



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΕ
ΥΓΡΑΛΑΤΟ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ
ΞΑΡΜΥΡΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ Α. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ

2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΕ
ΥΓΡΑΛΑΤΟ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ
ΞΑΡΜΥΡΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ Α. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ

2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ (Καθηγητής ΠΘ, επιβλέπων)

ΠΕΞΑΡΑ ΑΝΔΡΕΑΝΑ (Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ)

ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Επίκουρος Καθηγητής ΠΘ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΕ ΥΓΡΑΛΑΤΟ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΞΑΡΜΥΡΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς του *S. aureus* σε φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες (5 °C, 10 °C και 20 °C) που προσομοιάζουν ορθές και μη ορθές θερμοκρασιακές συνθήκες. **Μεθοδολογία:** Φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου μετά την παρασκευή τους χωρίστηκαν σε 3 ομάδες που συντηρήθηκαν αντίστοιχα σε 3 θερμοκρασίες 5 ± 1 °C, 10 ± 1 °C και 20 ± 1 °C για 72 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, βακτηριακού εναιωρήματος *S. aureus* ώστε οι πληθυσμοί του παθογόνου να κυμαίνονται περίπου στους 4 log cfu/g σάρκας. Τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60 και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος των δειγμάτων στις θερμοκρασίες, πραγματοποιούνταν προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των *Enterobacteriaceae* (EB) και του παθογόνου *S. aureus* σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους ISO, όπως και φυσικοχημικός έλεγχος των δειγμάτων για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς τους σε NaCl, a_w και pH. **Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα του φυσικοχημικού ελέγχου των δειγμάτων στο τέλος της διαδικασίας ξαρμυρίσματος (72 h) και στις 3 θερμοκρασίες (5 °C, 10 °C και 20 °C) η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 1,9 %, το a_w 0,975 και το pH 6,88. Η μικροβιολογική εξέταση έδειξε ότι οι αρχικοί πληθυσμοί για την OMX εμφάνισαν ανάπτυξη φτάνοντας στους 6,7, 7,4 και 8,1 log cfu/g στις 72 ώρες στους 5 °C, 10 °C και 20 °C, αντίστοιχα. Ομοίως, οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων στα δείγματα στους 5 °C βρισκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 2,89, τους 3,62 και 4,6 log cfu/g την 72^η ώρα στους 5 °C, 10 °C και 20 °C, αντίστοιχα. Τέλος, οι αρχικοί πληθυσμοί για το *S. aureus* (4,1 log cfu/g) παρουσίασαν μικρή μείωση στους 5 °C φτάνοντας στους 4,06 log cfu/g στις 72 ώρες. Για τα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 20 °C οι πληθυσμοί του *S. aureus* παρουσίασαν αύξηση και έφτασαν τους 7,9 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ($P < 0,05$) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 °C. **Συμπεράσματα:** Συνεπώς, ο υγράλατος μπακαλιάρος πρέπει να εξετάζεται σε επίπεδο πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος για την παρουσία και τον πληθυσμό του *S. aureus*, ενώ σε επίπεδο λιανικής πώλησης πρέπει να γίνεται ενημέρωση του καταναλωτή για την ορθή διαδικασία ξαρμυρίσματος σε θερμοκρασία ψύξης.

Ευάγγελος Τριανταφύλλου, Ιανουάριος 2016

Λέξεις-Κλειδιά: Υγράλατος μπακαλιάρος, ξαρμύρισμα, υγιεινή, *Staphylococcus Aureus*.

ABSTRACT

BEHAVIOUR OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS DURING COD (GADUS MORHUA) DESALTING AT DIFFERENT TEMPERATURES

Purpose: Aim of this work was to study the behaviour of *S. aureus* in wet salted cod during desalting process at various temperatures (5 °C, 10 °C and 20 °C). **Methodology:** Fillets of wet salted cod after preparation were divided into 3 groups and were stored at 3 temperatures of 5 ± 1 °C, 10 ± 1 °C and 20 ± 1 °C for 72 hours. All samples were then inoculated with inocula of *S. aureus* (ca 4 log cfu/g). Microbiological analysis of samples for populations of Total Viable Counts (TVC), *Enterobacteriaceae* (EB) and *S. aureus* was carried out at 12 hours intervals up to the 72th hour of refrigerated storage. **Results:** The results showed that populations for TVC at the end of storage increased to 6,7, 7,4 and 8,1 log cfu/g at 5 °C, 10 °C and 20 °C, respectively. Similarly, at the end of storage populations of *Enterobacteriae* reached 2,89, 3,62 and 4,6 log cfu/g at 5 °C, 10 °C and 20 °C, respectively. Finally, initial populations of *S. aureus* (4,1 log cfu/g) at 5 °C were not different by the end of storage. For samples desalted at 20 °C, populations of the pathogen increased from 24 h and reached ca 7,9 log cfu/g at 72 h, remaining significantly higher ($P < 0,05$) than populations of the samples desalted at 10 °C. **Conclusions:** Therefore, wet salted cod should be considered in the raw material and finished product level for the presence and population with *S. aureus*, while at the retail level should be consumer information for the proper removal of salt procedure refrigerated.

