, Κορέα, και Η.Π.Α έδειξαν ταυτόσημα PCR προφίλ. Ο ορότυπος O3:K6 επίσης, ήταν υπεύθυνος και για κρούσματα οξείας εντερικής λοίμωξης στο Βλαδιβοστόκ της Ρωσίας το '97 (Nair et al, 2007).

Στο Περού της Νότιας Αμερικής, μετά την πανδημία χολέρας του '91, εμφανίστηκε το 1997 ο πανδημικός κλώνος του *V. parahaemolyticus*. Ωστόσο, από το 1994 μέχρι

και το 1996 μη πανδημικοί ορότυποι όπως O4:K8, O4:K55, O5:KUT κυριαρχούσαν στο Τρουτζίλο του Περού κατά τη διάρκεια καλοκαιρινών μηνών με περιστασιακά κρούσματα. Τα κρούσματα σημειώθηκαν αρχικώς σε βόρειες περιοχές της χώρας τον Ιούλιο και εξαπλώθηκαν μέχρι και τα νότια σύνορα της χώρας τον Νοέμβριο του '97, λίγο πριν την έξαρση κρουσμάτων στη Βόρειας Χιλή (Martinez-Urtaza et al, 2010). Τον Ιούλιο του '97 ο πανδημικός κλώνος εμφανίστηκε και στο Τσικλάγιο και πιο βόρεια του Περού. Μεταξύ του 1998 και 2002 και το πανδημικό στέλεχος (O3:K6) και αλλά έχουν αναφερθεί στην πρωτεύουσα του Περού (Λίμα) και βορειοδυτικά της ακτής στο Τρουτζίλο (Velazquez-Roman et al, 2014).

Στη Βραζιλία έχουμε αναφορές σχετικές με κρούσματα γαστρεντερίτιδας το '91 (21 περιπτώσεις) κατόπιν καταναλώσεως διάφορων τύπων αλιευμάτων στην πόλη Recife. Οι ορότυποι που ανιχνεύθηκαν ανήκαν στους O1:K56, O3:K5, O3:K58, O3:KUT, O4:K4, O4:K10, O4:K12, O4:K53, O4:KUT, O5:KUT, O10:KUT. Το 2001 – 02 δυο εξάρσεις κρουσμάτων με τον πανδημικό κλώνο O3:K6 ήταν η αιτία για κρούσματα γαστρεντερίτιδας. Επιπλέον, το 2010 στο Σάο Πάολο, σε περιοχές της Νότιας ακτής, μετά από μελέτες, βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του *V. parahaemolyticus* (>10.000 cfu/g) σε στρείδια, αλλά στελέχη μη παθογόνα (Velazquez-Roman et al, 2014).

Στο Μεξικό το πρώτο κρούσμα γαστρεντερίτιδας οφειλόμενο στο πανδημικό στέλεχος εμφανίστηκε μεταξύ του Σεπτεμβρίου και Οκτωβρίου του 2004. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν την κατανάλωση νωπών γαρίδων ή ατελώς θερμικά επεξεργασμένων. Τα επόμενα χρόνια από το 2004 έως και το 2010, δεδομένα από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα αναλύθηκαν. Πανδημικά και παθογόνα στελέχη ανιχνεύθηκαν στην περιοχή Sinaloa με τον πιο κυρίαρχο ορότυπο O3:K6 (Velazquez-Roman et al, 2014).

Άλλες αναφορές για το *V. parahaemolyticus* στην Αμερική χωρίς να σχετίζεται όμως ο πανδημικός κλώνος έχουν γίνει σε Καναδά, Βενεζουέλα, Κόστα Ρίκα, Παναμά, Πουέρτο Ρίκο, και Αργεντινή (Velazquez-Roman et al, 2014).

Άλλες εξάρσεις κρουσμάτων τους καλοκαιρινούς μήνες του 2004 και του 2005 παρατηρήθηκαν στο Puerto Mont της Χιλής, περιοχή γνωστή για τα κρύα νερά της (Nair et al, 2007). Στην περιοχή Los Lagos της Χιλής, εξάρσεις κρουσμάτων άρχισαν το 2004 και συνεχίστηκαν μέχρι και το 2005 αγγίζοντας τις 3.725 κλινικές περιπτώσεις, ενώ σε ολόκληρη τη χώρα ανήλθαν μέχρι και 10.984. Μετά και το 2005 οι αναφερόμενες περιπτώσεις μειώθηκαν, φτάνοντας μόνον τις 477 μέχρι και το 2007. Τη συγκεκριμένη χρονιά το 40% των πανδημικών στελεχών είχαν τον ορότυπο O3:K59. Το 2008 τα αναφερόμενα κλινικά περιστατικά αυξήθηκαν από 477 σε 1.143, και το 98% αυτών αφορούσε τον πανδημικό κλώνο O3:K6 (Garcia et al, 2009). Όλα τα κλινικά δείγματα σχετίζονταν με το πανδημικό στέλεχος. Από τον Φεβρουάριο μέχρι και τον Μάιο του 2004 παρουσιάστηκαν 42 περιπτώσεις λοιμώξεων και στην Αφρική, με την παρουσία του πανδημικού στελέχους στη Μπέιρα Μοζαμβίκης (Bisha et al, 2011). Επιπλέον, σε κρουαζιερόπλοιο στην Αλάσκα το καλοκαίρι του 2004, 14 επιβάτες εμφάνισαν γαστρεντερίτιδα μετά από κατανάλωση νωπών στρειδιών. Το καλοκαίρι του 2006 κρούσματα προκλήθηκαν σχετικά με στρείδια στην Ουάσιγκτον και στην Βρετανική Κολομβία με εμπλεκόμενες 177 περιπτώσεις (Su & Liu, 2007). Η εμφάνιση του παθογόνου σε Χιλή και Αλάσκα αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη

αλλαγή στην επιδημιολογία του *V. parahaemolyticus*, λόγω σπανίων ή και καθόλου λοιμώξεων στις εν λόγω περιοχές (Martinez-Urtaza et al, 2010).

2.4 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Η εμφάνιση του μικροοργανισμού σχετίζεται με τη θερμοκρασία μιας και στις περισσότερες περιπτώσεις σποραδικά κρούσματα, αλλά και πανδημίες συμβαίνουν πάντα κατά τους πιο θερμούς μήνες του χρόνου και σε τροπικές και σε εύκρατες περιοχές (Solomakos et al, 2012). Ο μικροβιακός πληθυσμός του *V. parahaemolyticus* αυξάνεται σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Ακόμη, και μία μικρή αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του βακτηρίου και να διαδοθεί χωρίς τον περιορισμό του κύκλου ζωής κατά τους χειμερινούς μήνες. Ο Harvell et al, (2002) αναφέρει ότι 1.5° C μέση αύξηση της θερμοκρασίας του νερού μπορεί να επιφέρει μεγαλύτερο κίνδυνο, επεκτείνοντας την εποχιακή περίοδο και το γεωγραφικό εύρος του μικροοργανισμού. Επιπλέον, θέρμανση του υδάτινου περιβάλλοντος είναι πιθανό να έχει σημαντική επίπτωση στην πανίδα, η οποία καταναλώνεται ως αλιεύμα και αποτελεί όχημα για *Vibrio* λοιμώξεις (Martinez-Urtaza et al, 2010).

Επιπροσθέτως, η κατανάλωση οστρακοειδών αυξάνεται τις τελευταίες δεκαετίες παγκοσμίως, με συνέπεια όλο και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού να εκτίθεται σε παθογόνα στελέχη του βακτηρίου (Solomakos et al, 2012).

Επιπλέον, οι κλιματικές αλλαγές στον πλανήτη μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα του μικροοργανισμού. Η θερμοκρασία και η αλατότητα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση του μικροοργανισμού (Solomakos et al, 2012). Κλιματικές ανωμαλίες έχουν επιφέρει τις μεγαλύτερες εξάρσεις κρουσμάτων όπως το φαινόμενο El Nino, στο Περού το 1997. Αναδρομικές μελέτες διεξήχθησαν βάση ωκεανογραφικών δεδομένων, διαπιστώνοντας σοβαρές κλιματικές επιπτώσεις σε ολόκληρη την υδρόγειο. Η μετακίνηση θερμών μαζών και χαμηλότερης αλατότητας νερών από τον δυτικό Ειρηνικό προς τις ακτές της Νότιας Αμερικής, διαπιστώθηκε ότι διαταράσσει τις οικολογικές συνθήκες και τα βιολογικά συστήματα στις παράκτιες περιοχές. Σύμφωνα με ωκεανογραφικά δεδομένα από εικόνες δορυφόρου βρέθηκε ότι το μετεωρολογικό φαινόμενο El Nino, αποτελεί ένα μηχανισμό για την διάδοση των Ασιατικών *Vibrio* στελεχών στην Νότια Αμερική. Η άφιξη του ζωοπλαγκτόν, καθώς επίσης και των κοπήποδων που σχετίζονται με το El Nino αποτελούν την προέλευση των *Vibrio* επιδημιών στο Περού το 1997 (Martinez-Urtaza et al, 2010).

Επίδραση κι άλλων παραγόντων όπως εμπορικά πλοία, υδρόβια άγρια ζώα και πτηνά, ζωοπλαγκτόν συμβάλλουν στη διάδοση και παγκόσμια εξάπλωση του βακτηρίου. Η διάδοση του *V. parahaemolyticus* από ενδημικές περιοχές στο Τέξας και στην Ισπανία αποδίδεται στην απόρριψη του υδάτινου έρματος από πλοία - φορτηγά, λόγω του ότι πανδημικά στελέχη του μικροοργανισμού δεν είχαν ανιχνευθεί στις περιοχές πριν από τα συγκεκριμένα γεγονότα (Solomakos et al, 2012). Αντίθετα όλες οι λοιμώξεις προέκυπταν σε περιοχές κοντά σε διεθνή λιμάνια. Η παραπάνω αιτία έχει αναγνωριστεί ως το σημαντικότερο όχημα για την διάδοση των μικροοργανισμών, λόγω των θρεπτικών στοιχείων που εμπεριέχονται στο υδάτινο έρμα. Με την

απόρριψη του υδάτινου έρματος σχετίζεται και η άφιξη του *V. cholerae* O1 στις Η.Π.Α από λιμάνια της Λατινικής Αμερικής το 1991 (Martinez-Urtaza et al, 2010).

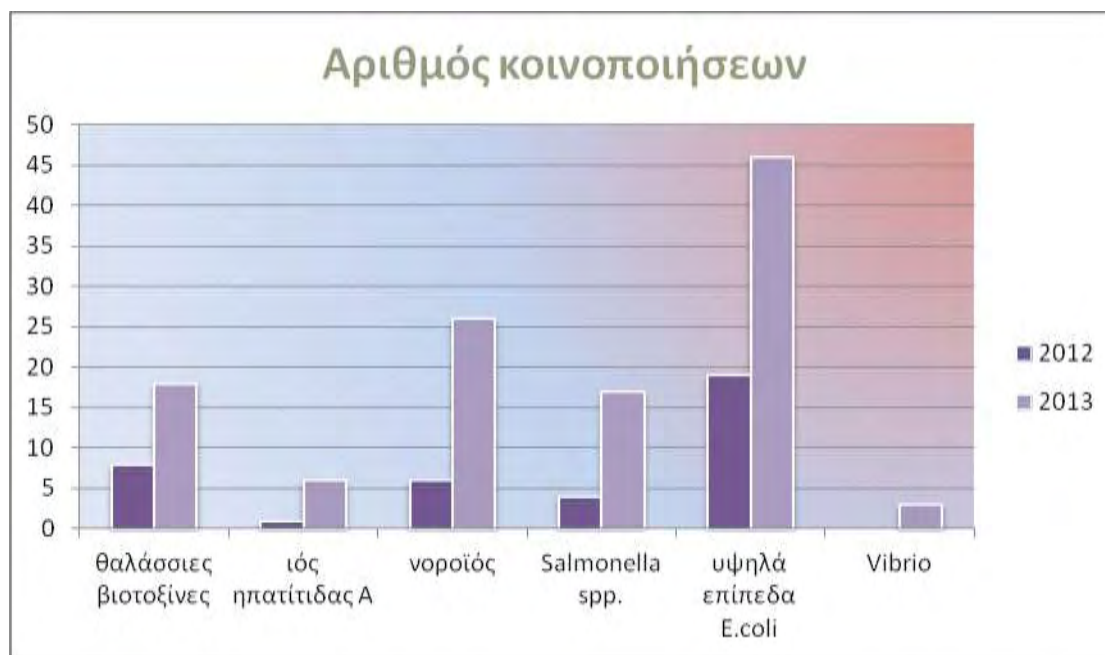
2.5 TO *V. PARAHAEMOLYTICUS* ΣΗΜΕΡΑ

Το *V. parahaemolyticus* δεν εντάσσεται στα μικροβιολογικά κριτήρια που αφορούν τα τρόφιμα μέσα στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Solomakos et al, 2012). Ωστόσο, σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration), κατευθυντήριες οδηγίες και συστάσεις περιορίζουν τον μικροοργανισμό σε 10.000 κύτταρα/g ή και λιγότερο στα αλιεύματα. Δειγματοληψίες που διεξήχθησαν σε εξάρσεις κρουσμάτων το '98, αναφέρουν ότι στις περισσότερες απομονώσεις το *V. parahaemolyticus* βρέθηκε σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Στα περισσότερα στρείδια, τα βακτηριακά κύτταρα ήταν λιγότερο και από 1000 κύτταρα/g, ακόμη και σε ορισμένες περιπτώσεις 100 κύτταρα/g. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι οι οδηγίες του FDA δεν είναι επαρκείς και αποτελεσματικές για την ασφάλεια και προστασία του καταναλωτή σε αλιεύματα, μιας και η μολυσματική δόση των παθογόνων στελεχών δε μπορεί να προσδιοριστεί επακριβώς (Su & Liu, 2007). Σύμφωνα με τον Di Pinto et al, (2012) οι συμβατικές καλλιεργητικές μέθοδοι έχουν καταστεί ανεπαρκής για δείγματα ρουτίνας (screening), και θα έπρεπε να καθιερωθεί ένα συγκεκριμένο σχέδιο υγιεινής μικροβιολογικών κριτηρίων, όπως ορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει. Επιπλέον, δεδομένα από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention-U.S) παρουσίασαν αύξηση νοσημάτων από *Vibrio spp.* μεταξύ του 2001 – 08, και αυτό υποδηλώνει την ανάγκη για βελτίωση των πρακτικών διαχείρισης για το συγκεκριμένο τροφιμογενές βακτήριο. Το Εθνικό Πρόγραμμα Υγιεινής Οστρακόδερμων (NSSP-U.S National Shellfish Sanitation Program), κρατικό πρόγραμμα το οποίο αναγνωρίζεται από την FDA Αμερικανική υπηρεσία, σύστησε τη χρήση συνδυασμών χρόνου – θερμοκρασίας για τον έλεγχο της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια αλίευσης οστρακόδερμων και επιπροσθέτως παρείχε κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο θερμοκρασίας στις περαιτέρω διαδικασίες μεταφοράς και επεξεργασίας (Fernandez-Piquer et al, 2011).

Συνήθως, ο πληθυσμός του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια είναι χαμηλότερη από 10^3 cfu/g κατά τη συγκομιδή, όμως μπορεί να υπερβεί τον αριθμό αυτό σε υψηλότερες θερμοκρασίες νερού (Su & Liu, 2007).

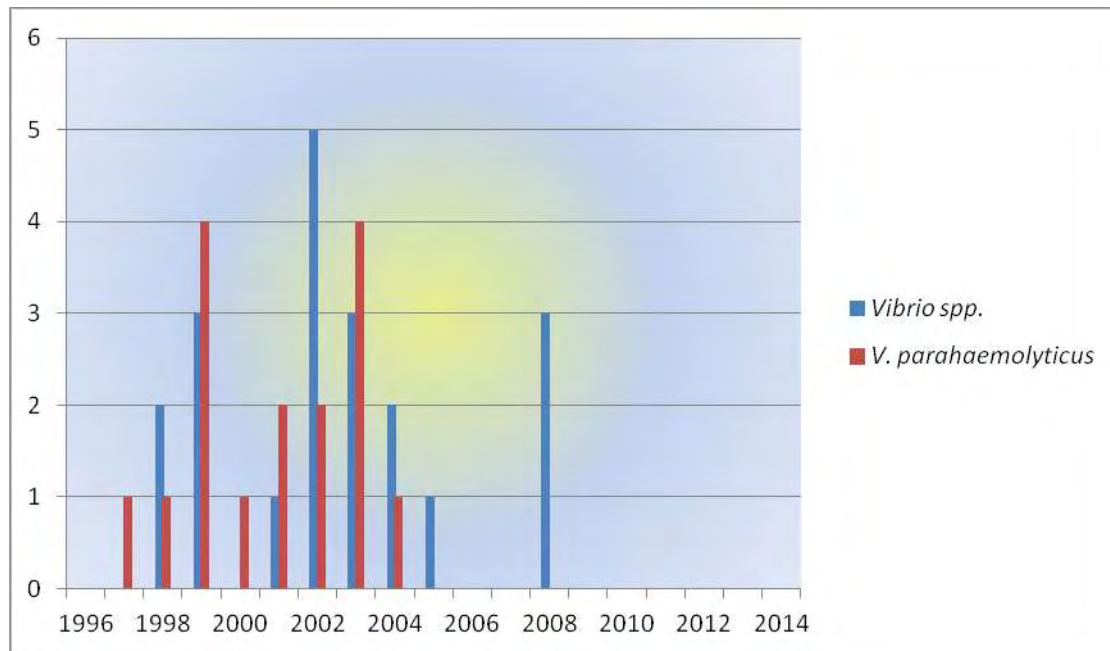
Η ανάπτυξη του παθογόνου σε αλιεύματα αλλά και στο θαλάσσιο νερό στην Ευρώπη, τονίζει την ανάγκη για ένταξη του *V. parahaemolyticus* στα μικροβιολογικά κριτήρια τροφίμων της κοινοτικής νομοθεσίας και σε προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου, ιδιαίτερα για τα δίθυρα μαλάκια (Solomakos et al, 2012). Στο παρακάτω διάγραμμα 2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι κοινοποιήσεις για τα δίθυρα μαλάκια που αναφέρθηκαν στην Ετήσια Αναφορά 2013 (Annual Report-2013) στο Σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Food and Feed Safety Alerts European Commission-RASFF) για τα έτη 2012 – 2013. Μία αύξηση του αριθμού κοινοποιήσεων το 2013, οφείλεται σε ποικίλους κινδύνους όπως *E. Coli*, νοροϊούς, *Salmonella*, και θαλάσσιες βιοτοξίνες. Το *E. Coli* έχει αναφερθεί κυρίως σε καβούρια από χώρες όπως Ελλάδα, Τουρκία, Κροατία, που ξεπερνούν το κριτήριο της σχετικής νομοθεσίας (320 CFU / 100 g). Αύξηση κοινοποιήσεων, επίσης,

παρατηρείται σε μύδια κυρίως από Ισπανία και Ιρλανδία, λόγω θαλάσσιων βιοτοξινών. Οι νοροϊοί κυριαρχούν σε νωπά στρείδια από την Γαλλία, ωστόσο ανακοινώσεις γίνονται κυρίως Ιταλία, Δανία. Η αύξηση κοινοποιήσεων λόγω σαλμονέλας οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά σε κατεψυγμένα καβούρια.