Evangelos Triantafyllou, January 2016

Keywords: wet-salted cod, desalting, safety Staphylococcus Aureus.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ.....	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	ii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	iii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	iv
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	0
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	3
STARHYLOCOCCUS AUREUS: ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	3
1.1. Το βακτήριο <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2. Ανάπτυξη	3
1.3. Επιβίωση.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	5
Ο STARHYLOCOCCUS AUREUS ΣΤΑ ΖΩΑ	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	7
Ο STARHYLOCOCCUS AUREUS ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	7
3.1. Ανθρώπινη λοίμωξη από σταφυλόκοκκο	7
3.2. Ένζυμα και τοξίνες του <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Κεφάλαιο 4 ^ο	12
Ο STARHYLOCOCCUS AUREUS στα τρόφιμα	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	16
Ο STARHYLOCOCCUS AUREUS ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥΣ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	19
Ο ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο	20
Η ΑΛΑΤΙΣΗ ΣΤΟΝ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟ	20
7.1. Έγχυση Άλμης.....	21
7.2. Εμβάπτιση σε άλμη (Brining)	22
7.3. Υγρή αλάτιση (Pickling).....	22
7.4. Ξηρή αλάτιση	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο	24
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	24
8.1. Προετοιμασία για αλάτιση	25
8.2. Αλάτιση	25
8.3. Ξήρανση	26
8.4. Διατήρηση.....	27
8.5. Αφαλάτωση	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ^ο	31
Ο STARHYLOCOCCUS AUREUS ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

*Στον πατέρα μου
Στη μητέρα μου
Στην αδερφή μου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, προπτυχιακά και μεταπτυχιακά, κ Αλέξανδρο Γκόβαρη, Καθηγητή – Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την προτροπή να συνεχίσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές στο συγκεκριμένο αντικείμενο καθώς και για την ευκαιρία να καταπιαστώ πειραματικά με ένα τόσο σημαντικό θέμα από πλευράς Δημόσιας Υγείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Σολωμάκο Νικόλαο (Επίκουρο Καθηγητή ΠΘ) για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς επίσης και την κα. Πεξάρá Ανδρεάνα (Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ) για την καθοδήγησή της κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Αριστείδη και Βασιλική, και την αδερφή μου, Ευπραξία, για την οικονομική και ψυχολογική τους στήριξη, ώστε να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα Ι. Ταυτοποιημένα τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί για επιβεβαιωμένα κρούσματα σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης–στην Ευρωπαϊκή Ένωση μεταξύ των ετών 2006 και 2010 (δεδομένα από EFSA, 2007, 2009a, 2010, 2011, 2012).	Σελ. 13
---	----------------

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας I. Δημοσιευμένες εξάρσεις κρουσμάτων σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης.	Σελ. 15
Πίνακας II. Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση ως κριτήρια υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία στα αλιευτικά προϊόντα [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005].	Σελ. 18

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ψάρια αποτελούν πολύ συχνή επιλογή των καταναλωτών λόγω των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, της διατροφικής τους αξίας και της εύκολης πέψης τους. Αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές πηγές πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων σημαντικών για τη διατροφή του ανθρώπου (Andrew, 2001). Ωστόσο, τα ψάρια είναι από τα πιο ευαλοίωτα τρόφιμα. Θα πρέπει να υφίστανται προσεκτικό χειρισμό, να ελέγχονται οι συνθήκες διατήρησης τους και να διατίθενται προς κατανάλωση το δυνατόν συντομότερα. Έχει εκτιμηθεί ότι το 30% των ψαριών χάνεται λόγω μικροβιακής αλλοίωσης (Huis in tVeld, 1996). Κατά τον χειρισμό και την επεξεργασία των ψαριών θα πρέπει να τηρούνται οι κανόνες υγιεινής. Η μη τήρηση των κανόνων αυτών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μόλυνση του προϊόντος και κατ' επέκταση την πρόκληση ασθενειών στους καταναλωτές. Αν και η ασφάλεια των τροφίμων έχει αυξηθεί σημαντικά, παρόλα αυτά κρούσματα τροφιμογενών νοσημάτων που οφείλονται σε μικροοργανισμούς, χημικές ουσίες και τοξίνες λόγω της κατανάλωσης ψαριών είναι ακόμα συχνά φαινόμενα σε πολλές χώρες (WHO, 2007).