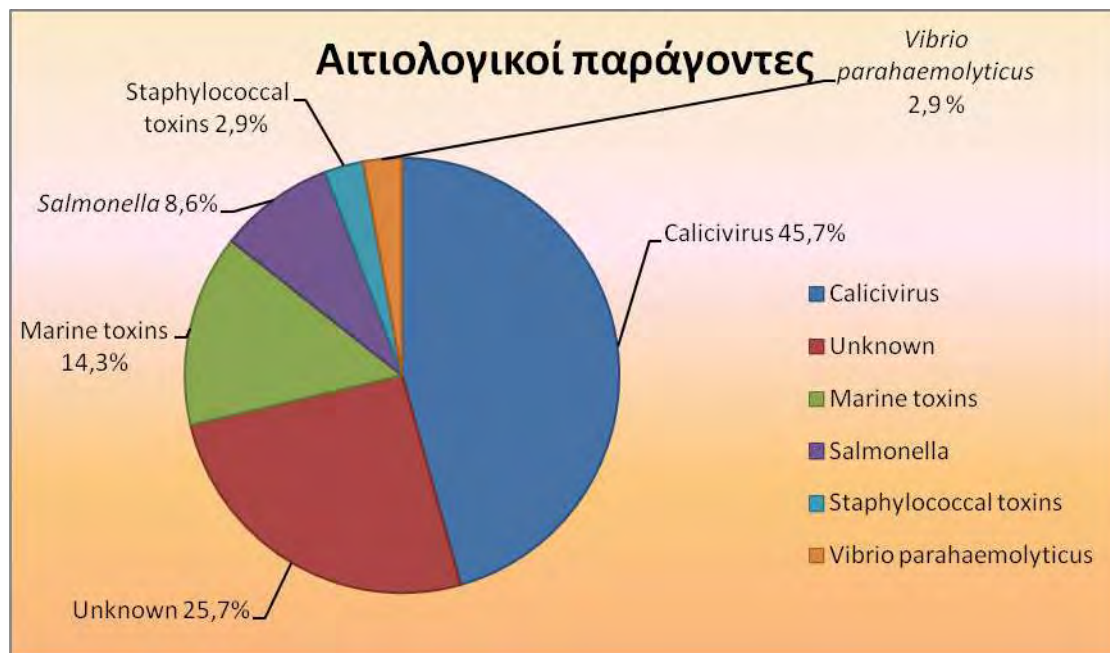
Διάγραμμα 2 : Αριθμός κοινοποιήσεων που ανακοινώθηκαν από το RASFF για τα δίθυρα μαλάκια το 2012 – 2013 (www.rasff.com).

Επιπλέον, στο παρακάτω διάγραμμα 3 γίνεται μια απεικόνιση των περιστατικών, όσον αφορά τα αλιεύματα και τα προϊόντα αλιευμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε το *V. parahaemolyticus* και άλλα είδη της οικογένειας *Vibrionaceae*. Σύμφωνα με την πύλη του Rasff, οι κοινοποιήσεις (alerts, information notification, border rejection, information), για τα έτη 1996 – 2014, ανέρχονται στις 16 και στις 19 για το *V. parahaemolyticus*, και για όλα τα υπόλοιπα είδη *Vibrio* αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3: Αριθμός περιστατικών ανίχνευσης *V. parahaemolyticus* και *Vibrio spp.* για τα έτη 1996 – 2014 (webgate.ec.europa.eu)

Στην Ευρώπη σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια τροφίμων (EFSA Journal 2014-European Food Safety Authority), για το 2013 αναφέρθηκαν 35 κρούσματα, όσον αφορά σε μαλακόστρακα, οστρακοειδή, μαλάκια και προϊόντα αυτών. Τα κρούσματα αφορούσαν 35 στο σύνολο εξάρσεις κρουσμάτων με εμπλεκόμενες χώρες το Βέλγιο (5), τη Δανία (3), τη Γαλλία (7), την Ιρλανδία (1), την Ολλανδία (1), την Ισπανία (15), και το Ηνωμένο Βασίλειο (3). Στο παρακάτω διάγραμμα 4, απεικονίζεται η κατανομή των κρουσμάτων με βάση τον αιτιολογικό παράγοντα στην ΕΕ για το 2012. Το *V. parahaemolyticus* αποτελεί το 2,9 % των αιτιολογικών παραγόντων. Στην Ισπανία, συγκεκριμένα αναφέρθηκαν 51 περιπτώσεις χωρίς να διαπιστωθούν θάνατοι ή να απαιτηθεί νοσηλεία. Το κρούσμα ήταν γενικό και η εστία του ήταν καντίνα τροφοδοσίας στο χώρο εργασίας (www.efsa.europa.eu).



Διάγραμμα 4: Κατανομή 35 κρουσμάτων (53) για μαλακόστρακα, οστρακοειδή, μαλάκια με βάση τον αιτιολογικό παράγοντα στην Ευρώπη το 2012 (www.efsa.europa.eu).

Η συχνότητα εμφάνισης στις Η.Π.Α σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC-Centers for Disease Control and Prevention εκτιμάται στις 4500 περιπτώσεις μολύνσεων από το παθογόνο ετησίως, χωρίς να είναι επιβεβαιωμένες οι περισσότερες. Ωστόσο, είναι πιθανό, ο αριθμός αυτός να είναι αρκετά υψηλότερος, λόγω του ότι πολλές περιπτώσεις δεν αναφέρονται, και επιπλέον η ανίχνευση του μικροοργανισμού σπάνια γίνεται με εκλεκτικά υποστρώματα. Έχει παρατηρηθεί ότι το 70% των μολύνσεων συμβαίνουν μεταξύ Μαΐου και Οκτωβρίου (www.cdc.gov). Στον παρακάτω πίνακα 5 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο αριθμός των περιπτώσεων και οι επιπτώσεις ανά 100.000 άτομα επιβεβαιωμένων μολύνσεων εργαστηριακά για 6 είδη *Vibrio* το 2011.

Είδη	Αριθμός περιπτώσεων	Επίπτωση/100.000 άτομα
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	74	0.16
<i>Vibrio alginolyticus</i>	26	0.06
<i>Vibrio cholerae</i>	14	0.03
<i>Vibrio vulnificus</i>	12	0.03
<i>Vibrio fluvialis</i>	7	0.01
<i>Vibrio mimicus</i>	4	0.01

Πίνακας 5: Αριθμός περιπτώσεων και επίπτωση/100.000 άτομα για 6 είδη *Vibrio* το 2011 στις Η.Π.Α (www.cdc.gov).

Τη χρονιά του 2012, οι μολύνσεις από είδη *Vibrio* είναι σπάνιες (0.4 περιπτώσεις/100.000 πληθυσμό). Ωστόσο, συγκριτικά με τη χρονική περίοδο 2006 – 2008, παρατηρείται 43% αύξηση των επιπτώσεων (www.cdc.gov). Το διάγραμμα 5 δείχνει την ποσοστιαία μεταβολή των επιβεβαιωμένων εργαστηριακά βακτηριακών και παρασιτικών λοιμώξεων του 2012, συγκρινόμενη με την μέση ετήσια επίπτωση των λοιμώξεων κατά τη διάρκεια του 2006 – 2008.



Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή λοιμώξεων του 2012 στις Η.Π.Α, σε σχέση με τη μέση ετήσια μεταβολή λοιμώξεων του 2006 – 2008 (www.cdc.gov.)

Στη βάση δεδομένων PulseNet τα τελευταία χρόνια, το “δακτυλικό αποτύπωμα” DNA που σχετίζεται με όλα τα δακτυλικά αποτυπώματα του *V. parahaemolyticus* έχει αυξηθεί. Το 2013 αυξήθηκε κατά 50%, συγκρινόμενο με 30% και 10% του 2012 και 2011 αντίστοιχα (www.cdc.gov.).

Το 2014, στις Η.Π.Α ο αριθμός των τροφιμογενών λοιμώξεων ανέρχεται συνολικά στις 19.542 περιπτώσεις, εκ των οποίων οι 4.445 περιπτώσεις απαίτησαν νοσηλεία και διαπιστώθηκαν 71 θάνατοι. Ο αριθμός και η επίπτωση/ 100.000 πληθυσμό για τη *Salmonella* είναι 7.452 και 15.45. Για όλα τα υπόλοιπα παθογόνα, *Campylobacter*, *Shigella*, *Cryptosporidium*, STEC non-O157, STEC O157, *Vibrio*, *Yersinia*, *Listeria*, *Cyclospora*, οι αριθμοί έχουν ως ακολούθως: (6.486)[13.45], (2.801)[5.81], (1.175)[2.44], (690)[1.43], (445)[0.92], (216)[0.45], (133)[0.28], (118)[0.24], (26)[0.05]. Ανάμεσα σε 208 *Vibrio* απομονώσεις, οι 131 ήταν *V. parahaemolyticus*, οι 27 *V. alginolyticus*, και οι 19 *V. vulnificus*. Ο αριθμός των περιπτώσεων, όσον αφορά βακτηριακές λοιμώξεις προκαλούμενες από *Vibrios* στις Η.Π.Α το 2014 παρουσίασε αύξηση 52% σε σχέση με τη χρονική περίοδο 2006 – 2008 (www.cdc.gov.).

Στην Ιαπωνία, το *V. parahaemolyticus* είναι η κύρια αιτία τροφιμογενών νοσημάτων, αν και στη συγκεκριμένη χώρα, και σε άλλες όπως Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία πολλές εξάρσεις κρουσμάτων δεν αναφέρονται. Σύμφωνα με την τεχνική έκθεση και αναφορά “Εκτίμηση Επικινδυνότητας του *Vibrio parahaemolyticus* στα αλιεύματα” του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization-WHO) και του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization of United Nations-FAO), ο αριθμός κρουσμάτων και οι αναφερόμενες

περιπτώσεις στην Ιαπωνία από το 1999 – 2005 παρουσιάζονται στον πίνακα 6 που ακολουθεί.

Πίνακας 6: Αριθμός κρουσμάτων και περιπτώσεων λόγω του *V. parahaemolyticus* στην Ιαπωνία για την χρονική περίοδο 1999 – 2005 (www.who.int.)

	Κρούσματα	Περιπτώσεις
1999	667	9396
2000	422	3620
2001	307	3065
2002	229	2714
2003	108	1342
2004	205	2773
2005	113	2301

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΥΠΟ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Στα πρώτα χρόνια ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε φυσικούς περιέκτες για την κατανάλωση και αποθήκευση της τροφής όπως κορμούς δέντρων, κολοκύθες, κοχύλια, φύλλα, πάπυρους, υφαντά κλαδιά, δέρματα ζώων, καθώς και ζωϊκά μέρη όπως κέρατα κ.α. Αυτές οι τεχνικές αποθήκευσης είχαν καλή απόδοση, λόγω ξήρανσης, κάπνισης, αλάτισης, ή και ζύμωσης της τροφής. Από τη στιγμή που προέκυψε η ανάγκη αποθήκευσης της τροφής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, και για διανομή, μια από όλες τις αναπτυσσόμενες δεξιότητες του ανθρώπου ήταν και η ανάπτυξη μεθόδων για προστασία της τροφής από τη βρωμιά και την φθορά. Έτσι, προέκυψε η εμφάνιση ξύλινων, γυάλινων, και κεραμικών περιεκτών. Οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι είχαν αρχίσει να χρησιμοποιούν κεραμικά και πήλινα αγγεία για την αποθήκευση της τροφής περίπου το 3000 π.Χ. Για την προστασία τους από έντομα, τρωκτικά, βακτήρια, υγρασία ή και τον αέρα, επέλεγαν για την σφράγιση των περιεκτών κερι μέλισσας ή πίσσα, λαρδί ή λάδι, καθώς επίσης, ένωσαν τα ανοίγματα των περιεκτών με λινό ύφασμα. Το 600 π.Χ. έγινε γνωστός ο φελλός, ως πώμα σε πολλούς περιέκτες στους Έλληνες και Ρωμαίους. Ο λευκοσίδηρος οδήγησε στην ανάπτυξη μεταλλικών δοχείων για αποθήκευση το 1200 μ.Χ. (Cutter, 2002).

Κατόπιν, βελτιώσεις σε υλικά όπως ξύλο, χαρτί, μέταλλο, κεραμικά, και γυαλί οδήγησαν σε νέες εξελίξεις συντήρησης τροφίμων. Ιστορικά γεγονότα όπως η βράβευση του ζαχαροπλάστη Nicolas Appert το 1809, από τον Ναπολέοντα με 12.000 φράγκα για την εφεύρεση γυάλινων περιεκτών με πώμα φελλού τα οποία μπορούν να υποβληθούν σε θέρμανση, αξίζει να σημειωθούν. Το 1810, η εφεύρεση μεταλλικού δοχείου από τον Durand, οδήγησε στην αρχή της κονσερβοποίησης. Ο Pasteur, το 1840 συμπέρανε ότι οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση των τροφίμων και ότι η θέρμανση και αποστείρωση στον ατμό μπορεί να τους παρεμποδίσει. Το 1870 ανακαλύφθηκε η ζελατίνη που αποτελεί τον πρόδρομο του πλαστικού και το 1875 υπήρξε η εφεύρεση του βιδωτού πώματος. Το 1890, υπήρξαν δυο επιπλέον καινοτομίες όπως ο αυτόματος κατασκευαστής μπουκαλιού και το λαδόχαρτο. Τα παραπάνω παραδείγματα αποτελούν σημαντικές εξελίξεις στην ανάπτυξη και εφαρμογή υλικών συσκευασίας (Cutter, 2002).

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, παρουσιάζεται στο εμπόριο το αλουμινόχαρτο σε ρολό, και η ταινία σελοφάν χρησιμοποιείται για σφράγιση περιεκτών με θέρμανση. Κατά τη διάρκεια του 1950 χρησιμοποιήθηκε το καουτσούκ για υλικά συσκευασίας, παρουσιάστηκε το θερμοσυστελλόμενο πολυβινύλιο (PVC, polyvinyl chloride), προστέθηκε το νάιλον σε υλικά συσκευασίας, τροποποιήθηκαν δοχεία από χάλυβα με επικαλύψεις, και επίσης πολλές βελτιώσεις εμφανίστηκαν στο σχηματισμό δοχείων για επεξεργασία τροφίμων. Μεταξύ του 1960 και 1970 οι σημαντικότερες εξελίξεις στα υλικά συσκευασίας αφορούν τα πλαστικά βάζα, μπουκάλια, δοχεία, και ταινίες από πολυολεφίνιο, πολυβινύλιο, πολυαιθυλένιο, βινυλιδένιο, χλωριούχο βινύλιο, και

νάλλον. Τα πλαστικά αποτελούν την πλέον καλύπτερη επιλογή υλικών συσκευασίας παρουσιάζοντας μια σειρά από ιδιότητες (σφραγιςιμότητα, δύναμη εφελκυσμού, ακαμψία, αντοχή σε ατμό, υγρασία, θερμοκρασίες) που τα κάνει αναντικατάστατα στην αποθήκευση και την διανομή τροφίμων (Cutter, 2002). Επιπλέον, μπορούν να φορμαριστούν σε οποιοδήποτε σχήμα, έχουν χαμηλή πυκνότητα, συντελεστή τριβής, και είναι αισθητικώς ευχάριστα (Singh et al, 2012). Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν ασχοληθεί και με εδώδιμες ταινίες (πρωτεΐνες σόγιας, χιτοζάνη, ζείνη καλαμποκιού, άμυλο, κυτταρίνη, πρωτεΐνες γάλακτος) που χαρακτηρίζονται ανθεκτικές σε λίπη, ωστόσο μειονεκτούν σε πολλά σημεία, όπως στη δυνατότητα φραγμού υδρατμών και οξυγόνου, καθώς και στη διάλυσή τους όταν έρχονται σε επαφή με το νερό (Cutter, 2002). Ωστόσο, τείνουν να είναι περισσότερο βιώσιμα και ανεκτικά, φιλικά προς το περιβάλλον και βιοδιασπώμενα (Singh et al, 2012).

Όλες οι παραπάνω προσπάθειες του ανθρώπου αναπτύχθηκαν για την προστασία των τροφίμων από τη φθορά του χρόνου και του περιβάλλοντος (Cutter, 2002). Σύμφωνα με τους Smith et al (1990), συσκευασία τροφίμων είναι η φυσική οντότητα, που λειτουργεί ως φραγμός ανάμεσα στο περιεχόμενο και το εξωτερικό περιβάλλον. Στόχος της συσκευασίας τροφίμων είναι η προστασία, η πληροφόρηση, και η μεταφορά/διανομή (Singh et al, 2012). Σύμφωνα με τους Yam et al (2005), η συσκευασία περιορίζει το τρόφιμο σε συγκεκριμένο όγκο, προστατεύοντάς το από διαρροή ή σπάσιμο. Πληροφορεί τον καταναλωτή για το περιεχόμενό του και τα θρεπτικά του στοιχεία, δίνοντας συμβουλές για την προετοιμασία του. Ο σχεδιασμός της συσκευασίας θα πρέπει να παρέχει ευκολία στον καταναλωτή, για να χρησιμοποιήσει το προϊόν όπως ο ίδιος επιθυμεί. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρονται η συνοχή και οι περιορισμοί της συσκευασίας, κάτι που είναι πολύ σημαντικό για χρήση του προϊόντος αλλά και τη μεταφορά. Άλλες λειτουργίες της συσκευασίας είναι η γενικότερη προστασία του τροφίμου από το εξωτερικό περιβάλλον, επικοινωνία με τον καταναλωτή σαν εργαλείο marketing, προστασία ακόμη και σε περίπτωση βιοτρομοκρατίας (Yam et al, 2005). Η συσκευασία θα πρέπει να εξασφαλίζει επιμήκυνση της διάρκειας ζωής (αποθήκευση και πώληση), αναλλοίωτα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποδοχή του καταναλωτή, παρεμπόδιση ανάπτυξης αυστηρά αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών.