Επειδή τα ψάρια είναι ιδιαίτερα ευαλοίωτα τρόφιμα διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας έχουν αναπτυχθεί για να παρατείνουν το χρόνο συντήρησής τους. Η ξήρανση και η επεξεργασία με αλάτι των ψαριών χρησιμοποιείται ως μέθοδος συντήρησης από την αρχαιότητα προκειμένου να επιτευχθεί η συντήρηση και η σταθερότητα του προϊόντος, για μήνες ή ακόμα και χρόνια στις σωστές συνθήκες. Ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*) είναι ένα από τα ψάρια τα οποία πολύ συχνά υφίσταται ξήρανση και επεξεργασία με αλάτι και διακινείται ως υγράλατος μπακαλιάρος. Το τελικό προϊόν έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι 160–200 g/kg (Oliveira et al., 2012). Πολλές φορές, όμως ο μπακαλιάρος που έχει υποστεί ξήρανση και αλάτιση πωλείται χωρίς να πληρούνται οι συνθήκες συντήρησής του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, κάποια προϊόντα υγράλατου μπακαλιάρου να παρουσιάζουν προβλήματα στην ποιότητά τους και την ασφάλειά τους λόγω της παρουσίας μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη μικροοργανισμών στα αλατισμένα ψάρια επηρεάζεται σημαντικά από την ενεργότητα νερού του προϊόντος. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων και η χαμηλή συγκέντρωση νερού ωστόσο δεν αποκλείει την παρουσία αλόφιλων βακτηρίων. Η παρουσία και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών πιθανώς σχετίζεται με της μεθόδους αλάτισής τους, γεγονός που υπογραμμίζει την σημαντικότητα της τήρησης των σωστών συνθηκών για τη διατήρηση της ποιότητας και ασφάλειας του προϊόντος (Oliveira et al., 2012).

Επιπλέον λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι πριν την κατανάλωση του υγράλατου μπακαλιάρου απαιτείται η διαδικασία του ξαμυρίσματος (Oliveira et al., 2012). Η διαδικασία αυτή γίνεται συνήθως σε οικιακό επίπεδο με τη χρήση νερού βρύσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η διαδικασία του ξαμυρίσματος είναι χρονοβόρος (μπορεί να διαρκέσει μέχρι 72 ώρες) και όταν δε γίνεται σε θερμοκρασίες ψύξης μπορεί να επιτραπεί η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (>10%), όπως ο *Staphylococcus aureus* και το *Vibrio parahaemolyticus* (Munoz et al., 2010).

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια (EFSA, 2010; Le-Loir et al., 2003). Ανήκει στο γένος *Staphylococcus*, που είναι κατά Gram-θετικοί κόκκοι που αρχικά αποικίζουν στο δέρμα και τη ρινική κοιλότητα των ζώων και του ανθρώπου. Τα βακτήρια αυτά επιβιώνουν στο περιβάλλον και μπορεί να απομονωθούν και από άλλες πηγές με τις οποίες μπορεί να έρθει σε επαφή ο άνθρωπος ή το ζώο. Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση είναι ένα από τα πιο συχνά αίτια τροφιμογενούς νόσου. Είναι μια τοξίνωση που προκαλείται από την πρόσληψη με τα τρόφιμα μίας ή περισσότερων προσχηματισμένων σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι πρωτεΐνες που παράγονται από ορισμένα είδη σταφυλόκοκκων τόσο στο περιβάλλον όσο και στα τρόφιμα. Παρόλο που διάφορα είδη σταφυλόκοκκου μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενείς τοξινώσεις, σχεδόν όλα τα περιστατικά αποδίδονται στο *S. aureus* (Pexara et al, 2010). Ιδιαίτερη σημασία για την πρόκληση τροφιμογενούς τοξίνωσης έχει η ικανότητα του *S. aureus* να επιβιώνει αλλά και να αναπτύσσεται σε χαμηλές τιμές του συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) και σε υψηλή συγκέντρωση αλατιού, γεγονός που του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, ιδιαίτερα τροφίμων επεξεργασμένων με αλάτι. Έχει παρατηρηθεί ότι το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για πολλές εβδομάδες, σε ψάρια που έχουν υποστεί κατεργασία με αλάτι, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει πολλά προβλήματα στους καταναλωτές των προϊόντων αυτών (Huss & Valdimarsson, 1990).

Τις τελευταίες δεκαετίες η σταφυλοκοκκική τοξίνωση αναφέρεται ως τρίτη αιτία μεταξύ των ασθενειών τροφιμογενούς αιτιολογίας παγκοσμίως (Boerema et al., 2006). Το 2009 293 τροφιμογενείς επιδημίες στην ΕΕ αποδόθηκαν σε *Staphylococcus* spp. όπου 2.671 άνθρωποι νόσησαν, 303 νοσηλεύτηκαν ενώ καταγράφηκαν και 3 θάνατοι. Το 30 % των επιδημιών αυτών επαληθεύτηκαν (EFSA, 2011). Θεωρείται ότι πρόσληψη με τα τρόφιμα 20 ng έως 1 μg SE επαρκεί για την εκδήλωση συμπτωμάτων στον άνθρωπο. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες (1-6 ώρες) μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου και περιλαμβάνουν ναυτία, έντονο κοιλιακό άλγος και χαρακτηριστικό έμετο. Συνήθως τα συμπτώματα υποχωρούν μέσα σε 24-48 ώρες, ενώ θάνατοι παρατηρούνται σπάνια, κυρίως σε βρέφη, ηλικιωμένους και άρρωστα, εξασθενημένα άτομα (Le Loir et al., 2003).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συμπεριφοράς του *S. aureus* σε φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου κατά τη διαδικασία του ξαμυρίσματος σε διάφορες θερμοκρασίες (4 °C, 10 °C και 20 °C) που προσομοιάζουν τις ιδανικές και μη ορθές θερμοκρασιακές συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1.1. Το βακτήριο *Staphylococcus aureus*

Το γένος των σταφυλόκοκκων υπάρχει τα τελευταία 120 χρόνια. Νέα είδη συνεχώς ανακαλύπτονται και τα παλαιότερα είτε συγχωνεύονται είτε μετακινούνται σε άλλα γένη. Συγκεκριμένα το γένος των σταφυλόκοκκων ανήκει στο ίδιο γένος με τους Μικρόκοκκους από το 1948 (Hucker, 1948), ενώ λίγο αργότερα αποτέλεσε και πάλι ξεχωριστό γένος (Breed et al., 1957). Το όνομα *Staphylococcus*, υποδηλώνει στα λατινικά το σχήμα σταφυλιού που εμφανίζει, ήταν εφεύρεση του Sir Alexander Ogston (1882) που ήταν και το πρώτο άτομο που περιέγραψε το είδος που σήμερα είναι γνωστό ως *Staphylococcus aureus* (Ogston 1880). Παρόλα αυτά, το επίσημο όνομα του γένους *Staphylococcus* καθώς και αυτό του συγκεκριμένου είδους *S. aureus*, προέκυψε μετά την απομόνωση και καλλιέργεια τους από τον F. G. Rosenbach (Rosenbach, 1884).

Το γένος *Staphylococcus* είναι ένα γένος κατά Gram-θετικών βακτηρίων και ανήκει στην ομάδα των *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (Kloos, 1997), ενώ είναι συγγενικό με τα γένη *Enterococcus*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Planococcus*, *Brocothrix*, και *Listeria* (Kloos, 1997). Το 1997, το γένος *Staphylococcus* αποτελούνταν επίσημα από 32 είδη, 13 εκ των οποίων υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό, με τον *S. aureus* να είναι ένα από τα είδη αυτά (Kloos, 1997). Επίσης, στον ανθρώπινο οργανισμό συναντάται ο *S. epidermidis* που περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που αποικίζουν το δέρμα του ανθρώπου (όπως είναι οι *S. warneri*, *S. hominis*, και *S. capitis*) και ο *S. saprophyticus* που περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που επίσης αποικίζουν το δέρμα αλλά και μικροοργανισμούς που είναι σημαντικοί για την βιομηχανία τροφίμων (όπως είναι οι *S. xylosus* και *S. saprophyticus*).

Ο *S. aureus* είναι ένα κατά Gram θετικό βακτήριο το οποίο έχει διάμετρο 0,5-1,0 μm, και εμφανίζεται με τη μορφή μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων αθροισμάτων (Schleifer and Bell, 2009). Πρόκειται για ένα προαιρετικά αναερόβιο οργανισμό, καθώς δεν είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου για την ανάπτυξή του αλλά ο ρυθμός ανάπτυξής του είναι μικρότερος σε αυτές τις συνθήκες. Μακροσκοπικά, ο *S. aureus* σε άγαρ σχηματίζει αποικίες διαμέτρου 6-8 mm, κυκλικές και λείες, διάφανες, με ορατά όρια, και ο χρωματισμός των αποικιών αυτό ποικίλλει. Η πλειοψηφία των στελεχών του σταφυλόκοκκου είναι θετικά για την παραγωγή καταλάσης.

Αν δεν σχηματίζει ενδοσπόρια, παρουσιάζει αρκετά υψηλά ποσοστά επιβίωσης ακόμα και όταν εκτίθενται σε συνθήκες απαγορευτικές για την ανάπτυξή τους όπως η χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w), τα υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας και η ξήρανση μέσω αέρα (Whiting et al., 1996; Potts, 1994; Lambert et al., 1998).

1.2. Ανάπτυξη

Αναφορικά με την θερμοκρασία ανάπτυξής του, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών που κυμαίνεται από 7 έως 48°C, με βέλτιστη θερμοκρασία αυτή των 37°C. Η μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το pH, η παρουσία ή απουσία οξυγόνου, η ενεργότητα νερού, η συγκέντρωση NaCl. Σε ότι αφορά το pH, η ανάπτυξη του *S. aureus* λαμβάνει χώρα σε εύρος pH που κυμαίνεται από 4,0 μέχρι 10,0 με βέλτιστο το 6–7 ενώ έχει παρατηρηθεί αναστολή της ανάπτυξής του παρουσία 0,1% οξικού οξέος (pH 5,1). Ο *S. aureus* είναι ένας προαιρετικά αερόβιος μικροοργανισμός καθώς αν και αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία οξυγόνου, ωστόσο έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί και αναερόβια. Αναφορικά με την συγκέντρωση NaCl το βακτήριο χαρακτηρίζεται ως αλόφιλο αφού μπορεί και αναπτύσσεται σε συγκέντρωση NaCl 7-10% ενώ σε κάποια στελέχη παρατηρείται ανάπτυξη και σε συγκέντρωση 20%. Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε εύρος ενεργότητας νερού (a_w) από 0,83 μέχρι και μεγαλύτερης του 0,99 (FDA, 2012).