Για την επιλογή της κατάλληλης συσκευασίας, σημαντικό ρόλο έχει διαπερατότητα των υλικών αποτελώντας κρίσιμο χαρακτηριστικό για την ασφάλεια και ποιότητα του τροφίμου. Θα πρέπει να παρέχει και να εξασφαλίζει μια παρατεταμένη διάρκεια ζωής στο προϊόν και να έχει εξαιρετικές ιδιότητες φραγμού σε προσιτή τιμή (Singh et al, 2012). Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της βιομηχανίας τροφίμων και έχει γίνει αντικείμενο πολλών συζητήσεων όσον αφορά θέματα ανθρώπινης υγείας και περιβάλλοντος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην σημασία της μετανάστευσης ουσιών από υλικά συσκευασίας στο τρόφιμο, προσελκύοντας την προσοχή των επιστημονικών και νομοθετικών κοινοτήτων (Arvanitoyannis & Bosnea, 2010).

Τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των αυξανόμενων απαιτήσεων των καταναλωτών για τρόφιμα έτοιμα προς βρώση και σε “φέτες” οι συσκευασίες τροφίμων αποτελούν μεγάλες τεχνολογικές εξελίξεις. Τα αγαθά αυτά, παρέχουν ευκολία στον καταναλωτή, αλλά είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε φυσικές και χημικές αλλαγές (Sanchez-Rivera et al, 2013). Οι βιομηχανίες τροφίμων παρουσιάζουν συνεχές ενδιαφέρον επενδύοντας σε τεχνολογίες που παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, κυρίως ζωϊκής

προέλευσης, ενώ παράλληλα διατηρείται η ποιότητα, και αυξάνεται η ασφάλεια και η αποδοχή του καταναλωτή (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012). Τέτοιες τεχνολογίες συσκευασίας είναι η ασηπτική συσκευασία (aseptic packaging), έξυπνη συσκευασία (smart/intelligent packaging), ενεργή συσκευασία (active packaging-AP), υπό κενό συσκευασία (vacuum packaging-VP), ελεγχόμενη συσκευασία (controlled packaging-CP), συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (modified atmosphere packaging-MAP).

Ο όρος “τροποποιημένη ατμόσφαιρα” αναφέρεται στις κατάλληλες συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικών αερίων στη συσκευασία τροφίμου πριν την διατήρηση. Ήδη, από το 1882 αυξημένες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) επέτρεπαν την διατήρηση κρεάτων 4 – 5 εβδομάδες και οι βακτηριοστατικές του ιδιότητες μελετούνταν. Η MAP πρωτοεμφανίστηκε το 1927 για την παράταση της διάρκειας ζωής των μήλων, συσκευασμένα σε συγκεντρώσεις οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Το 1938, το 26% και 60% βόειου κρέατος της Νέας Ζηλανδίας και της Αυστραλίας αντίστοιχα, αποστέλλονταν κάτω από συνθήκες ατμόσφαιρας CO₂. Μετά και τον ΄Β Παγκόσμιο Πόλεμο, το 1970 μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε η VP συσκευασία για την παράταση της διάρκειας ζωής νωπού κρέατος. Μέχρι και τότε η τεχνική αυτή δεν είχε χρησιμοποιηθεί εμπορικώς στην Ευρώπη (Phillips, 1996). Το 1972, οι Η.Π.Α εισήχθησαν ένα πατενταρισμένο σύστημα ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (Tectrol) για τη μεταφορά νωπών κρεάτων σε μακρινές αποστάσεις. Το σύστημα αυτό βασίζονταν σε φορτηγά – περιέκτες κατάλληλα για την εισαγωγή προϊόντων με συγκεκριμένα ποσοστά αερίων CO₂, O₂, N₂ με θερμοκρασίες διατήρησης από -1 έως 4° C. Μεγάλα ταξίδια ναυσιπλοΐας από την Αμερική στη Χαβάη, Ιαπωνία, και Ευρώπη περιελάμβαναν αποστολές μεταφοράς νωπού βοδινού, χοιρινού, αρνιού και πουλερικών. Το Tectrol παρουσίασε μεγαλύτερη σταθερότητα στο χρώμα, λιγότερη επιφανειακή ξήρανση και συρρίκνωση, μεγαλύτερη αντοχή στην μικροβιακή αλλοίωση. Επιπλέον πειράματα, έδειξαν ότι το σύστημα ήταν αποτελεσματικότερο όταν τα προϊόντα συσκευάζονται σε ταινία (PVC-polyvinylchloride), απ’ ότι μη συσκευασμένα. Από άποψη κόστους το Tectrol ήταν κατάλληλο για υπεραστικές και υπερωκεάνιες ναυσιπλοΐες. Μέχρι και το 1979 μεταφέρονταν από την Αμερική στην 4.000.000 δολάρια κρέας στην Ευρώπη κάθε εβδομάδα. Ωστόσο, υπήρξε βραδεία αποδοχή της μεθόδου, λόγω πολλών παραγόντων κι ότι σε πολλές περιπτώσεις η κατάψυξη μπορεί να είναι πιο πρακτική. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, οι Marks & Spencer παρουσίασαν την εφαρμογή της τεχνικής MAP στο κρέας το 1979. Η επιτυχία της συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες στο συγκεκριμένο προϊόν, οδήγησε δυο χρόνια αργότερα και στην εφαρμογή επιπλέον τροφίμων όπως μπέικον, ιχθύς (φρέσκα ή με πρόσθετα), κρέας θερμικά επεξεργασμένο σε “φέτες”, και θερμικά επεξεργασμένα οστρακοειδή επίσης (Phillips, 1996).

Η MAP τεχνική συσκευασίας είναι ιδιαίτερα ελκυστική στην παραγωγική διαδικασία των τροφίμων γιατί παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά τη συντήρηση και τη διατήρηση της ποιότητάς τους. Αρχικώς, βελτιώνει την εικόνα του προϊόντος, παρατείνει την εμπορική διάρκεια ζωής, και ελαχιστοποιεί τη χρήση πρόσθετων υλών και συντηρητικών. Επιπλέον, όταν το τρόφιμο εσωκλείεται σε πλαστικές θήκες προλαμβάνεται η αφυδάτωση και η απώλεια βάρους του προϊόντος, καθώς και η απορρόφηση ανεπιθύμητων οσμών από το περιβάλλον (Garabal et al, 2010). Αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο συντήρησης θρεπτικών στοιχείων και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή, χρώμα, υφή) σε πολλούς τύπους

προϊόντων. Επιπλέον, επιμηκύνει το χρόνο ζωής του προϊόντος αναστέλλοντας την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012). Η MAP είναι αρκετά δημοφιλής μέθοδος συσκευασίας στην Ευρώπη, και ιδιαίτερα σε κατεψυγμένα προϊόντα των υπεραγορών. Έχει εφαρμογή σε ποικίλους τύπους προϊόντων όπως στο κρέας, σε αλιεύματα, σε φρούτα και λαχανικά αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής τους με την αναστολή πολλών μικροοργανισμών και κυρίως Gram- αρνητικών αερόβιων βακτηρίων (Mace et al, 2012). Οι κρεοπαραγωγικές βιομηχανίες συγκεκριμένα, δίνουν έμφαση σε καινοτόμες τεχνικές συσκευασίας και ιδιαίτερα σε MAP, VP, μιας και η ζήτηση των καταναλωτών για όλο και λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα αυξάνεται (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

Η εφαρμογή της MAP τεχνικής σε τρόφιμα έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα που έχουν αντίκτυπο στον καταναλωτή, στον παραγωγό τροφίμων και στη Δημόσια Υγεία (Phillips, 1996).

Στον καταναλωτή, τα πλεονεκτήματα που απολαμβάνει έχουν να κάνουν με την αυξημένη διάρκεια ζωής του προϊόντος, την αυξημένη ποιότητα, την ελάχιστη ή και καθόλου χρήση χημικών συντηρητικών, την ενημέρωση του καταναλωτή για το προϊόν, και την ευκολία στη χρήση της συσκευασίας και του προϊόντος (Phillips, 1996).

Για τον παραγωγό, η αυξανόμενη διάρκεια ζωής του προϊόντος, επιτυγχάνει λιγότερες παραδόσεις σε μεγαλύτερες αποστάσεις, με σημαντική μείωση του κόστους μεταφοράς (Phillips, 1996).

Τα μειονεκτήματα στην MAP συσκευασία αφορούν αρχικώς το επιπλέον κόστος για την εφαρμογή της τεχνικής, τον συνεχή έλεγχο της θερμοκρασίας, την ασφάλεια των προϊόντων που θα πρέπει να καθοριστεί, την αύξηση του όγκου της συσκευασίας η οποία απαιτεί περισσότερους εμπορικούς χώρους προβολής, και συνεπώς οδηγεί σε αυξημένα έξοδα μεταφοράς. Τα παραπάνω μειονεκτήματα αφορούν και τον καταναλωτή και τον παρασκευαστή (Phillips, 1996).

Όλα τα πλεονεκτήματα και ευεργετικές επιδράσεις της MAP συσκευασίας που προαναφέρθηκαν χάνονται με το άνοιγμα της συσκευασίας, ενώ για τον παραγωγό υπάρχει μεγάλο κόστος λόγω εκπαίδευσης και εξειδικευμένου προσωπικού για τις διαδικασίες εφαρμογής, καθώς επίσης και ο απαραίτητος εξοπλισμός για την διαφορετική σύνθεση αερίων σε κάθε προϊόν (Phillips, 1996).

Για μια επιτυχή συσκευασία MAP, είναι απαραίτητος ο αυστηρός έλεγχος ορθών πρακτικών και συνθηκών υγιεινής κατά τις διαδικασίες χειρισμού και επεξεργασίας. Για την εξασφάλιση των επιθυμητών αποτελεσμάτων από τη συσκευασία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η σύνθεση των αερίων, ο τύπος συσκευασίας, και το μέγεθος του τροφίμου (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012). Η τεχνολογία MAP μπορεί, επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων (πρόσθετα, αιθέρια έλαια, όζον κ.α.), με αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Σήμερα, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για όλο και πιο ασφαλή και ποιοτικά τρόφιμα, ελάχιστα επεξεργασμένα χωρίς την προσθήκη χημικών έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη τεχνολογιών συντήρησης όπως υψηλή πίεση, τεχνολογία μικροκυμάτων, ακτινοβολία (ακτίνες X, γ- ακτινοβολία, e-ακτίνες), ωμική θέρμανση κατά την επεξεργασία και πιο βελτιωμένες τεχνικές συσκευασίας.

3.2 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Η τεχνική MAP σε τρόφιμα αντικαθιστά τον ατμοσφαιρικό αέρα της συσκευασίας με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις μιγμάτων αερίων (Devlieghere et al, 1998). Ο περιβάλλον αέρας του τροφίμου στη συσκευασία αποκτά μία επιθυμητή σύνθεση (Sandhya, 2009). Σύμφωνα με τους Sacks and Gore, MAP είναι η αντικατάσταση του αέρα στη συσκευασία με διαφορετικό μίγμα αερίων των οποίων η σύνθεση επιτυγχάνεται πριν το κλείσιμο της συσκευασίας χωρίς περεταίρω έλεγχο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, εν αντιθέσει με την CAP όπου η σύνθεση των αερίων ελέγχεται καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης (Stammen et al, 2009). MAP είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει την απομάκρυνση ή την αντικατάσταση του ατμοσφαιρικού αέρα χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο συνδυασμό ποικίλων αερίων και κυρίως διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), άζωτο (N_2) και οξυγόνο (O_2) με βάση τον Cutter, (2002). Στόχος του μίγματος αερίων μέσα στη συσκευασία είναι η μείωση του ρυθμού αναπνοής, της μικροβιακής ανάπτυξης, και της ενζυματικής υποβάθμισης του τροφίμου (Cutter, 2002). Σύμφωνα με τον Sandhya, η MAP είναι μία τεχνική με την οποία επιμηκύνεται η περίοδος της διάρκειας ζωής νωπών ή ελάχιστα επεξεργασμένων προϊόντων. Η τεχνική συντήρησης που εφαρμόζεται αλλάζει τον περιβάλλοντα αέρα του τροφίμου στη συσκευασία με κατάλληλες συγκεντρώσεις μιγμάτων επιθυμητών αερίων. Τα ποσοστά αερίων που θα εφαρμοστούν στη συσκευασία εξαρτώνται από τον τύπο του προϊόντος, τα υλικά συσκευασίας που θα χρησιμοποιηθούν και το πάχος τους, τη θερμοκρασία διατήρησης κ.α. (Sandhya, 2009). Η τεχνική της MAP συμβάλλει στην αποφυγή επιδράσεων στο τρόφιμο όπως αποχρωματισμός, δυσάρεστες οσμές, απώλεια θρεπτικών συστατικών, αλλαγές στην υφή, παθογένεια, κι άλλους μετρήσιμους παράγοντες (McMillin, 2008). Η MAP είναι ανασταλτική σε αρκετούς μικροοργανισμούς αυξάνοντας τη διατήρηση της ποιότητας πολλών τύπων προϊόντων (Cutter, 2002). Έχει εφαρμοσθεί σε πολλά προϊόντα αλιευμάτων όπως γατόψαρο, γάδο, μπακαλιάρο, ρέγγα, σολομός του Ατλαντικού, τιλάπια, προσφυγάκι, πέστροφα παρουσιάζοντας αύξηση του χρόνου ζωής (Rosnes et al, 2006).

Σύμφωνα με τον Church (1993), οι παράγοντες που επιδρούν στη διάρκεια ζωής των προϊόντων σε MAP συσκευασία διακρίνονται σε εγγενείς και εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς παράγοντες, ανήκουν η ενεργότητα νερού (a_w), το pH, η μικροβιακή χλωρίδα (αρχική, μετά την επεξεργασία, και η αναπτυσσόμενη), τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, η συγκέντρωση και ο τύπος των παραγόντων συντήρησης, η παρουσία φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, παρουσία σπόρων, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (E_h). Στους εξωγενείς παράγοντες, ανήκουν η θερμοκρασία ελέγχου σε όλα τα στάδια (επεξεργασία, παρασκευή και διατήρηση), η συνθήκες υγιεινής κατά την επεξεργασία, η ποιότητα πρώτης ύλης, το τελικό προϊόν (συνδυασμός συστατικών στη συσκευασία), οι διαδικασίες πριν τη συσκευασία, η αρχική και τελική σύνθεση

αερίων, η σχετική διαπερατότητα των υλικών συσκευασίας σε αέρια, η αναλογία αερίου / προϊόν, η καθαρότητα των αερίων, ο σχεδιασμός της συσκευασίας (κυκλοφορία αερίων). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα της συσκευασίας MAP (Phillips, 1996).

3.3 ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΕΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Τα τρία κύρια αέρια που χρησιμοποιούνται στη MAP είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), το οξυγόνο (O_2), και το άζωτο (N_2). Χρησιμοποιούνται είτε μεμονωμένα είτε με κατάλληλα συνδυασμό συγκεντρώσεων. Η επιλογή των αερίων εξαρτάται από το προϊόν που θα συσκευαστεί. Επιπλέον, ευγενή ή αδρανή αέρια έχουν εφαρμογή κυρίως σε προϊόντα όπως καφές, snacks. Τα αέρια χρησιμοποιούνται κοινώς, ούτως ώστε να επέλθει μια ασφαλή ισορροπία μεταξύ μιας παράτασης του χρόνου ζωής και βέλτιστων οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τροφίμου (Sandhya, 2009). Ο συνδυασμός των τριών κύριων αερίων μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους. Σύμφωνα με τους Moleyar & Narasimham (1994), για μία αδρανή επικάλυψη της συσκευασίας χρησιμοποιείται μόνον N_2 . Η ημι – αντιδραστική επικάλυψη χρησιμοποιεί τους δύο συνδυασμούς CO_2/N_2 , $\text{O}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ και η πλήρως αντιδραστική επικάλυψη χρησιμοποιεί μόνον CO_2 ή και CO_2/O_2 (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012).

Λιγότερο συχνά αέρια είναι και το υποξείδιο, οξείδια αζώτου, αιθάνιο, αιθυλένιο, χλώριο, μονοξείδιο του άνθρακα, διοξείδιο του θείου, και όζον. Επιπλέον, ως αδρανή αέρια, είναι επίσης, το ήλιο, το αργόν, το ξένο, και το νέον. Τα παραπάνω αέρια δεν έχουν εμπορική εφαρμογή λόγω ασφάλειας, κόστους, νομοθετικών περιορισμών (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012; Sandhya, 2009).

3.3.1 ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (CO_2) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Το CO_2 είναι αέριο που χρησιμοποιείται συχνά σε MAP, λόγω των αντιμικροβιακών χαρακτηριστικών. Είναι άχρωμο, με ελαφριά δριμεία οσμή σε υψηλές συγκεντρώσεις και διαλυτό στο νερό (1.57 g/kg σε 100 kPa στους 20° C), σε λιπίδια και οργανικά οξέα. Δημιουργεί ανθρακικά οξέα προκαλώντας μείωση του pH και αύξηση της οξύτητας του διαλύματος (Arvanitoyannis, 2012; Sandhya, 2009). Οι ευεργετικές του ιδιότητες αναφέρονται κυρίως σε Gram- αρνητικά αερόβια βακτήρια (*Pseudomonas spp.*), αναστέλλοντας την μικροβιακή αλλοίωση. Το CO_2 είναι ικανό να διαπερνά τις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων, σχηματίζοντας ανθρακικά οξέα που συμβάλλουν στη μείωση του ενδοκυτταρικού pH και της ενζυματικής δραστηριότητας. Επιπλέον, παρουσιάζει και μεταβολή των ιδιοτήτων των μεμβρανών (Meredith et al, 2014). Η επίδρασή του στους μικροοργανισμούς, παρατείνει τη φάση προσαρμογής (lag phase) και μειώνει το ρυθμό λογαριθμικής φάσης (logarithm phase) της ανάπτυξης (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012). Η άμεση εφαρμογή 20% CO_2 σε νωπά σφάγια βοοειδή έχει βρεθεί ότι παρατείνει τη φάση προσαρμογής σε 11 ημέρες στους 5° C ή 2.4 ημέρες στους 10° C. Η επίδραση του CO_2 μειώνεται καθώς

η βακτηριακή ανάπτυξη μεταβαίνει από τη φάση προσαρμογής στη λογαριθμική φάση (Genigeorgis, 1984). Σε θερμοκρασίες άνω των 10° C, το CO₂ δεν έχει ανασταλτική επίδραση ούτε στη διάρκεια ζωής του τροφίμου, ούτε στη φάση προσαρμογής (Phillips, 1996).