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl καθώς η προσθήκη 4% NaCl φάνηκε να αυξάνει την τιμή αυτή. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του βακτηρίου σε τιμή pH 4,3, a_w 0,85 και θερμοκρασία 8°C αλλά ούτε και σε συνδυασμό pH<5,5, a_w 0,90 ή 0,93 και θερμοκρασία 12°C καθώς και pH<4,9, a_w 0,96 και θερμοκρασία 12°C, γεγονός που καταδεικνύει την συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών (Notermans et al., 1983).

Ο *S. aureus* είναι αρκετά ευαίσθητος στον μικροβιακό ανταγωνισμό. Ανταγωνιστικά βακτήρια κατά της ανάπτυξης *S. aureus* είναι πολλά βακτηριακά είδη, όπως *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *S. epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* και εντερόκοκκοι (Mossel, 1975).

1.3. Επιβίωση

Συνήθως ο *S. aureus* καταστρέφεται κατά τη διαδικασία της παστερίωσης ή κατά το μαγείρεμα. Οι τιμές D στους 60°C ποικίλουν από 2 έως 50 min, αναλόγως του τροφίμου. Έχει παρατηρηθεί ότι ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος pH 7,2 με τιμή D_{140°F} = 0,11 min, αλλά παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε γάλα σε pH 6,9 με τιμή D_{140°F} = 10,0 min. Παράλληλα, θέρμανση σε θερμοκρασία 71,1°C βρέθηκε να είναι καταστροφική για τα περισσότερα στελέχη του *S. aureus* σε αλλαντικά τύπου Φρανκφούρτης (Palumbo et al., 1977). Εν αντιθέσει με άλλα μη σπορογόνα βακτήρια, όπως είναι η *Salmonella* και το *E. coli*, ο μικροοργανισμός είναι ανθεκτικός στην ιονίζουσα αλλά όχι στην υπεριώδη ακτινοβολία με τιμές D 0,45 kGy. Το γεγονός ότι ο *S. aureus* είναι ανθεκτικό στο ωσμωτικό στρες διαφόρων υγροσκοπικών αλλά και σε συνθήκες ξήρανσης (Beard-Pegler et al., 1988; Wilkinson, 1997), συμβάλλει σίγουρα στην ικανότητα επιβίωσής του στον αέρα, στην σκόνη και στο έδαφος από όπου και απομονώνεται συχνά (Kloos, 1997).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Ο *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΤΑ ΖΩΑ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο *S. aureus* μπορεί να απομονωθεί και από ζώα είτε ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας τους είτε ως παράγοντας λοίμωξης. Κατά κύριο λόγο ο μικροοργανισμός αυτός, όπως και στον άνθρωπο, παρατηρείται στη ρινική κοιλότητα των ζώων. Η ικανότητα του *S. aureus* να προκαλεί ασθένειες σε ζώα οφείλεται στην πληθώρα των μολυσματικών παραγόντων που αυτό διαθέτει, κυρίως στην δράση τοξινών (Peacock et al., 2002).

Η παρουσία του εν λόγω βακτηρίου στα ζώα είναι μεγάλης σημασίας καθώς μπορεί να αναδεικνύει πιθανούς φορείς του *S. aureus* και ως εκ τούτου η επαφή του ατόμου με τέτοιο ζώο μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για τον άνθρωπο. Γενικά τα στελέχη του *S. aureus* που μολύνουν τον άνθρωπο παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά που μολύνουν τα ζώα. Όπως και στον άνθρωπο, η κακή κατάσταση του δέρματος του ζώου ευνοεί τον εποικισμό του σταφυλόκοκκου.

Ο *S. aureus* μπορεί να παρατηρηθεί σε μεγάλες συχνότητες στο δέρμα και στη βλεννογόνο των ζώων συντροφιάς προκαλώντας μεγάλο εύρος ασθενειών όπως επιφανειακές δερματικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού, αναπνευστικού και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει ακόμα και σοβαρές ασθένειες (Weese et al., 2011). Παρόμοιες αναφορές πραγματοποιήθηκαν παγκοσμίως και ανέφεραν την μόλυνση σκύλων, γάτων, αλόγων και κουνελιών. Τα τελευταία όμως χρόνια έχει παρατηρηθεί μια έξαρση των κρουσμάτων λοίμωξης με σταφυλόκοκκο στα ζώα συντροφιάς και κυρίως με ένα στέλεχος *S. aureus* που παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό (MRSA). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε κατά κύριο λόγο σε χώρες όπου υπάρχει αντίστοιχη αύξηση κρουσμάτων λοίμωξης με MRSA σε ανθρώπους. Σε ότι αφορά τα άλογα και τις λοιμώξεις που μπορεί να προκληθούν από το *S. aureus* αυτές περιλαμβάνουν λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, βακτηριαμία, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα, λοιμώξεις που σχετίζονται με κάποιο εμφύτευμα, μητρίτιδα, ομφαλίτιδα, και πνευμονία.

Στα βοοειδή ο *S. aureus* κυρίως προκαλεί μαστίτιδα και στη συνέχεια μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Λοίμωξη από *S. aureus* είναι η πιο γνωστή αιτία μαστίτιδας στα βοοειδή, μια ασθένειας με τεράστια οικονομική σημασία παγκοσμίως (Beck et al., 1992). Τα εν λόγω βακτήρια βρίσκονται στους μαστούς των μολυσμένων αγελάδων και η λοίμωξη εξαπλώνεται κατά το άρμεγμα όταν γάλα που έχει μολυνθεί με *S. aureus* από ένα μολυσμένο αδένά έρθει σε επαφή με αδένά που δεν έχει μολυνθεί, με αποτέλεσμα τα βακτήρια να εισέρχονται στον οργανισμό.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό των ζώων που έχουν μολυνθεί από *S. aureus* ανέρχεται στο 3% (Schukken et al., 2009). Παρόλα αυτά, οι λοιμώξεις με *S. aureus* αποτελούν το 10-12% όλων των περιστατικών με μαστίτιδα (Tenhagen et al., 2009). Κατά τη διάρκεια των ετών 1978-1980, συλλέχθηκαν 27.000 δείγματα γάλακτος από 28 φάρμες. Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών έδειξαν ότι 10% των αγελάδων είχαν μολυνθεί από *S. aureus* (Schaeffler et al., 1984).

Στους χοίρους έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση τα τελευταία χρόνια της εμφάνισης του στελέχους του *S. aureus* που εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη και κυρίως ενός συγκεκριμένου υποτύπου. Κατά τη διάρκεια ενός κρούσματος εξιδρωματικής επιδερμίτιδας (ασθένειας που συνήθως οφείλεται σε μόλυνση από το *Staphylococcus hyicus*) σε χοίρους στην Δανία, μετά από αποτυχημένη θεραπεία με κεφαλοσπορίνες και άλλα αντιβιοτικά, βρέθηκε ότι η αιτία της λοίμωξης ήταν το MRSA. Μελέτες έχουν δείξει υψηλό ποσοστό εποικισμού των χοίρων με σταφυλόκοκκο (23%) το οποίο βρέθηκε να είναι 700 φορές μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ποσοστό που παρατηρείται στον γενικό πληθυσμό (Voss et al., 2005). Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν τον εποικισμό του βακτηρίου στους χοίρους, οι λοιμώξεις από *S. aureus* είναι σχετικά σπάνιες. Η εξιδρωματική επιδερμίτιδα (Bos et al., 2007), λοιμώξεις του δέρματος, λοιμώξεις του ουροποιητικού, μαστίτιδα και μητρίτιδα έχουν αναφερθεί σε χοίρους (Schwarz et al., 2008).

Λοιμώξεις από *S. aureus* έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση των πουλερικών (Nemati et al., 2008), αν και είναι σχετικά λίγες. Σε μια μελέτη, αναφέρθηκε η απομόνωση του στελέχους MRSA από μερικά κοτόπουλα (Lee, 2006). Λοιμώξεις των μαλακών ιστών και σηπτική αρθρίτιδα έχουν αναφερθεί σε πουλερικά (Lee, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Ο *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

3.1. Ανθρώπινη λοίμωξη από σταφυλόκοκκο

Ο *S. aureus* έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Αν και συνήθως είναι μία από τις κύριες αιτίες σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης στον άνθρωπο, το βακτήριο αυτό μπορεί να προκαλέσει μια σειρά άλλων ασθενειών, οι οποίες μπορεί να θεωρηθούν απειλητικές για τη ζωή του ατόμου όπως είναι η λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα (Ing et al., 1997), το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας (Chesney et al., 1997) και πολλών άλλων. Αποτελεί, επίσης, την κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, καθώς είναι ο πιο συχνά απομονωμένος μικροοργανισμός στους νοσηλευόμενους ασθενείς και ευθύνεται για πάνω από το 10% των νοσοκομειακών λοιμώξεων που παρατηρήθηκαν στη χρονική περίοδο 1979 - 1989 (Boyce, 1997). Αυτό το ποσοστό τις τελευταίες δεκαετίες φαίνεται να αυξάνεται καθώς έχουν παρουσιαστεί αρκετά στελέχη *S. aureus* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος αντιβιοτικών (Boyce, 1997; Balaban et al., 1998).

Ο *S. aureus* παρατηρείται κυρίως στο δέρμα και την ρινική κοιλότητα των θερμόαιμων ζώων. Αναλυτικότερα, ο *S. aureus* έχει παρατηρηθεί στο ανθρώπινο δέρμα, αν και φυσιολογικά δεν αποτελεί μέρος της συμβιωτικής χλωρίδας του ανθρώπου. Ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες, στο 20% των ατόμων, το *S. aureus* μπορεί να βρεθεί στο δέρμα και κυρίως σε περιοχές όπως είναι το περίνεο, ενώ μεταφορά του μικροβίου μέσω της ρινικής κοιλότητας παρατηρείται στο 20 - 40% των υγιών ενηλίκων, από όπου και μπορεί να προκαλέσει εποικισμό του δέρματος και επακόλουθη λοίμωξη (James and Roth, 1992; Trantner, 1990).