Η βακτηριοστατική επίδραση του CO₂ εντός της MAP, εξαρτάται από παράγοντες όπως το ποσοστό συγκέντρωσής του, την απορρόφησή του στο τρόφιμο, το αρχικό μικροβιακό φορτίο, τη θερμοκρασία συντήρησης, και τον τύπο του τροφίμου (Genigeorgis, 1984). Μία ελάχιστη συγκέντρωση των 20 – 60% CO₂ απαιτείται για την αποτελεσματικότητα της επίδρασης στους αερόβιους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στην υπερκείμενη φάση της συσκευασίας (Cutter, 2002). Μόνον, το διαλυμένο μέρος CO₂ στην υδατική φάση και στους ιστούς του τροφίμου παρουσιάζει αντιμικροβιακή ιδιότητα, και αυτό αποτελεί σημαντική παράμετρο εκτίμησης της επίδρασης του αερίου σε MAP συνθήκες (Devlieghere et al, 1998).

Η ανασταλτική επίδραση του CO₂ αυξάνεται καθώς η θερμοκρασία συντήρησης μειώνεται. Η αποτελεσματικότητά του αυτή οφείλεται στην αυξανόμενη διαλυτότητά του σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, σε μονά ή σύνθετα υποστρώματα, καθώς και στο τρόφιμο. Η αναστολή του *Pseudomonas fluorescens* σε υποστρώματα διατηρημένα στον αέρα και στους 30° C βρέθηκε 10% και 20% αντίστοιχα. Ωστόσο, η συντήρηση των υποστρωμάτων στους 5° C, παρουσίασε βακτηριακή αναστολή 80%. Μελέτες στο κρέας έχουν δείξει ότι όσο πιο κοντά στους 0° C είναι η θερμοκρασία συντήρησης, τόσο υψηλότερες συγκεντρώσεις CO₂ και μεγαλύτερη επέκταση του χρόνου ζωής του τροφίμου, λόγω αυξανόμενης βακτηριακής αναστολής των *Pseudomonas* και *Achromobacter*. Αντίθετα, οι Enforms & Molin (1981), έδειξαν ότι η αναλογία μεταξύ της σχετικής αναστολής και του *Pseudomonas fragi* και της διαλυτότητας του CO₂ ήταν σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας (Genigeorgis, 1984).

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του CO₂ σύμφωνα με τους Finne (1982) και Silliker (1981) οφείλεται:

- Στη μεταβολή του pH στην επιφάνεια του τροφίμου (λόγω ιονισμού των σχηματιζόμενων ανθρακικών οξέων)
- Στην τοξικότητα του αδιάστατου ανθρακικού οξέος
- Στην παρέμβαση της μεταβολικής δραστηριότητας βακτηριακού πληθυσμού μέσω αναστολής διυδρογενασών (ισοκιτρικό και μηλικό οξύ)

Ωστόσο, αναφέρεται, ότι αυτή η μικρή μεταβολή pH στην επιφάνεια του τροφίμου δε μπορεί να επιφέρει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Ο Farber (1991), εξηγεί τέσσερις μηχανισμούς δράσης του CO₂. Πρώτον, μεταβολή στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων και των επιδράσεων όσον αφορά την πρόληψη θρεπτικών στοιχείων και την απορρόφηση. Δεύτερον, άμεση αναστολή των ενζυμικών συστημάτων ή μειώσεις στο ρυθμό αντιδράσεων των ενζύμων. Τρίτον, διείσδυση ουσιών μέσω μεμβράνης με αποτέλεσμα αλλαγή του ενδοκυτταρικού pH. Τέλος, άμεσες αλλαγές στις φυσικό – χημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (Phillips, 1996).

Σε έρευνα του Devlieghere & Debevere (2000), εκτιμήθηκε η βακτηριακή ανάπτυξη ψυχρότροφων Gram-αρνητικών βακτηριών (*Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*) σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη Gram-θετικών βακτηριών (*Lactobacillus sake*, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus circulans*), σε διάφορους τύπους τροφίμων όπως, θερμικά επεξεργασμένες γαρίδες, θερμικά επεξεργασμένο λουκάνικο από κοτόπουλο, νωπό χοιρομέρι και θερμικά επεξεργασμένο ζαμπόν, φιλέτο μπακαλιάρου, φιλέτο κοτόπουλο, μπέικον, βοδινό κρέας. Ο ρυθμός της συγκέντρωσης διαλυμένου CO₂ στη συσκευασία προσδιορίστηκε στους 7° C και η αναλογία Gas/Product αυξήθηκε από 1/1 σε 2/1. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια παρουσίασαν ευαισθησία στο αέριο CO₂. Τα υψηλότερα επίπεδα βακτηριακής αναστολής παρουσίασαν τα *S. putrefaciens* και *P. phosphoreum*. Σε Gram-θετικά βακτήρια το *L. sake* παρουσίασε την υψηλότερη ανθεκτικότητα, και συγκρινόμενο με το *B. thermosphacta* επίσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ο κυρίαρχος μικροβιακός πληθυσμός σε αναερόβιες συνθήκες. Η MAP σε στελέχη του γένους *Bacillus* παρουσίασε μία μικρή παράταση της διάρκειας ζωής. Συγκεκριμένα, το *B. circulans* το οποίο είναι παρόν σε παστεριωμένο γάλα και αυγά έδειξε μία μέτρια αναστολή σε CO₂. Η αντιμικροβιακή δράση του CO₂ ήταν σημαντική στη φάση υστέρησης της *L. monocytogenes* και *Pseudomonas spp.*

Οι Lannelongue και Finne, 1986 απομόνωσαν μεταξύ άλλων βακτηριδίων και είδη *Vibrio* τα οποία επωάστηκαν σε στερεά υποστρώματα υπο αερόβιες συνθήκες και σε ατμόσφαιρες CO₂ (25-100%), με θερμοκρασίες που κυμάνθηκαν από 4 – 25° C. Κανένας μικροοργανισμός δεν εμφάνισε ανάπτυξη σε 25% CO₂ στους 4° C. Ωστόσο στην ίδια θερμοκρασία παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες. Τα *Vibrio spp.* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε CO₂ και το *Micrococcus variens* τη μικρότερη. Ο Lee, 1981 αναφέρει καθόλου μικροβιακή ανάπτυξη συγκεκριμένα για το *V. parahaemolyticus* σε ατμόσφαιρα με ποσοστό CO₂ 60%, και βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Stammen et al, 1990).

Σε ποσοστά άνω του 25% CO₂ παρατηρείται αποχρωματισμός (καφέ κηλίδες), οφειλόμενος στο περιεχόμενο της μυοσφαιρίνης που εν συνεχεία μετατρέπεται σε οξυμυοσφαιρίνη και μεταμυοσφαιρίνη. Η οξείδωση είναι ο κυριότερος παράγοντας αποχρωματισμού στο κρέας και στα προϊόντα κρέατος (Genigeorgis, 1984). Επιπλέον, οξείδωση της αίμης επιτυγχάνεται από τα επίπεδα και τα μήκη κύματος του φωτός, την ποσότητα βακτηριακής ανάπτυξης, το pH, και την ένταση του CO₂ στη επιφάνεια του κρέατος (McMillin, 2008). Αυτό δείχνει να είναι μειονέκτημα και ιδιαίτερα σε τρόφιμα πλούσια σε ποσοστά μυοσφαιρίνης όπως το κόκκινο κρέας. Κατόπιν, η έκθεση του στον αέρα μπορεί να επαναφέρει το τρόφιμο σε ένα αποδεκτό χρώμα μέσα σε 48 ώρες (Genigeorgis, 1984). Οι δύο κοινοί αερόβιοι μικροοργανισμοί στο νωπό κρέας είναι *Pseudomonas* και *Achromobacter*. Σχετίζονται με τον αποχρωματισμό του κρέατος μειώνοντας την ένταση του O₂ σε περιβάλλον ατμοσφαιρικού αέρα (McMillin, 2008). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί αποχρωματισμός μη μικροβιακής προέλευσης και σε κρέας πουλερικών (Genigeorgis, 1984). Πάραυτα, στο κρέας των πουλερικών είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων ποσοστών CO₂, μιας και στο κρέας τους η μετατροπή μυοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη είναι λιγότερο φανερή (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012). Στα ψάρια, όπου του περιεχόμενο μυοσφαιρίνης είναι χαμηλότερο, απαιτούνται υψηλότερα ποσοστά CO₂ από 25%. Τα βέλτιστα ποσοστά CO₂ για το χρόνο ζωής των

ψαριών κυμαίνονται από 40 – 100% εξαρτώμενα από τη θερμοκρασία συντήρησης. Ποσοστό 100% CO₂ έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικό σε συνθήκες συντήρησης 10° C (Genigeorgis, 1984).

Το CO₂ δεν αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα σε όλα τα τρόφιμα. Εξαρτάται άμεσα από τη μικροβιακή χλωρίδα και τα χαρακτηριστικά τους. Σε τρόφιμα, όπου στο μικροβιακό τους φορτίο είναι παρόντες οι ζυμομύκητες, η MAP δεν είναι η πλέον καλύτερη επιλογή συσκευασίας. Κατά την ανάπτυξη των ζυμών παράγεται CO₂ το οποίο διεγείρεται από υψηλά επίπεδα του αερίου στη συσκευασία, αποτελώντας έτσι δυνητικό παράγοντα αλλοίωσης. Επιπλέον, τρόφιμα που σχετίζονται με το *Clostridium perfringens* και το *Clostridium botulinum* δεν αναστέλλονται, αναπτύσσονται σε αναερόβιες συνθήκες, και ευνοούνται από την παρουσία του αερίου. Ορισμένα τρόφιμα στα οποία δεν είναι κατάλληλη η παρουσία του CO₂ είναι το Ουγγρικό σαλάμι και το μπέικον (Phillips, 1996).

3.3.2 ΟΞΥΓΟΝΟ (O₂) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Το οξυγόνο είναι αέριο άχρωμο, άοσμο, με εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητα και υποστηρίζει την καύση. Η διαλυτότητά του είναι χαμηλή στο νερό (0.040 g/Kg σε 100 kPa στους 20° C) και προωθεί πολλές αντιδράσεις στα τρόφιμα όπως οξείδωση λιπών (τάγγιση), αντιδράσεις αμαύρωσης, χρωστικές. Τα περισσότερα αλλοιωγόνα βακτήρια και μύκητες αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες. Γι' αυτό σε εφαρμογή συσκευασιών MAP το ποσοστό οξυγόνου βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Sandhya, 2009).

Βασικός ρόλος του αερίου σε περιβάλλον MAP είναι η αύξηση και η διατήρηση κόκκινου χρώματος στο κρέας, και η παρεμπόδιση της αναστρέψιμης μετατροπής της μυοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη. Ακόμη, το αέριο παρουσιάζει ανασταλτική δράση σε ψυχρότροφους μικροοργανισμούς όπως *Acinetobacter* και *Moraxella*. Κατά την διάρκεια αποθήκευσης η συγκέντρωση του O₂ μειώνεται καθώς έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του τροφίμου, λόγω διαλυτότητας στους ιστούς καθώς επίσης και αναπνοής βακτηρίων (Genigeorgis, 1984).

3.3.3 ΑΖΩΤΟ (N₂) ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Το άζωτο είναι σχετικά άοσμο, άγευστο, άχρωμο και μη αντιδραστικό αέριο. Η πυκνότητά του είναι χαμηλότερη από την πυκνότητα του αέρα, δεν είναι εύφλεκτο και η διαλυτότητά του στο νερό είναι χαμηλή (0.018 g/kg σε 100 kPa στους 20° C), όπως και σε άλλα συστατικά τροφίμων. Το άζωτο καθυστερεί την αερόβια μικροβιακή αλλοίωση, αλλά δεν εμποδίζει την βακτηριακή ανάπτυξη σε αναερόβιες συνθήκες. Συνήθως, εφαρμόζεται σε συνθήκες MAP για την αποφυγή κατάρρευσης της συσκευασίας (Sandhya, 2009).

3.3.4 ΑΛΛΑ ΑΕΡΙΑ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Επιπλέον αέρια, που έχουν εφαρμογή σε συσκευασίες MAP είναι το μονοξείδιο άνθρακα (CO). Το CO, είναι άχρωμο, άγευστο, άοσμο, αντιδραστικό, εύφλεκτο αέριο και παρουσιάζει τοξικότητα. Η διαλυτότητά του στο νερό είναι χαμηλή ενώ σε οργανικά διαλύματα υψηλή. Η χρήση του έχει αδειοδοτηθεί στις Η.Π.Α για την αποφυγή αμαύρωσης συσκευασμένου μαρουλιού (Sandhya, 2009). Έχει ανασταλτική ιδιότητα σχηματίζοντας την μυοσφαιρίνη σε μία κόκκινη χρωστική – καρβοξυμυοσφαιρίνη η οποία είναι σταθερή και δεν οξειδώνεται σε μεταμυοσφαιρίνη (Genigeorgis, 1984).

Το διοξείδιο του θείου (SO₂) παρουσιάζει μυκητοστατικές και βακτηριοστατικές ιδιότητες σε περιβάλλον χαμηλού pH, και έχει εφαρμογή σε συσκευασίες προϊόντων όπως φρούτα, λουκάνικα, χυμούς, κρασιά, γαρίδες (Arvanitoyannis, 2012).

Επιπλέον, ευγενή αέρια, που έχουν εφαρμογή σε MAP συσκευασίες είναι το ήλιον (He), το αργόν (Ar), το νέον (Ne), το ξένον (Xe) (Sandhya, 2009). Τα ευγενή αέρια μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των φρούτων και των λαχανικών. Ιδιαίτερα η χρήση του αερίου αργόν έχει χρησιμοποιηθεί σε μπρόκολο και μαρούλι (Arvanitoyannis, 2012).

3.4 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ ΣΕ ΨΑΡΙΑ

3.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα ψάρια αποτελούν μια από τις πιο ευαλλοιώτες κατηγορίες τροφίμων. Η βασικότερη αιτία αλλοίωσης είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο τους και η βακτηριακή δράση μετέπειτα. Οι αιτίες αυτές έχουν άμεση σχέση με το είδος του ψαριού, αλλά κυρίως με το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο διαβιούν (Stammen et al, 2009). Τα νωπά τρόφιμα, όπως και τα ψάρια αρχικώς εμπεριέχουν ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Ωστόσο, λίγοι είναι εκείνοι που αναπτύσσονται στα τρόφιμα σε μεγάλο αριθμό (Gram & Huss, 1996). Επιπλέον, οι συνθήκες και οι διαδικασίες χειρισμού κατά την αλίευση και μεταφορά, μπορούν να αυξήσουν και να αλλάξουν την κυρίαρχη μικροβιακή τους χλωρίδα. Η αρχική μόλυνση μπορεί να συμβεί στο κατάστρωμα, όπου είναι πιθανό να παραμείνουν εκτεθειμένα για πολλές ώρες στον ήλιο. Η διαδικασία του εκσπλαχνισμού επίσης, μπορεί να επιφέρει διασταυρούμενη επιμόλυνση εάν δεν τηρηθούν ορθές πρακτικές υγιεινής. Τέλος, η τοποθέτησή τους στον πάγο ή και στο υδάτινο νερό κατά τη μεταφορά είναι ένα ακόμη σημείο διασταυρούμενης επιμόλυνσης καθώς και ανάπτυξης της ψυχρόφιλης χλωρίδας (Stammen et al, 2009).

Ο μικροβιακός πληθυσμός σε ψάρια που προέρχονται από ζεστά νερά, αφορά κυρίως μεσόφιλα Gram-θετικά βακτήρια, όπως μικρόκοκκους και βάκιλλους. Αντιθέτως, τα ψυχρόφιλα Gram-αρνητικά βακτήρια όπως *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, και *Vibrio spp.*, είναι αυτά που κυριαρχούν συνήθως σε ψάρια από κρύες θάλασσες (Stammen et al, 2009). Τα πιο ενεργά βακτήρια όσον αφορά την αλλοίωση των ψαριών είναι το *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas spp.* Τα συγκεκριμένα βακτήρια παράγουν H₂S (Debevere & Boskou, 1996).

Η διάρκεια ζωής των ψαριών σε ψύξη ή στον πάγο κυμαίνεται από 2 έως 14 ημέρες ανάλογα με το είδος, την περιοχή αλίευσης και την εποχή. Για την αναστολή και επιβράδυνση της μικροβιακής αλλοίωσης, η MAP τεχνολογία διπλασιάζει και τριπλασιάζει την διάρκεια ζωής των ψαριών και των αλιευμάτων (Stammen et al, 2009).

Το οξείδιο της τριμυθελαμίνης (TMAO) είναι παρόν σε όλα τα ψάρια της θάλασσας και σε ίχνη στα ψάρια του γλυκού νερού. Αποτελεί έναν σημαντικό εγγενή παράγοντα που επιδρά στη μικροβιολογία και αλλοίωση των ψαριών, αυξάνοντας το ενεργό δυναμικό (E_h) στη σάρκα των ψαριών. Κατόπιν, το TMAO σχηματίζεται σε TMA από βακτήρια αλλοίωσης όπως *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* και *Vibrionaceae* προκαλώντας δυσάρεστες οσμές και γεύσεις (Gram & Huss, 1996).

Στα ψάρια γενικώς, οι συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη διατήρηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και στην ενίσχυση της διάρκειας ζωής. Στην ρέγγα και τον μπακαλιάρο, έχει παρατηρηθεί μείωση χημικών, όπως υπεροξειδία που επιδρούν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Σε νωπά προϊόντα αλιευμάτων αναστέλλεται η βακτηριακή ανάπτυξη, με αποτέλεσμα τη μείωση των συνολικών πτητικών βάσεων (TVB-Total Volatile Bases) και της τριμυθελαμίνης (TMA-trimethylamine) που έχουν σχέση με την νωπότητα της σάρκας των ιχθύων. Στον μερλούκιο που συντηρήθηκε στον πάγο σε MAP συνθήκες με ποσοστό CO₂ έως και 60%, είχε δυο φορές διάρκεια ζωής σε σχέση με τους μάρτυρες που συντηρήθηκαν στον αέρα, χωρίς σημαντική απώλεια ποιότητας μιας και οι συνθήκες MAP επιβραδύνουν τις πρωτεϊνικές λειτουργίες (Phillips, 1996).

Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ μπορούν να επιφέρουν και αρνητικά αποτελέσματα. Υψηλότερα επίπεδα αερίου μπορούν να διαλυθούν στο τρόφιμο επηρεάζοντας το χρώμα του με την επίδραση χρωστικών. Η πτώση του pH των ιστών μπορεί να προκαλέσει απώλεια της ικανότητας συγκράτησης του νερού και να προκύψει στάλαγμα από τη συσκευασία. Τέλος παραμόρφωση ή κατάρρευση της συσκευασίας μπορεί να επέλθει από υψηλά επίπεδα του αερίου (Phillips, 1996).

Σε θερμικά επεξεργασμένα ψάρια (κάπνιση ή αλάτιση) οι υψηλές συγκεντρώσεις του αερίου CO₂ παρατείνουν τη διάρκεια ζωής τους, χωρίς να παρατηρείται το φαινόμενο του σταλάγματος ή εκκρίματος από τους μυς όπως στα νωπά προϊόντα. Η μικροβιακή χλωρίδα εξαρτάται από μολυσματικούς παράγοντες μετά την επεξεργασία ή διασταυρούμενη επιμόλυνση από το περιβάλλον χειρισμού, με εξαίρεση τα θερμοανθεκτικά και αλοφιλικά βακτήρια. Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας

αποτελείται κυρίως από Gram+ θετικά βακτήρια (Phillips, 1996). Τα πιο κυρίαρχα συνήθως μετά την αλάτιση είναι το *Halobacterium*, *Halococcus* (Gram & Huss, 1996). Η εφαρμογή MAP σε ψάρια έχει θετικά αποτελέσματα αλλά απαιτείται συνεχής παρακολούθηση της θερμοκρασίας συντήρησης, ιδιαίτερα όταν είναι μεγάλος ο χρόνος συντήρησης. Σε περίπτωση αναερόβιων συνθηκών για μεγάλο χρονικό διάστημα, υπάρχει κίνδυνος αλλαντίασης για προϊόντα που περιέχουν σπόρους μη πρωτεολυτικού *C. botulinum*. Εφαρμογή MAP σε θερμικά επεξεργασμένα ψάρια έχει γίνει σε γάδο (*Parapercis colias*), σολωμό (*Atlantic salmon*, *Salmo salar*) κ.α. (Phillips, 1996).

3.4.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Πολλές μελέτες στην επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν όσον αφορά την τεχνολογία τροποποιημένης ατμόσφαιρας για πολλά προϊόντα όπως κρέας και προϊόντα ζωϊκής προέλευσης, αλιεύματα, προϊόντα φυτικής παραγωγής και προέλευσης, ανθοκομικά, κ.α.

Στον μπακαλιάρο (*Gadus spp.*) παρακάτω αναφέρονται τέσσερις μελέτες σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σύμφωνα με την ανασκόπηση των Stammen et al, 2009.

Τα μίγματα αερίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το CO₂, το N₂, και το O₂. Στην έρευνα του Stenstrom (1985), με ποσοστό 50% CO₂ και 50% N₂ ή O₂ υπήρξε πενταπλάσια αύξηση της διάρκειας ζωής. Σε ατμόσφαιρες CO₂/O₂ η κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα που παρατηρήθηκε ήταν οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus spp.*, ενώ σε ατμόσφαιρες CO₂/N₂ ο *Pseudomonas spp.* αποτελούσε το 3% της μικροβιακής χλωρίδας και δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στις υψηλές συγκεντρώσεις CO₂. Η αναλογία Gas / Product ήταν 50:50 και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 2° C (Stammen et al, 2009).

Ο Jensen et al, 1979 χρησιμοποίησε ατμόσφαιρες 40% CO₂ και 60% N₂ και αντίστροφα σε θερμοκρασίες συντήρησης 2° C. Σ' αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε το *Pseudomonas spp.* ως κυρίαρχη μικροβιολογική χλωρίδα (Stammen et al, 2009).

Ο Woyewoda et al, 1984 παρατήρησε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά φιλέτων μπακαλιάρου αποθηκευμένα στους 0° C, σε MAP συνθήκες με συγκέντρωση 60% CO₂ και 40% αέρα. Διαπίστωσε ότι η παράταση 3 ημερών του χρόνου ζωής δεν είναι οικονομικά συμφέρουσα (Stammen et al, 2009).

Σε άλλη μελέτη ο Villemure et al, 1986 χρησιμοποίησε μίγματα αερίων 25% CO₂ και 75% N₂ αποθηκευμένα στους 0° C, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής για 20 ημέρες οργανοληπτικά. Ωστόσο, τιμές των συνολικών πτητικών ενώσεων (Total Volatile Basic Nitrogen-TVB-N) παρουσίασαν 6 - 7 ημέρες διάρκειας ζωής. Ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα σχετικά με το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο των φιλέτων μπακαλιάρου σε σχέση με την αποθήκευση ολόκληρου του ψαριού. Διαπιστώθηκε το συμπέρασμα ότι το δέρμα του ψαριού λειτούργησε ως φραγμός – εμπόδιο στην απώλεια βάρους και στον βακτηριακό πληθυσμό (Stammen et al, 2009).

Σε έρευνα του Dalgaard et al, (1993) μελετήθηκε η μικροβιακή αλλοίωση και η διάρκεια ζωής φιλέτων μπακαλιάρου σε MAP και VP συντήρηση. Οι επτά ομάδες δειγμάτων συντηρήθηκαν στους 0° C σε αέρια CO₂ και N₂. Τα ποσοστά CO₂ κυμαίνονταν από 0 – 100%. Μικροβιολογικός, χημικός και οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα μέσα στις 13 – 28 ημέρες συντήρησης. Κύριος παράγοντας μικροβιακής αλλοίωσης υπήρξε η ανάπτυξη Gram-αρνητικών βακτηριών και από την παραγωγή H₂S. Σε υψηλά επίπεδα CO₂ παρατηρήθηκε μείωση των συγκεκριμένων βακτηριών μέχρι και 2 – 3 log. Η συγκέντρωση του CO₂, επίσης καθυστέρησε την αύξηση της συγκέντρωσης της TMA, και εκτός από τα φιλέτα που αποθηκεύτηκαν σε 97% CO₂, η καθυστέρηση της εμφάνισής της αντιστοιχούσε στην παράταση της διάρκειας ζωής. Η παράταση του χρόνου ζωής, σε σχέση με τη VP συντήρηση ήταν 6 - 7 ημέρες σε συγκέντρωση CO₂ 48%. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του αερίου (97% CO₂) ήταν 15 έως 16 ημέρες. Παρατηρήθηκε επίσης, στάλαγμα – σταγονίδια των φιλέτων και η υφή χαρακτηρίστηκε ως μαλακή και θρυμματισμένη κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο, αποδιδόμενα στις χημικές αντιδράσεις.

Οι Debevere & Boskou (1996), συσκευάσαν φιλέτα μπακαλιάρου (*Gadus morhua*) σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Α: 60% CO₂ /10% O₂/30% N₂), (Β: 60% CO₂ /20% O₂/20% N₂), (Γ: 60% CO₂/30% O₂/10% N₂), (Δ: 60% CO₂ /40% O₂). Οι συσκευασίες αποθηκεύτηκαν στους 6° C για 7 ημέρες και πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός, και χημικός έλεγχος απ' την πρώτη ημέρα των δειγμάτων στο εργαστήριο καθώς και την 3^η, 4^η, 5^η, 6^η, και 7^η ημέρα. Ο μικροβιολογικός έλεγχος έδειξε μια μικρή αύξηση των συνολικών αερόβιων βακτηρίων κατά την διάρκεια συντήρησης σε όλες τις ομάδες, χωρίς σημαντική διαφορά. Ο αριθμός των αναερόβιων βακτηριών κατά τις πρώτες τρεις ημέρες δεν αυξήθηκε λόγω της συγκέντρωσης CO₂, ενώ από την 4^η ημέρα παρατηρήθηκε αύξηση φτάνοντας στα επίπεδα των αερόβιων βακτηριών. Η ομάδα Β, είχε τη χαμηλότερη αύξηση σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τα βακτήρια παραγωγής υδροθείου παρουσίασαν μια αύξηση κατά τη διάρκεια συντήρησης της τάξης των 2 – 3 log units, αλλά δεν έφτασαν σε επίπεδα μικροβιακής αλλοίωσης. Η παραγωγή TMA ήταν συνεχής μέσα στις 7 ημέρες συντήρησης στις MAP συσκευασίες. Παρά την εφαρμογή MAP με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις O₂ υπήρξε μία αρκετά υψηλή τιμή τριμυθελαμίνης, ώστε να θεωρηθεί το προϊόν αλλοιωμένο την 4^η ημέρα αποθήκευσης στους 6° C. Αυτό είχε σημαντική επίπτωση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε στην έρευνα ότι πιθανώς το *Photobacterium phosphoreum* είναι πιθανόν, υπεύθυνο για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων τριμυθελαμίνης, λόγω του ότι απαιτείται παραπάνω από 10⁸ cfu/g όσον αφορά τη *Shewanella putrefaciens* για την παραγωγή TMA σε αλλοιωμένα ψάρια. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ανθεκτικό σε 60% CO₂ και ανήκει στην κατηγορία παραγωγής H₂S.

Ο Hansen et al, (2007) εκτίμησαν τις μεταβολές στην ποιότητα, σε φιλέτα μπακαλιάρου ιχθυοκαλλιέργειας (*Gadus morhua* L.) που συντηρήθηκαν σε MAP, πομπούς CO₂ (CO₂-emitters), VP συνθήκες στους 1.3° C. Στα δείγματα τα ποσοστά αερίων στην MAP ατμόσφαιρα ήταν 60% CO₂ και 40% O₂ και περιείχαν πομπούς CO₂, είτε όχι. Η αναλογία g/p για τις ομάδες χωρίς εκπομπές CO₂ ήταν 3/9, ενώ για τις ομάδες με εκπομπές CO₂ 1/3. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός,

χημικός, και οργανοληπτικός έλεγχος μέσα σε διάστημα 25 ημερών. Στη MAP συσκευασία οι υψηλές συγκεντρώσεις O₂ εμπόδισαν τον σχηματισμό της TMA, ενώ στη VP το περιεχόμενο της αυξήθηκε σημαντικά από την 10^η ημέρα και μετά. Η βακτηριακή ανάπτυξη ήταν υψηλότερη στα VP δείγματα απ' ό,τι σε MAP από την 11^η ημέρα αποθήκευσης. Στην VP συσκευασία κυρίαρχος μικροοργανισμός ήταν *Pseudomonas spp.* μετά από την 21^η ημέρα. Στις MAP συσκευασίες, αναλύσεις έδειξαν οξυγαλακτικά βακτήρια και *Carnobacterium*, μετά και την 21^η ημέρα. Στην συγκεκριμένη έρευνα το *P. phosphoreum* δε βρέθηκε σε MAP συσκευασίες. Αυτό πιθανώς οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις O₂. Σε δείγματα MAP με emitters CO₂, ο μικροοργανισμός *P. phosphoreum* βρέθηκε λόγω υψηλών επιπέδων TMA από την 21^η ημέρα και μετά. Η οργανοληπτική ανάλυση παρουσίασε ότι τα VP δείγματα φιλέτων μπακαλιάρου είχαν διάρκεια ζωής μεταξύ 7 και 14 ημερών, ενώ τα “ emitter” και MAP δείγματα μεταξύ 14 και 21 ημερών.

Η επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε μηχανικές ιδιότητες, και μικροβιολογικά, χημικά, και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχει μελετηθεί και στο λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) επίσης. Η Provincial et al, (2010) διατήρησε σε MAP συνθήκες δείγματα φιλέτων λαυρακιού σε τρεις συνδυασμούς αερίων (Α: 40% CO₂ /60% N₂, Β: 50% CO₂ /50%, Γ: 60%/40%) στους 4° C για 21 ημέρες συγκρίνοντάς τα με μάρτυρες διατηρημένους σε αερόβιες συνθήκες στους 0° και 4° C. Εκτιμώντας την απώλεια βάρους διαπιστώθηκε ότι οι μάρτυρες κατά την 14^η μέρα της αποθήκευσης είχαν την μεγαλύτερη τιμή απώλειας, ενώ για MAP δείγματα η αντίστοιχη τιμή κυμαίνονταν μεταξύ 4.2 – 5.0%. Οι τιμές του θειοβαρβιτουρικού οξέος ήταν υψηλότερες στους μάρτυρες, ενώ μεταξύ των δειγμάτων MAP δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ο μικροβιακός πληθυσμός ήταν υψηλότερος στους μάρτυρες και κατόπιν στην Α, την Β, και την Γ ομάδα. Η ομάδα Γ με την υψηλότερη συγκέντρωση CO₂ παρουσίασε μεγαλύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τα δείγματα που συντηρήθηκαν στον αέρα απορρίφθηκαν μετά από 7 ημέρες, ενώ τα δείγματα στις MAP ομάδες την 14^η ημέρα.

3.5 ΥΛΙΚΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Η συσκευασία έχει ως στόχο την διατήρηση της ασφάλειας και ποιότητας του προϊόντος που εσωκλείει από τη στιγμή της διαδικασίας παραγωγής μέχρι και τη στιγμή που θα φτάσει στα χέρια του καταναλωτή. Οι λειτουργίες της έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του προϊόντος από φυσικές, χημικές, και βιολογικές καταστροφές. Απώλεια ακεραιότητας της συσκευασίας μπορεί να οδηγήσει σε μη ασφαλή προϊόντα, λόγω επιμόλυνσης παθογόνων μικροοργανισμών. Τα τελευταία χρόνια τα υλικά συσκευασίας που αναπτύσσονται είναι φιλικά προς το περιβάλλον και ανακυκλώσιμα (Cutter, 2002).

Η MAP συσκευασία αποτελείται από έγκλειστες θήκες μέσα στις οποίες εσωκλείεται το προϊόν – τρόφιμο από πολυμερείς μεμβράνες, μέσα στη οποία τροποποιείται το περιβάλλον της. Κύριοι στόχοι της συσκευασίας είναι η μείωση του ρυθμού αναπνοής, η μείωση απώλειας της υγρασίας και συνεπώς η αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Το πολυαιθυλένιο είναι το συνηθέστερο σε MAP τεχνικές, διότι

παρέχει ερμητικό κλείσιμο της συσκευασίας και προστατεύει από αρνητικές επιπτώσεις της συσκευασίας όπως θολότητα, αποκόλληση κ.α. (Sandhya, 2009). Η MAP όσον αφορά τη συσκευασία, εξαρτάται άμεσα από το πάχος της ταινίας, την περιοχή επιφάνειας, το βάρος του προϊόντος, τον ελεύθερο χώρο εντός της συσκευασίας, και τη θερμοκρασία (Caleb et al, 2012). Για μια επιτυχή συσκευασία συνήθως γίνεται συνδυασμός ταινιών μέσω πλαστικοποίησης ή εξώθησης (Sandhya, 2009).

Η επιλογή των υλικών συσκευασίας που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή MAP είναι σημαντική παράμετρος για την αποτελεσματική χρήση της. Η ποιότητα του προϊόντος σχετίζεται άμεσα με τις ιδιότητες των υλικών. Τα πιο συνήθη υλικά για την MAP είναι οι πολυαμίνες (PA-Polyamide), οι πολυολεφίνες (polyolefins), το πολυαιθυλένιο (PE-polyethylene), το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE-Low-Density Polyethylene), το υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (HDPE-High-Density Polyethylene), το γραμμικό LDPE (linear-LDPE), το πολυπροπυλένιο (OPP-Polypropylene-Oriented Polypropylene), το χλωριούχο πολυβινύλιο (PVC-Polyvinyl Chloride), την αιθυλενο βινυλική αλκοόλη (EVOH-Ethylene Vinyl Alcohol), το οξικό αιθυλενο βινύλιο (EVA-Ethylene Vinyl Acetate), το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET-Polyethylene Terephthalate), το πολυβινυλιδενοχλωρίδιο (PVdC-Polyvinylidene Chloride). Στο κρέας και τα πουλερικά χρησιμοποιείται κυρίως το νάιλον, πολυεστέρες και πολυπροπυλένιο. Επιπλέον, λόγω αυξημένων απαιτήσεων των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια για υλικά φιλικά προς το περιβάλλον, βιοπολυμερή μπορούν να υποκαταστήσουν συνθετικές ταινίες (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012). Παρακάτω δίνεται μία σύντομη περιγραφή των υλικών συσκευασίας.

ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ - POLYAMIDE-PA

Οι πολυαμίνες, κοινώς, νάιλον, έχουν χαμηλή διαπερατότητα υδρατμών, και εφαρμόζονται κυρίως λόγω των χαρακτηριστικών της δύναμης και της ανθεκτικότητας σε σπάσιμο ή σχίσμο της συσκευασίας. Οι ταινίες πολυαμινών είναι θερμοανθεκτικές και εύκαμπτες σε χαμηλές θερμοκρασίες και χαρακτηρίζονται από αντοχή σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012).

ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ - POLYETHYLENE-PE

Πλαστικά υλικά από παράγωγα αιθυλενίου, χαρακτηρίζονται από ελαστικότητα, εύκολη επεξεργασία κατά τη θέρμανση, αντοχή στο κρύο και το φραγμό υδρατμών. Επιπλέον, είναι ανθεκτικά σε οξέα και αλκαλικά αλλά οξειδώνονται με νιτρικό οξύ (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012).

ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ - LDPE

Το συγκεκριμένο υλικό είναι πολύ ανθεκτικό σε αλκαλικά, όξινα, και ανόργανα διαλύματα. Η διαπερατότητά του σε αέρια είναι υψηλή και είναι πολύ ευαίσθητο σε υδρογονάνθρακες, αλογομένους υδρογονάνθρακες, έλαια και λίπη (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012).

ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ – HDPE

Το HDPE υλικό έχει καλύτερες ιδιότητες φραγμού από το LDPE, δεν χρησιμοποιείται όμως για στεγανοποίηση, αλλά ως επικάλυψη πλεγμάτων είτε στην κορυφή της συσκευασίας (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΓΡΑΜΜΙΚΟ LDPE - linear LDPE

Το υλικό LLDPE δίνει αντοχή σε περιβαλλοντικές αντίξοες συνθήκες. Έχει υψηλή δύναμη εφελκυσμού, αντοχή σε σχισίματα. Ωστόσο, η αντιστάσεις του σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες είναι μειονέκτημα κατά την διαδικασία σφραγίσματος (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΠΟΛΥΠΡΟΠΥΛΕΝΙΟ - OPP

Το OPP είναι θερμοπλαστικό και γραμμικό πολυμερές. Χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε MAP συνθήκες αποθήκευσης ως πλαστική θήκη. Χαρακτηρίζεται από δύναμη εφελκυσμού, ανθεκτικότητα στη θερμότητα, και σταθερότητα στο κρύο. Έχει χαμηλή διαπερατότητα υδρατμών, και καλή αντοχή σε λίπη και χημικά (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΠΟΛΥΒΙΝΥΛΙΟ - PVC

Το PVC είναι film – πολυμερές με πολύ χαμηλή διαπερατότητα σε αέρια και μέτρια διαπερατότητα σε υδρατμούς. Είναι πολύ ανθεκτικό σε έλαια και λίπη, και επιπλέον υπάρχει δυνατότητα χρωματισμού και εκτύπωσης (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΑΙΘΥΛΕΝΟΒΙΝΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ - EVOH

Η EVOH μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί όπως το γυαλί και το μέταλλο ως περιέκτης. Παρουσιάζει φραγμό σε οσμές, αέρια και διαλύτες. Χαρακτηρίζεται από ελαστικότητα και θερμική σταθερότητα (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΝΟΒΕΝΥΛΙΟ - EVA

Το EVA υλικό αρκετές φορές σε συνδυασμό με το PVdC έχει εφαρμογή σε VP συσκευασία ως ταινία με πολύ καλές ιδιότητες φραγμού. Επιπλέον, παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το PE (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΤΕΡΕΦΘΑΛΙΚΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ - PET

Το υλικό PET είναι αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση και μπορεί να εφαρμόζεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρατηρείται μέτρια διαπερατότητα οξυγόνου, η οποία μειώνεται όταν καλύπτεται με αλουμίνιο (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

ΠΟΛΥΒΙΝΥΛΙΔΕΝΟΧΛΩΡΙΔΙΟ - PVdC

Το PVdC υλικό είναι ένας συνδυασμός βινυλίου και χλωριούχου βινυλιδενίου. Είναι ανθεκτικό σε λίπη και έλαια και έχει χαμηλή διαπερατότητα σε αέρια και υδρατμούς (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

3.6 ΘΕΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Από τη στιγμή που εμφανίστηκε ενδιαφέρον για την εφαρμογή καινοτόμων τεχνολογιών συσκευασίας, τόσο από την πλευρά των καταναλωτών όσο και από βιομηχανίες τροφίμων, προέκυψαν αρκετά ερωτηματικά όσον αφορά την ασφάλεια τροφίμων και την Δημόσια Υγεία σε τέτοιες τεχνικές (Genigeorgis, 1984).

Ιδιαίτερη ανησυχία παρουσιάζει η πιθανότητα ανάπτυξης του *C. botulinum* και τοξινογένεσης, κυρίως σε αναερόβιες συνθήκες, όπως VP συσκευασία με πλήρη απουσία O₂, αλλά και σε συσκευασία με χαμηλές συγκεντρώσεις του αερίου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας με υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ μειώνουν τον κίνδυνο αλλαντίασης σε νωπό κρέας (βόειο και χοίρειο) και πουλερικά. Οι Enfors και Molin (1978), καθώς και ο Doyle (1983) αναφέρουν ότι όταν η πίεση του CO₂ μέσα στη συσκευασία είναι παραπάνω από 1 atm, τότε όχι μόνον είναι ικανό να αναστείλει τη βλάστηση του βακτηρίου, αλλά και να καθυστερήσει την τοξινογένεση με τον θάνατο του βακτηρίου. Σε ψάρια και στα προϊόντα του, το συγκεκριμένο βακτήριο είναι κυρίαρχο, ψυχροανθεκτικοί τύποι όπως τύπος E, και μη πρωτεολυτικοί τύποι B και F. Τέτοια στελέχη αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 3.3 – 4° C, κάτι που είναι πολύ σημαντικό σε συνθήκες MAP αποθήκευσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι στελέχη τύπου E μπορούν να παράγουν τοξίνη σε ψάρια (σολωμό) σε συνθήκες MAP προτού το προϊόν γίνει μη αποδεκτό οργανοληπτικά. Οι Lee & Solberg, (1983),; Linday (1983), απέδειξαν αύξηση τοξινογένεσης από μη πρωτεολυτικά στελέχη *C. botulinum* σε ψάρια αποθηκευμένα σε CO₂ ατμόσφαιρες, παράλληλα με την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης (Genigeorgis, 1984). Η παρατεταμένη αποθήκευση, μπορεί να αποτελέσει δημόσια απειλή. Η παρουσία σπόρων του βακτηρίου σε νωπά ψάρια, καθώς επίσης και η γεωγραφική τοποθεσία και εποχικότητα αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης και παραγωγής της νευροτοξίνης σε MAP αποθήκευση (Stammen et al, 2009).

Για την MAP συσκευασία αλιευμάτων ο συνδυασμός της γνώσης διαδικασιών χειρισμού και αυστηρός έλεγχος της ποιότητας από τη αλίευση μέχρι και τις πωλήσεις μπορεί να εξασφαλίσει ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα. Με την εφαρμογή ποιοτικών συστημάτων όπως HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points), εντοπίζονται οι πιθανοί κίνδυνοι, αναπτύσσονται διαδικασίες ελέγχου, και λαμβάνονται μέτρα για την μείωση ή εξάλειψή τους.

Καινοτόμες εξελίξεις σε συνδυασμό με την τεχνική MAP, μπορούν να αυξήσουν τον χρόνο ζωής των προϊόντων αυξάνοντας συνάμα και την ασφάλεια. Οι απορροφητές O₂ στην συσκευασία MAP μπορούν να εξασφαλίσουν χαμηλά επίπεδα του αερίου, περιορίζοντας την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών, όταν η συσκευασία είναι

ανεπαρκής. Επιπλέον, η συγκέντρωση του διαλυμένου CO₂ στο προϊόν μπορεί να επιτευχθεί πριν το σφράγισμα της συσκευασίας ή να παραχθεί εντός της συσκευασίας, εξασφαλίζοντας έτσι μικρότερη αναλογία Gas/Product και μικρότερο μέγεθος της συσκευασίας. Οι generators CO₂, χρησιμοποιούν O₂ στην υπερκείμενη φάση της συσκευασίας παράγοντας CO₂ ή επιτρέποντας τον ξηρό πάγο να εξαχνωθεί μέσα σε αναερόβιες συνθήκες (100% CO₂). Η διάλυση του CO₂ πριν τη συσκευασία κάτω από υψηλή πίεση και χαμηλές θερμοκρασίες έχει εφαρμοσθεί σε σολωμό και τυριά με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πρόσθετα συντηρητικά όπως το σορβικό κάλιο σε συνδυασμό με MAP αποθήκευση μπορούν να παρατείνουν την διάρκεια ζωής των αλιευμάτων, καθώς και άλλα φυσικά πρόσθετα αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Περεταίρω έρευνα θα πρέπει να διεξαχθεί για το αν πρόσθετες ουσίες παρουσιάζουν σημαντική παράταση της διάρκειας ζωής (Sivertsvik et al, 2001).

Κύρια προϋπόθεση για όλες τα πλεονέκτημα που προσφέρει η MAP αποθήκευση είναι ο συνεχής έλεγχος της θερμοκρασίας. Υψηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια του διαλυμένου CO₂ στο προϊόν και συνεπώς σε μείωση ή απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης. Αναπόφευκτα, επέρχεται βακτηριακή και ενζυματική δράση με πολλές αβεβαιότητες και ανησυχίες όσον αφορά την ασφάλεια του τροφίμου (Sivertsvik et al, 2001).

ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

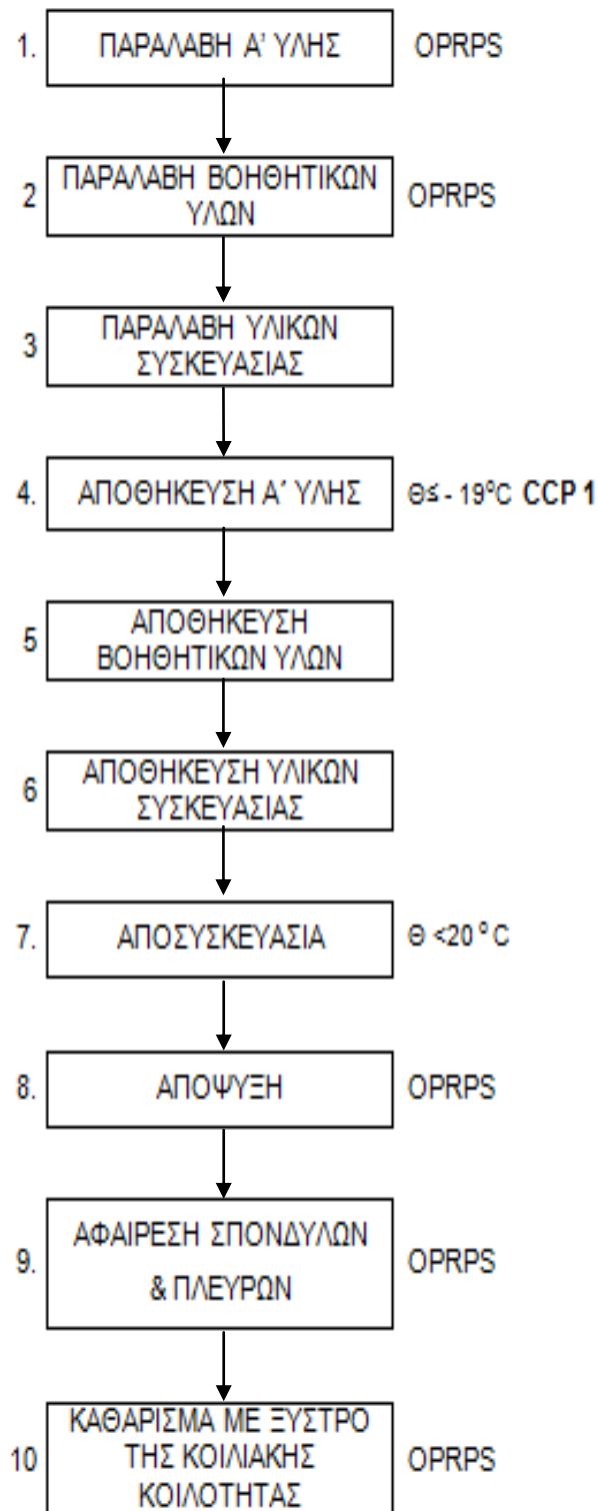
- ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

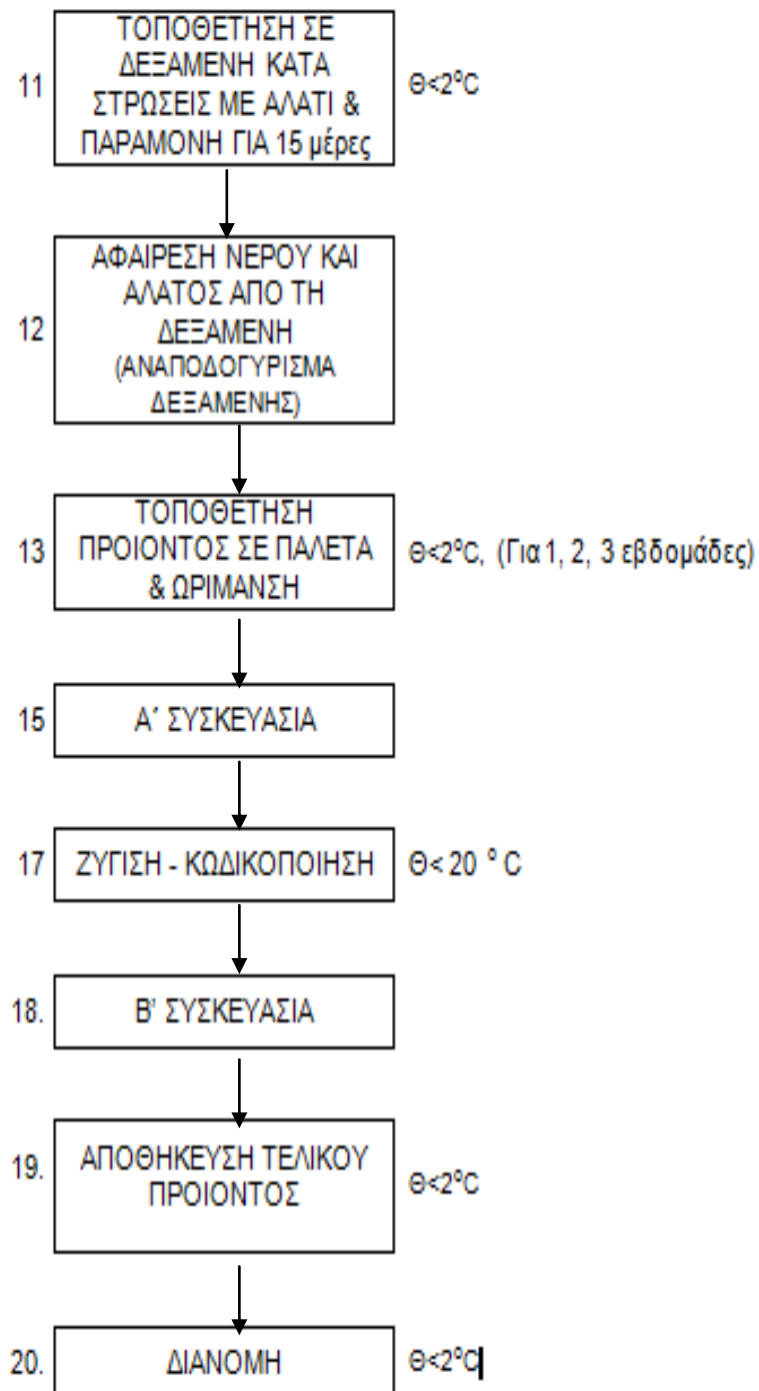
Προϊόν αλίευσης: Μπακαλιάροι (*Gadus morhua*) άνευ κεφαλής block σε χ/κ 27 kg. Η επεξεργασία και κατάψυξη των ψαριών γίνεται επί πλοίου, που φέρει την κατάλληλη γι' αυτό άδεια, αμέσως μετά την αλίευσή του με την τεχνική QF σε θερμοκρασίες $\leq -40^{\circ}\text{C}$.

- ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

Διάγραμμα ροής υγρόλατου μπακαλιάρου





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

Κατόπιν, κόπηκαν υπό άσηπτες συνθήκες σε δείγματα βάρους 100 g το καθένα, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Ekhtiarzadeh et al. (2012). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκαφίδια (16 x 20,5 x 4,8 cm) (UBRT, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passirana di Rho, Italy) και τοποθετήθηκαν 300 g (3 φιλέτα)/σκαφίδιο. Όλα τα δείγματα σφραγίστηκαν σε κλειστική μηχανή (model TSM105 Food tech, Minipack-torre S.p.A., Dalmine, Italy) με πλαστικό φιλμ (OPET, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passirana di Rho, Italy).

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

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

Κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες περιελάμβανε τις εξής 2 παρτίδες δειγμάτων :

- Παρτίδα Α : Συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σύνθεσης 70% CO₂ και 30% N₂ (MAP).
- Παρτίδα Β : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες (AIR).

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της συσκευασίας σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στα δείγματα της Ομάδας Α ενοφθαλμίστηκε *V. parahaemolyticus* σε πληθυσμούς περίπου 4 log cfu/g σάρκας υγρόγαλου μπακαλιάρου, σύμφωνα με τους Ekhtiarzadeh et al. (2012). Πρέπει να επισημανθεί ότι στα δείγματα της ομάδας Β που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του οργανοληπτικού ελέγχου δεν έγινε ενοφθαλμισμός του παθογόνου μικροοργανισμού.

Τέλος, όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε 2 θερμοκρασίες 4 ± 1° C και 10 ± 1° C, για 30 ημέρες.

4.2 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η οργανοληπτική εξέταση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Raju et al. (1997). Συνοπτικά, μια ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών (6 άτομα) εξέταζε τα δείγματα και τα βαθμολογούσε ως προς τη γεύση, την οσμή και τη συνολική αποδοχή. Τα δείγματα για τη γεύση μετά από ξαρμύρισμα σε θερμοκρασία ψύξης, θερμαίνονταν σε φούρνο στους 50 °C για 10 min και στη συνέχεια παρουσιάζονταν στους δοκιμαστές. Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιούνταν κλίμακα από το 1 έως το 9, ως εξής: 9 εξαιρετικά ευχάριστο, 8 πολύ ευχάριστο, 7 ευχάριστο, 6 ελαφρά ευχάριστο, 5 ούτε ευχάριστο ούτε δυσάρεστο, 4 ελαφρά δυσάρεστο, 3 αρκετά δυσάρεστο, 2 πολύ δυσάρεστο και 1 εξαιρετικά δυσάρεστο. Ως όριο αποδοχής ορίστηκε ο βαθμός 5.

Επίσης, κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο εξεταζόταν αρχικά η παρουσία χρωματικών μεταβολών στο προϊόν, όπως ερυθρές ή καφέ κηλίδες καθώς και η ανάπτυξη κολλώδους, δύσοσμης, κιτρινωπής βλέννης. Η παρουσία των ερυθρών κηλίδων ή/και της βλέννης προκαλείται συνήθως από την ανάπτυξη αλόφιλων βακτηρίων (Bjarnason 1986, Oliveira et al. 2012), ενώ οι καφέ κηλίδες είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης ζυμών (Beatty and Fougere 1957).

4.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στα δείγματα των παρτίδων της ομάδας Α, πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές εξετάσεις την ημέρα 0 και στη συνέχεια κάθε 3 ημέρες, για τον προσδιορισμό των του *V. parahaemolyticus*. Επίσης, στην πρώτη ύλη έγινε ανίχνευση για παρουσία *Vibrio* spp, σύμφωνα με τη πρότυπη μέθοδο ISO 21872 – 1 : 2007.

Σε κάθε δειγματοληψία, ποσότητα 25 g σάρκας υγράλατου μπακαλιάρου από κάθε παρτίδα δειγμάτων ζυγίζονταν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher (Seward, Medical, UK) και αραιώνονταν με 225 ml αραιωτικού Maximum Recovery Diluent (MRD – LAB M). Τα δείγματα ομογενοποιούνταν σε συσκευή stomacher (Seward, Medical, UK), για 2 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, μεταφέροντας 1 ml από την αρχική αραιώση σε 9 ml MRD. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω μικροβιολογικών παραμέτρων επιλέχθηκαν οι κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις, γινόνταν δε ενοφθαλμισμός σε διπλά τριβλύα.

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

Ύστερα από επώαση 18 – 24 ωρών στους 37° C, καταμετρούνταν όλες οι σουκρόζη αρνητικές, πράσινου – κυανού χρώματος, λείες αποικίες.

Σε περίπτωση που δεν ανιχνεύονταν πληθυσμοί του παθογόνου στο εκλεκτικό υπόστρωμα (όριο ανίχνευσης 2 log cfu/g), στα δείγματα γίνονταν εμπλουτισμός, όπως περιγράφεται από τους Ekhtiarzadeh et al. (2012).

4.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το τεστ του Bartlett. Στις περιπτώσεις που υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις των επιμέρους χειρισμών σε κάθε χρονικό

διάστημα της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών του Duncan για τη διαπίστωση σημαντικών διαφορών μεταξύ τους.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

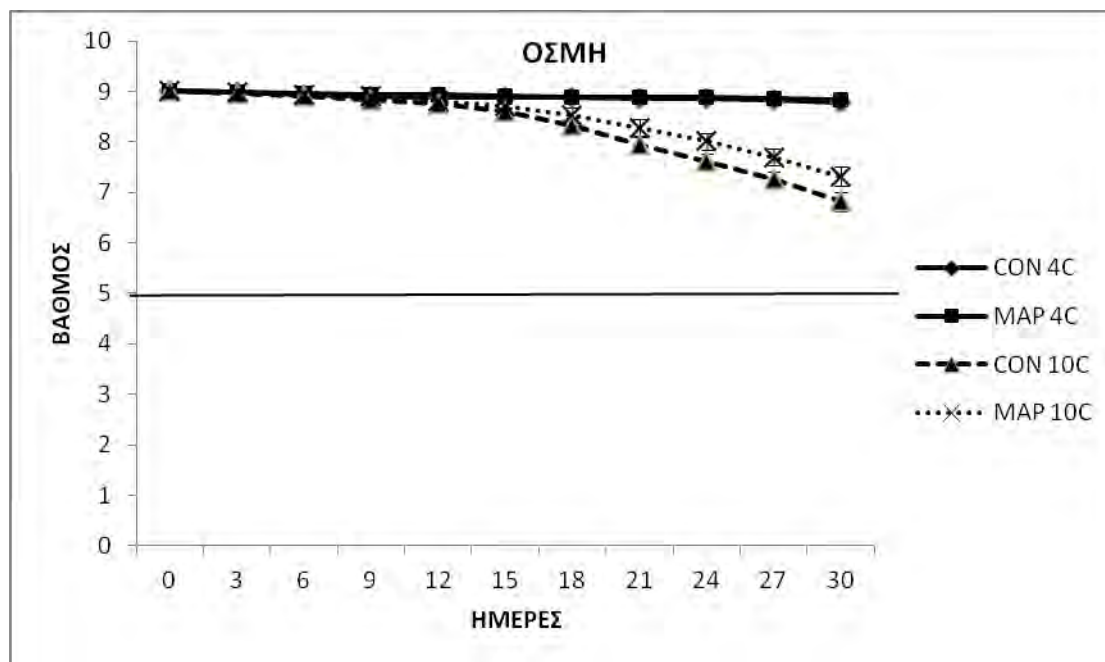
5.1 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου παρουσιάζονται στα σχήματα 1-3. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου, τα δείγματα AIR και MAP παρέμειναν οργανοληπτικά αποδεκτά μέχρι και την 30^η ημέρα συντήρησης τόσο στους 4° C, όσο και στους 10 ° C.

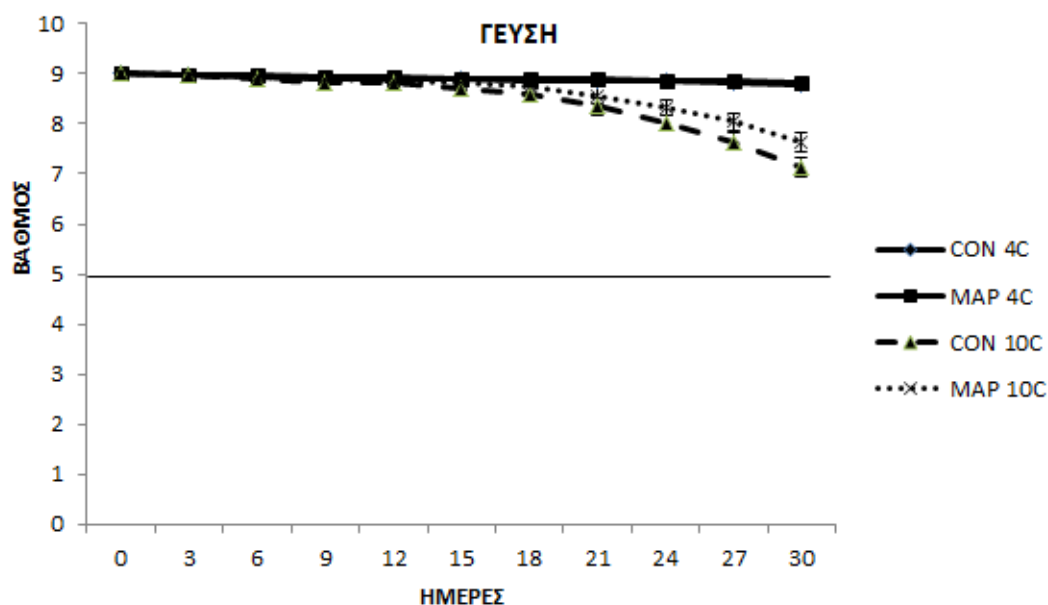
Τα δείγματα AIR και MAP στους 4° C, δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($P>0.05$) μεταξύ τους, ως προς την αξιολόγηση της γεύσης, της οσμής και της συνολικής αποδοχής από τους δοκιμαστές.

Ομοίως στους 10 ° C, η βαθμολογία των δειγμάτων που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες (AIR) δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) από την αντίστοιχη των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) μέχρι και την 21^η ημέρα για την οσμή και τη συνολική αποδοχή, ενώ για τη γεύση μέχρι και την 24^η ημέρα. Στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της διατήρησης (30^η ημέρα) στους 10 ° C, τα δείγματα MAP παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ($P<0.05$) αξιολόγηση από τους δοκιμαστές σε σχέση με τα δείγματα AIR.

Ο υγράλατος μπακαλιάρος, εξαιτίας του ιδιαίτερα χαμηλού ποσοστού υγρασίας (<54%), του χαμηλού συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w 0,72-0,75) και της υψηλής περιεκτικότητας σε NaCl (16-20%), θεωρείται προϊόν εξαιρετικά σταθερό (Huss and Valdimarsson 1990, Rodrigues et al. 2003). Άλλωστε, η διάρκεια ζωής που δίνεται από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.) για τον υγράλατο μπακαλιάρο είναι 10 μήνες κατά τη συντήρηση σε συνθήκες ψύξης.

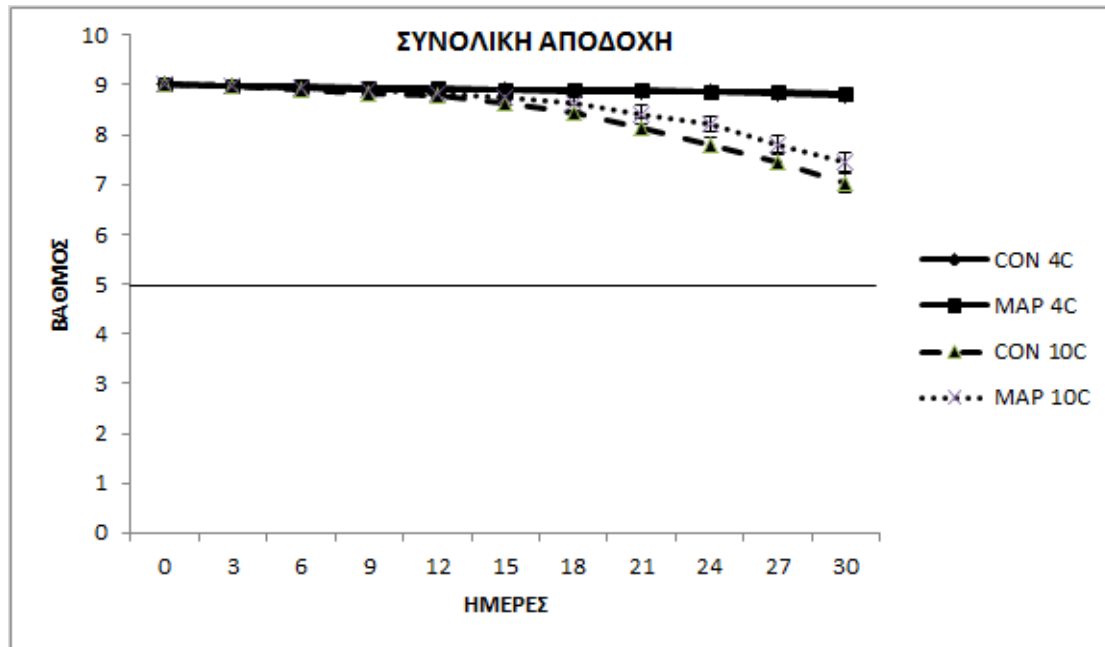


Διάγραμμα 6 : Οργανοληπτική εξέταση της οσμής δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON 4C) ή στους 10° C (CON 10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP 4C) ή στους 10° C (MAP 10C).



Διάγραμμα 7 : Οργανοληπτική εξέταση της γεύσης δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON 4C)

ή στους 10 ° C (CON 10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP 4C) ή στους 10 ° C (MAP 10C).



Διάγραμμα 8 : Οργανοληπτική εξέταση της συνολικής αποδοχής δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4° C (CON 4C) ή στους 10° C (CON 10C) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 4° C (MAP 4 C) ή στους 10° C (MAP 10C).

5.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

V. parahaemolyticus

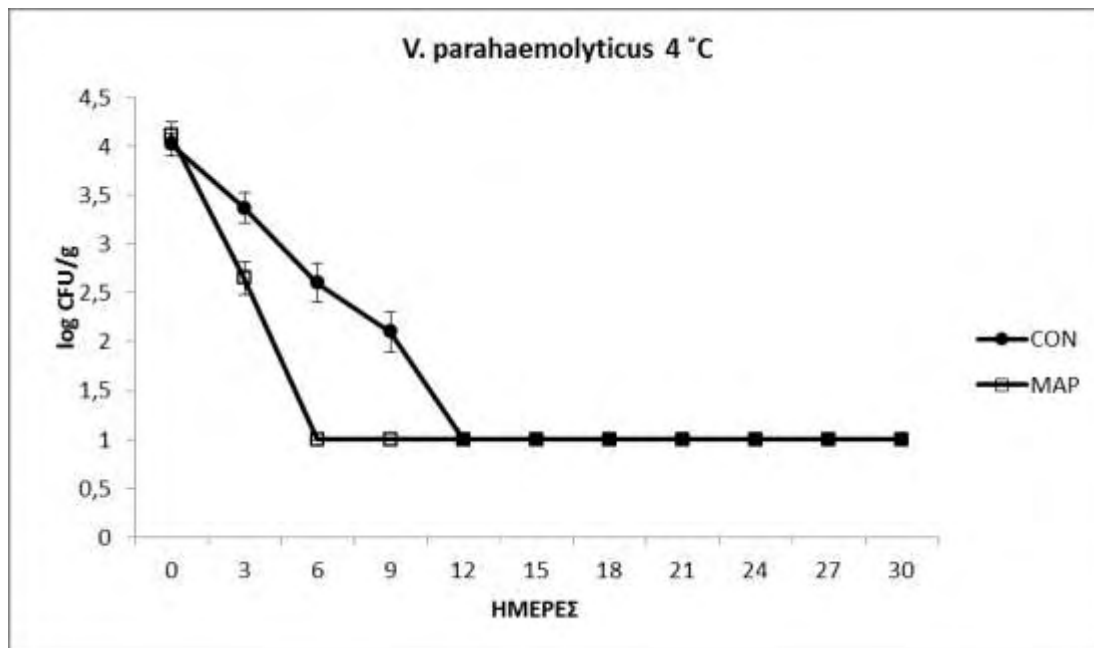
Τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου των δειγμάτων παρουσιάζονται στα σχήματα 4 και 5.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου στα δείγματα AIR, οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* (4 log cfu/g) μειώθηκαν κατά 0,7 log cfu/g την 3^η ημέρα στους 4° C και από την 12^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό. Η υψηλή συγκέντρωση NaCl στον υγράλατο μπακαλιάρο (19-20%) παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά του *V. parahaemolyticus*, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι το παθογόνο είναι ευαίσθητο στη δράση της χαμηλής θερμοκρασίας (Yano et al. 2006).

Στους 10 ° C στα δείγματα σε αερόβιες συνθήκες (AIR), οι αρχικοί πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* μειώθηκαν κατά 0,5 log cfu/g την 3^η ημέρα στους 4° C, έφτασαν τους 2,05 log cfu/g τη 18^η ημέρα και από την 21^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό.

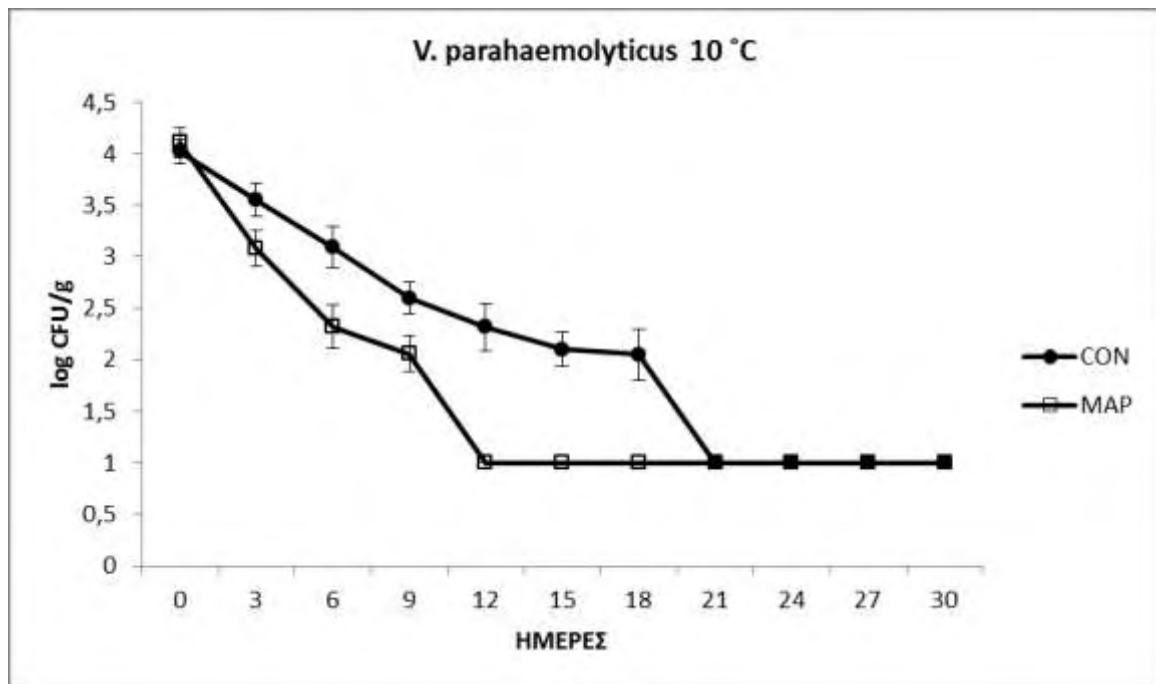
Στα δείγματα MAP στους 4° C, οι αρχικοί πληθυσμοί του παθογόνου μειώθηκαν κατά 1,4 log cfu/g την 3^η ημέρα, στατιστικά σημαντικά ($P<0.05$) χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους πληθυσμούς του *V. parahaemolyticus* στα δείγματα AIR. Από την 6^η ημέρα έως και το τέλος της συντήρησης στην ψύξη το παθογόνο ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό στα δείγματα MAP.

Ομοίως στα δείγματα MAP που συντηρήθηκαν στους 10 ° C, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* μειώθηκαν στους 3,1 log cfu/g την 3^η ημέρα και έφτασαν τους 2,1 log cfu/g την 9^η ημέρα, παραμένοντας σημαντικά ($P<0.05$) χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες (AIR). Από την 12^η ημέρα έως και το τέλος της συντήρησης στην ψύξη, το παθογόνο ανιχνεύονταν μόνο μετά από εμπλουτισμό στα δείγματα MAP.



Διάγραμμα 9 : Πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν στους 4° C υπό αερόβιες συνθήκες (CON) ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου, η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (70% CO₂ και 30% N₂) παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του *V. parahaemolyticus* τόσο στους 4° C, όσο και στους 10 ° C. Σε συμφωνία με τη δική μας μελέτη, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε μελέτη των Provincial et al (2013), μειώθηκαν κατά τη συντήρηση φιλέτων τσιπούρας συσκευασμένων σε TA (CO₂ : 70% - N₂ : 30%), όταν συντηρήθηκαν υπό ψύξη (0 και 4° C).