Περίπου το ένα τρίτο των στελεχών του *S. aureus* που απομονώνονται από ασθενείς με νοσοκομειακές λοιμώξεις παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη (Strauss, 1998), και ως εκ τούτου πολλά ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη έχουν παρουσιαστεί τα τελευταία χρόνια (Woodford et al., 2000; Marchese et al., 2000).

Δεδομένης της συχνότητας με την οποία ο *S. aureus* παρατηρείται στον άνθρωπο, το πλήθος και η σοβαρότητα των ασθενειών που οφείλονται σε αυτό προκαλούν έκπληξη. Αν και δεν πρόκειται για εγγενώς παθογόνο οργανισμό και πολύ συχνά εποικίζει τον άνθρωπο χωρίς να δημιουργεί παθογένεια. Παρόλα αυτά, ο *S. aureus* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ευκαιριακού παθογόνου. Απουσία αποτελεσματικής άμυνας τους οργανισμού, μπορεί πάρα πολύ γρήγορα να διεισδύσει στους ιστούς όπου και μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Sheagren, 1998). Απλές λοιμώξεις του δέρματος και των τραυμάτων που οφείλονται σε σταφυλόκοκκο είναι πολύ συχνές σε υγιή άτομα, κυρίως σε παιδιά και εφήβους. Όμως το ανοσοποιητικό σύστημα των ατόμων αυτών γρήγορα σταματά τη λοίμωξη εμποδίζοντας την εξάπλωση του μικροοργανισμού σε ευαίσθητους ιστούς και τις περισσότερες φορές η λοίμωξη αυτή δεν προκαλεί σοβαρά προβλήματα σε αυτές τις περιπτώσεις (Projan and Novick, 1997). Δυστυχώς δεν συμβαίνει το ίδιο και σε άτομα με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα.

Πιθανώς λόγω του μεγάλου αριθμού μολυσματικών παραγόντων που μπορεί να παρουσιάσει ο *S. aureus*, μπορεί να προκαλέσει ευρύ φάσμα διαφορετικών ασθενειών, που μπορεί να περιλαμβάνει μια ασυμπτωματική βακτηριαιμία μέχρι και θανατηφόρες ασθένειες όπως είναι η ενδοκαρδίτιδα.

Εκτός από την σταφυλοκοκκική τοξίνωση, δύο ακόμα ασθένειες που προκαλούνται από μόλυνση με το συγκεκριμένο βακτήριο οφείλονται στη δράση τοξινών. Αυτές είναι το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας που οφείλεται στην τοξίνη τοξικής καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) και το σύνδρομο τοξικής επιδερμικής νεκρόλυσης που οφείλεται στη δράση διαφόρων αποφολιωτικών τοξινών (Barg and Harris 1997, Sheagren 1998). Οι αιμολυσίνες μπορεί επίσης να προκαλέσουν εντεροκολίτιδα και ποικίλες λοιμώξεις τραυμάτων ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο των σταφυλοκοκκικών τοξινών στην νόσο Kawasaki (Barg and Harris, 1997).

Οι ασθένειες, όμως, που προκαλεί ο σταφυλόκοκκος δεν οφείλονται μόνο στη δράση των τοξινών που αυτός παράγει. Το βακτήριο έχει τα απαραίτητα εργαλεία που χρειάζεται προκειμένου να εισβάλλει και να παραμείνει σχεδόν σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσει μια σειρά λοιμωδών ασθενειών. Σε αυτές συγκαταλέγονται δερματικές λοιμώξεις, βακτηριουρία, βακτηριαιμία, οστεομυελίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα και ενδοκαρδίτιδα (Sheagren, 1998). Ενώ η πλειοψηφία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων είναι κατά κύριο λόγο νοσοκομειακές, κάποιες μπορεί να λάβουν χώρα και εκτός του νοσοκομειακού χώρου. Μια τέτοια περίπτωση είναι η οστεομυελίτιδα, για την οποία η πιο συχνή αιτία είναι η λοίμωξη από *S. aureus*, αφού ευθύνεται για το 50 - 70% των περιπτώσεων (Gentry, 1997). Άλλες λοιμώξεων των αρθρώσεων και των οστών, όπως είναι η σηπτική αρθρίτιδα, μπορεί να οφείλονται στο *S. aureus*.

3.2. Ένζυμα και τοξίνες του *Staphylococcus aureus*

Είναι γνωστό ότι ο *S. aureus* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή μεγάλης ποικιλίας ουσιών, όπως είναι ένζυμα, τοξίνες και ουσίες με αντιμικροβιακή δράση. Οι ουσίες αυτές μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεια του οργανισμού είτε να βοηθούν στην ταυτοποίηση και τυποποίησή του.