Διάγραμμα 10 : Πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus* σε δείγματα υγρού μπακαλιάρου τα οποία συντηρήθηκαν στους 10° C υπό αερόβιες συνθήκες (CON) ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το *V. parahaemolyticus*, ως αλόφιλο βακτήριο, μπορεί να επιβιώσει σε δείγματα υγρού μπακαλιάρου που συντηρούνται στην ψύξη με αποτέλεσμα να απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος, ειδικά όταν αυτή γίνεται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

7.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altintzoglou T., Heide M., (2014) «A comparison of French and English Consumers' Expectations Regarding Labeled Cod Fillet Products», **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 23:2 : 155 – 164
2. Alexander K.E., Leavenworth B., Cournane J., Cooper A., Claesson S., Brennan S., Smith G., Rains L., Magness K., Dunn R., Law T.K., Gee R., Bolster W.J., Rosenberg A. A., (2009), «Gulf of Maine cod in 1861:historical analysis of fishery logbooks, with ecosystem implications», **Fish and Fisheries**, 2009, 10, 428 – 449
3. Andres A., Rodriguez-Barona S., Barat J., Fito P., (2004) «Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics», **Journal of Food Engineering**, 69: 467 – 471
4. Arvanitoyannis I., (2012), *Modified Atmosphere and Active Packaging Technologies*, Contemporary Food Engineering Series, pp. 12 – 14
5. Arvanitoyannis I., Bosnea L., (2010) «Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods», **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44: 63 – 76
6. Arvanitoyannis I., Kotsanopoulos K., (2013) «Migration Phenomenon in Food Packaging. Food-Package Interactions, Mechanisms, Types of Migrants, Testing and Relative Legislation- A Review», **Food Bioprocess Technol**, 7: 21 - 36
7. Arvanitoyannis I., Stratakis A., (2012) «Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A review», **Food Bioprocess Technol**, 5: 1423 – 1446
8. Baker – Austin C., Stockley L., Rangdale R., Martinez – Urtazza J., (2010), «Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* : a European perspective», **Environmental Microbiology Rep**, 2 : 7 – 18
9. Bauer A., Østensvik Ø., Florvåg M., Ørmen Ø Rørvik M. (2006), «Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*)», **Applied and Environmental Microbiology**, 72 (4) : 3058 – 3061
10. Beatty S.A., Fougère H., (1957), «The processing of dried salted fish», *Bulletin No. 112*. Ottawa: Fisheries research Board of Canada.
11. Bhowmik S., Pazhani G., Ramamurthy T., (2014), «Phylogenetic and in Silico Functional Analyses of Thermostable – Direct Hemolysin and *tdh*-Related Encoding Genes in *Vibrio parahaemolyticus* and other Gram-Negative Bacteria», **BioMed Research International**, 7 pages
12. Bisha B., Simonson J., Janes M., Bauman K., Goodridge L., (2012), «A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*», **International Journal of Food Science and Technology**; 47: 885–899
13. Bjarnason J., (1986), «Curing of salt fish», 2nd edn (in Icelandic). Reykjavík: Icelandic Fisheries Laboratories.

14. Björnsson B., Steinarsson A., Árnason T., (2007) «*Growth model for Atlantic cod (Gadus morhua): Effects of temperature and body weight on growth rate*», **Aquaculture**, 271: 216 - 226
15. Boonyawantang A., Mahakarnchanakul W., Rachtanapun C., Boonsupthip W., (2012), «*Behavior of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in prawn in response to temperature in laboratory and factory*», **Food Control**, 26: 479 - 485
16. Broberg C.A., Calder T.J., Orth K., (2011) «*Vibrio parahaemolyticus cell biology and pathogenicity determinants*», **Microbes and Infection**, 13: 992 – 1001
17. Caleb J.O., Opara L.U., Witthuhn R.C., (2011) «*Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review*», **Food Bioprocess Technol**, 5: 15 - 30
18. Chiou CS, Hsu SY, Chiou SI, Wang TK, Chao CS (2000), «*Vibrio parahaemolyticus serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999*», **Journal of Clinical Microbiology**, 38 : 4621 – 4625
19. Cutter C.N. (2002) «*Microbial control by packaging: A review*», **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 42 (2) : 151 – 161
20. Daan N., (1973), «*A QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE FOOD INTAKE OF NORTH SEA COD, GADUS MORHUA*», **Netherlands Journal of Sea Research**, 6 (4) : 479 – 517
21. Dalgaard P., Gram L., Huss H., (1993), «*Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum of modified atmospheres*», **International Journal of Food Microbiology**, 19 : 283 – 294
22. Debevere J., Boskou G. (1996), «*Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets*» **International Journal of Food Microbiology** 31 : 221 – 229
23. Devlieghere F., Debevere J. (2000), «*Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria*» **Lebensm.-Wiss. u. -Technol.**, 33, 531 – 537
24. Devlieghere F., Debevere J., Impe J.V., (1998), «*Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of Lactobacillus sake in modified atmospheres*», **International Journal of Food Microbiology**, 41: 231 – 238
25. Di Pinto A., Terio V., Di Pinto P., Colao V. Tantillo G. (2012) «*Detection of Vibrio parahaemolyticus in shellfish using polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay*» **Letters in Applied Microbiology** 54: 494 – 498
26. Drake S, De Paola A, Jaykus L (2007). «*An overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus* », **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 6 : 120 – 144
27. Fernandez-Piquer J., Bowman P. J., Ross T., Tamplin L. M., (2011), «*Predictive Models for the Effect of Storage Temperature on Vibrio parahaemolyticus Viability and Counts of Total Viable Bacteria in Pacific Oysters*», **Applied and Environmental Microbiology**, p. 8687 - 8695
28. Garabal J. I. , Rodriguez-Alonso P., Franco D., Centeno J. A. (2010) «*Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: Effects of storage under vacuum and different modified atmospheres*» **Journal of Dairy Science**, 93 : 1868 – 1881
29. García K., Torres R., Uribe P., Hernandez C., Riosco L., Romero J., Espejo R. (2009), «*Dynamics of Clinical and Environmental Vibrio parahaemolyticus*

- Strains during Seafood-Related Summer Diarrhea Outbreaks in Southern Chile)*», **Applied and Environmental Microbiology**, 75 (23) : 7482 – 7487n
30. Genigeorgis, C. (1985). «*Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish*». **International Journal of Food Microbiology**, 1: 237–251.
 31. Ghaly A.E., Dave D., Budge S., Brooks M.S., (2010), «*Fish Spoilage Mechanisms and Prevention Techniques: Review*», **American Journal of Applied Sciences**, 7 (7) : 859 – 877
 32. Gram L., Huss H., (1996), «*Microbiological spoilage of fish and fish products*» **International Journal of Food Microbiology** 33 121 – 137
 33. Ham H., Orth K., (2012), «*The Role of Type III Secretion System 2 in Vibrio parahaemolyticus Pathogenicity*» **The Journal of Microbiology**, 50 (5) : 719 – 725
 34. Hansen A., Mørkøre T., Rudi K., Olsen E., Ete T., (2007), «*Quality changes during Refrigerated Storage of MA-Packaged Pre-Rigor Fillets of Farmed Atlantic cod (Gadus morhua L.) using Traditional MAP, CO₂ emitter, and Vacuum*», **Food Microbiology and Safety**, vol. 72, Nr. 9, M423 – M430
 35. Honda, T., Chearskul, S., Takeda, Y. Miwatani, T. (1980). «*Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of Vibrio parahaemolyticus*». **Journal of Clinical Microbiology**, 11: 600 – 603.
 36. Horwood J., Brien C., Darby C. (2006), «*North Sea cod recovery ?*», **Journal of Marine Science**, 63: 961 -968
 37. Huss H., (1997), «*Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood*», **Food Control**, Vol. 8, No 2, pp. 91 – 98
 38. Huss H. H., Valdimarsson G., (1990), «*Microbiology of salted fish*». **FAO Fish. Technol. News**, 10 (1), pp. 1 – 2
 39. ISO/TS 21872–1: 2007 «*Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. — Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholera*». **International Organization for Standardization (ISO)**
 40. Jay et al (2005), *Modern Food Microbiology* (Seventh Edition), Food Science Text Series, pp 109 – 120, 354 – 370, 657 – 661.
 41. Kaysner C.A., DePaola A., (2000), «*Outbreaks of Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains*», **J. Shellfish Res.**, 19, 657
 42. Levin R.E. (2006), «*Vibrio parahaemolyticus, a Notably Lethal Human Pathogen Derived from Seafood: A review of its Pathogenicity, Characteristics, Subspecies Characterization, and Molecular Methods of Detection*», **Food Biotechnology** 20: 1, 93 – 128.
 43. Liston J., (1990), «*Microbial hazards of seafood consumption*», **Food Technol.**, 44, p. 56 – 62
 44. Lorentzen G., Breiland M., Ostli J., Wang – Andersen J., Olsen R., (2014), «*Growth of halophilic microorganisms and histamine content in dried salt – cured cod (Gadus morhua L.) stored at elevated temperature*», **Food Science and Technology**, 60: 598 – 602
 45. Macè S., Joffraud J., Cardinal M., Malcheva M., Cornet J., Lalanne V., Chevalier F., Sèrot T., Pilet M., Dousset X., (2013), «*Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (Salmo salar) fillets stored*

- under modified atmosphere packaging*», **International Journal of Food Microbiology**, 160 (2013) p. 227 – 238
46. Macer C.T., Shepherd J.G., (1987), «*The Effect of Species and Fishery Interactions on the Assessment of Some North Sea Gadoids*», **Fisheries Research**, 5: 303 - 317
 47. Martínez-Alvarez O., Borderías A.J., Gómez-Guillén M.C., (2004), «*Sodium replacement in the cod (*Gadus morhua*) muscle salting process*», **Food Chemistry**, 93 (2005) 125 – 133
 48. Martínez-Urtaza J., Bowers JC, Trinanes J., DePaola A., (2010), «*Clinical anomalies and increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses*», **Food Research International**, 43 : 1780 – 1790
 49. Masniyom P., Benjama O., Maneesr J.,(2012), «*Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*)*» **International Journal of Food Science and Technology** , 47 : 1079–1085
 50. McMillin K.W. (2008), «*Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat*», **Meat Science**, 80 : 43–65
 51. Meredith H., Valdramidis V., Rotabakk B.T., Sivertsvik M., McDowell D., (2014), «*Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on *Campylobacter* and the shelf life of chilled poultry fillets*», **Food Microbiology**, 44 (2004) 196 – 203
 52. Miles D., Ross T., Olley J., McMeekin T, (1997), «*Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus**», **International Journal of Food Microbiology**, 38 : 133 – 142
 53. Molenda R. J., Johnson G. W., Fishbein M., Wentz B., Mehlman J.I., Dadisman A. T., (1972), «**Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis in Maryland: Laboratory Aspects*», **Applied Microbiology**, p. 444 – 448
 54. Murua H., (2010), «*THE BIOLOGY AND FISHERIES OF EUROPEAN HAKE, MERLUCCIIUS MERLUCCIIUS, IN THE NORTH – EAST ATLANTIC*», **Advances in Marine Biology**, DOI: 10.1016/S0065-2888(10) 58002-7
 55. Nair GB., Ramamurthy T., Bhattacharya S., Dutta B., Takeda Y., Sack D., (2007), «*Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants*», **Clinical Microbiology Reviews**, 20 (1) : 39, 38 – 48.
 56. Nishibuchi M., Kaper J.B., (1995), «*Mini review. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium*», **Infect. Immun.**, 63, p. 2093 – 2099
 57. Nordstrom J., Vickery L., Blackstone G., Murray S., De Paola A., (2007), «*Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters*», **Applied and Environmental Microbiology**, 73 (18) : 5840 – 5847.
 58. Olafsdottir G., Lauzon H. L., Martinsdottir E., Oehlenschläger J., Kristbergsson K., (2006), «*Evaluation of Shelf Life of Superchilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets and the Influence of Temperature Fluctuations During Storage on Microbial and Chemical Quality Indicators*», **Journal of Food Science**, Vol. 71, Nr. 2, p. S97 – s109

59. Oliveira H., Pedro S., Nunes M., Costa R., Vaz-Pires P., (2012), «*Processing of salted cod (Gadus spp.): A review*», **Institute of Food Technologists**, vol. (2012), p. 546 – 564
60. Park K.S., Ono T., Rokuda M., Jang M.H., Okada K., Lida T., Honda T., (2004), «*Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus**», *Infection and Immunity*, p. 6659 – 6665
61. Pereira de Abreu D., Maroto J., Rodriquez K., Cruz J., (2011), «*Antioxidants from burley husks impregnated in films of low – density polyethylene and their effect over lipid deterioration of frozen cod (Gadus morhua)*», **J Sci Food Agric**, **92**: 427 – 432
62. Phillips A. Carol «*Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce*» **International Journal of Food Science and Technology** 1996; 31 : 463 – 479
63. Provincial L., Gil M., Guillén E., Alonso V., Roncalés P., Beltrán J.A., (2010), «*Effect of modified atmosphere packaging using different CO₂ and N₂ combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets*», **International Journal of Food Science and Technology**, 45, 1828 – 1836
64. Provincial L, Guillén E., Alonso V., Gil M., Roncalés P., Beltrán J. (2013), «*Survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* in sea bream (*Sparus aurata*) fillets packaged under enriched CO₂ modified atmospheres*» **International Journal of Food Microbiology**, 166 : 141 – 147.
65. Raju C.V., Bhaskar N., Dhananjaya S., (1997), «*Development of ready-to-fry crab products*», **Fish Technol.**, 34 (2) : 26 – 30
66. Rodriguez M.J., Ho P., López-Caballero M.E., Vaz-Pires P., Nunes M.L., (2003), «*Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials*», **Food Microbiology**, 20 (2003), p. 471 – 481
67. Rosnes J.T., Kleiberg G.H., Sivertsvik M., Lunestad B.T., (2006), «*Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the shelf-life of Farmed Ready-to-cook Spotted Wolf-fish (*Anarhichas minor*)*», **Packaging Technology and Science**, 19: 325 – 333
68. Sakata J., Kawatsu K., Kawahara R., Kanki M., Iwasaki T., Kumeda Y., Kodama H. (2012), «*Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant thermolabile hemolysin and its application to screen for *Vibrio parahaemolyticus* contamination in raw seafood*», **Food Control**, 23 : 171 – 176
69. Sanchez-Rivera L., Recio I., Ramos M., Gomez-Ruiz J.A., (2013), «*Short Communication: Peptide profiling in cheeses packed using different technologies*», **American Dairy Sch.**, 96: 3551 – 3557
70. Sandhya, (2009), «*Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs*», **Food Science and Technology**, 43: 381 – 392
71. Shelton P., Sinclair A.F., Chouinard G. A., Mohn R., Duplisea D.E., (2006), «*Fishing under low productivity conditions is further delaying recovery of Northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*)*», **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, **63**: 235 – 238
72. Singh P., Wani A.A. Karim A.A., Langowskii H.R. (2012). «*The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review*», **International Journal of Dairy Technology**, 65 (2): 161 – 177

73. Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes T.J (2002), «A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety» **International Journal of Food Science and Technology** 37 : 107 – 127
74. Smith J.P., Ramaswamy H., Simpson B., (1990), «*Developments in food packaging technology. Part II : Storage aspects*», **Trends in Food Science and Technology**, p. 111 – 118
75. Solomakos N., Pexara A., Govaris A. (2012), «*Vibrio parahaemolyticus in seafood – associated outbreaks*», **Journal of Hellenic Veterinary Medicine Society**, 63 (1): 54 – 62
76. Stammen K., Gerdes D., Caporaso F., Martin R. (1990) «*Modified atmosphere packaging of seafood*» **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 29 : 5, 301 – 331
77. Standal D., Hersoug B., (2014), «*Back to square one? Fisheries allocation under pressure*», **Marine Policy**, 43 (2014) 236 – 245
78. Su Yi-Cheng, Liu C. (2007), «*Vibrio parahaemolyticus: A concern of seafood safety*», **Food Microbiology**, 24: 549–558
79. Turner J., Paranjpye R., Landis E., Biryukov S., Gonzalez-Escalona N., Nilsson W., Strom M., (2013), «*Population Structure of Clinical and Environmental Vibrio parahaemolyticus from the Pacific Northwest Coast of the United States*», **PLoS ONE** 8(2) : e55726
80. Vanderzant C., Nickelson., (1971), «*Survival of Vibrio parahaemolyticus in Shrimp Tissue Under Various Environmental Conditions*», **Applied Microbiology**, p. 34 – 37
81. Velasquez-Roman J., Leon-Sicairos N., Flores-Villasenor H., Vilafana-Rauda S., Canizalez-Roman A., (2012), «*Association of Pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 Present in the Coastal Environment of Northwest Mexico with Cases of Recurrent Diarrhea between 2004 and 2010* », **Applied and Environmental Microbiology**, 78 (6) : 1794 – 1803
82. Villemure G., Simard R.E., Picard G., (1986), «*Bulk Storage of Cod fillets and Gutted Cod (Gadus morhua) Under Carbon Dioxide Atmosphere*», **Journal of Food Science**, - 317
83. Yam K., Takhistov P., Miltz J., (2005), «*Intelligent Packaging: Concepts and Applications*», **Institute of Food Technologies**, - Vol. 70, Nr. 1, 2005
84. Yanagihara I., Nakahira K., Yamane T., Kaieda S., Mayanagi K., Hamada D., Fukui T., Ohnishi K., Kajiyama S., Shimizu T., Sato M., Ikegami T., Ikeguschi M., Honda T., Hashimoto H., (2010), «*Structure and Functional Characterization of Vibrio parahaemolyticus Thermostable Direct Hemolysin*», **The Journal of Biological Chemistry**, 21: pp.16267 – 16274
85. Yang L., Zhan L., Han H., Gao H., Guo Z., Qin C., Yang R., Liu X., Zhou D. (2010), «*The low-salt stimulon in Vibrio parahaemolyticus*», **International Journal of Food Microbiology**, 137 : 49–54.
86. Yano Y., Kaneniwa M., Satomi M., Oikawa H., Chen S., (2006), «*Occurrence and density of Vibrio parahaemolyticus in live edible crustaceans from markets in China*», **Journal of Food Protection**, Vol. 69, p. 2742 – 2746

7.2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΤΟ INTERNET

1. <http://www.fao.org/3/a-i3740t.pdf>
2. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_1994334260813071935.xml&outtype=html
3. http://www.fishwatch.gov/seafood_profiles/species/cod/species_pages/atlantic_cod.htm
4. <http://www.fishbase.org/Summary/OrdersSummary.php?Order=Gadiformes>
5. <http://www.fishbase.org/summary/Gadus-morhua.html>
6. <http://www.iucnredlist.org/details/8784/0>
7. <http://www.fishbase.org/Summary/FamilySummary.php?ID=183>
8. http://www.fishwatch.gov/seafood_profiles/species/cod/species_pages/atlantic_cod.htm
9. <http://spo.nmfs.noaa.gov/mfr4111/mfr41112.pdf>
10. <http://www.nefsc.noaa.gov/saw/saw53/crd1203.pdf>
11. <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/6639628/KS-FK-14-001-EN-N.pdf/8d6e9dbe-de89-49f5-8182-f340a320c4bd>
12. http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2013.pdf
13. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8795777010375342770.xml&outtype=html
14. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_2430095506287153600.xml&outtype=html
15. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_1019060920411302260.xml&outtype=html
16. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8223699658118027017.xml&outtype=html
17. <https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>
18. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>
19. <http://www.cdc.gov/vibrio/vibriop.html>
20. <http://www.cdc.gov/foodnet/data/trends/tables/table7.html>
21. <http://www.cdc.gov/features/dsfoodnet2012/figure1.html>
22. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6418a4.htm>
23. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44566/1/9789241548175_eng.pdf