Στα ένζυμα που παράγει ο εν λόγω μικροοργανισμός συγκαταλέγονται η καταλάση, η πηκτάση, η φωσφατάση, η λιπάση, η λυσοζύμη ενώ κάποια στελέχη παράγουν και πενικιλινάσες (Kloos and Schleifer, 1986). Η καταλάση και η πηκτάση χρησιμοποιούνται κυρίως στην κατηγοριοποίηση του σταφυλόκοκκου καθώς παράγονται σχεδόν από όλα τα στελέχη του *S. aureus* βοηθώντας κατ' αυτό τον τρόπο στο διαχωρισμό τους από τους μικρόκοκκους και τα άλλα είδη σταφυλόκοκκου. Τα στελέχη που είναι θετικά για την παραγωγή πηκτάσης σχεδόν πάντα παράγουν και φωσφατάση και λυσοζύμη, που διασπά το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων (Bohach et al., 1997). Επιπλέον, πολλά στελέχη παράγουν νουκλεάσες, ένζυμα που έχουν την ικανότητα να διασπούν τα νουκλεϊκά οξέα ενώ σε κάποια στελέχη υπάρχει παραγωγή λιπασών. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των σταφυλόκοκκων είναι η ικανότητα τους να παράγουν πενικιλινάσες παρέχοντας έτσι ανθεκτικότητα στον μικροοργανισμό έναντι των συγκεκριμένων αντιβιοτικών (Bohach et al., 1997).

Ο *S. aureus* εκκρίνει μια σειρά κυτταρολυτικών τοξινών, στις οποίες περιλαμβάνονται οι αιμολυσίνες και οι λευκοκτονίνες. Αν και αυτές οι τοξίνες είναι δομικά διαφορετικές και έχουν διάφορους μοριακούς στόχους, η δράση τους είναι παρόμοια. Αναλυτικότερα, σχηματίζουν πόρους στις μεμβράνες των κυττάρων στόχων και προκαλούν διαρροή κυτταροπλάσματος και φλεγμονώδη αντίδραση στα κύτταρα όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει λύση του κυττάρου. Η α-αιμολυσίνη είναι πιο καλά μελετημένη τοξίνη και μπορεί και δρα εναντίον πολλών μορίων στόχων όπως είναι τα ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (Menestrina et al., 2003). Η τοξίνη αυτή παρουσιάζει αιμολυτική, νευροτοξική δράση και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και θάνατο αν εγχυθεί ενδοφλεβίως. Η δράση της α-αιμολυσίνης προκαλεί νέκρωση του δέρματος στον άνθρωπο και ως εκ τούτου έχει συσχετιστεί με τη δοθιήνωση (Dinges et al., 2000). Η β-αιμολυσίνη είναι η μοναδική με ενζυμική δράση και σκοπός της είναι η υδρόλυση της σφυγγομυελίνης (Huseby et al., 2007). Η γ-αιμολυσίνη λύει λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα (Kaneko et al., 2004). Η δ-αιμολυσίνη έχει την ικανότητα να λύει τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, καθώς και πολλά άλλα είδη κυττάρων θηλαστικών. Η συγκεκριμένη αιμολυσίνη έχει απομονωθεί από το 97% των στελεχών *S. aureus* χωρίς να είναι απόλυτα εξακριβωμένος ο ρόλος της στην παθογένεια του μικροοργανισμού. Όσο αφορά τις λευκοκτονίνες η πιο γνωστή και πιο τοξική είναι η Panton-Valentine λευκοκτονίνη (PVL) που παράγεται από μικρό ποσοστό στελεχών του *S. aureus*.

Διάφορες τοξίνες που παράγονται από *S. aureus* έχουν υπεραντιγονική δράση. Τα υπεραντιγόνα ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα χωρίς να χρειάζεται να αναγνωρίσουν συγκεκριμένο αντιγόνο. Τοξίνες με υπεραντιγονική δράση που παράγονται από *S. aureus* είναι η τοξίνη τοξικής καταπληξίας (TSST) και οι εντεροτοξίνες.

Η τοξίνη τοξικής καταπληξίας είναι μια πυρετογενής εξωτοξίνη και είναι το κύριο αίτιο του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας, το οποίο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1978 (Todd et al., 1978). Λίγα χρόνια αργότερα οι Davis et al. (1980) απέδειξαν την σχέση του συνδρόμου, με τη χρήση ταμπόν στις γυναίκες και την παραγωγή των συγκεκριμένων τοξινών. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από ταχεία εξέλιξη με πυρετό, ερύθημα, έμετο, διάρροια, υπόταση και πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων. Αν δεν θεραπευτεί έγκαιρα μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στον θάνατο (Bohach et al., 1990).

Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι εξωπρωτεΐνες που σχηματίζουν μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 26,000 - 29,600 Da και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των πυρογενών τοξινών, γνωστές και ως υπεραντιγόνα (Normanno et al., 2005), ενώ το μήκος είναι 228-239 αμινοξέα (Muller-Alouf et al., 2001). Παραδοσιακά έχουν αναγνωριστεί οι κλασικοί τύποι σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών SEA, SEB, SEC, SED και SEE. Η SEC έχει επιπλέον 3 υπότυπους που περιλαμβάνουν τις SEC1, SEC2 και SEC3 (Balaban and Rasooly, 2000). Στη δεκαετία του 1990 ανιχνεύτηκαν νέες τοξίνες (SEG, SEH, SEI, SEJ) και προσδιορίστηκαν τα γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή τους (Morandi et al., 2007). Πιο πρόσφατα στοιχεία οδήγησαν στον προσδιορισμό επιπλέον «νέων» γονιδίων για την παραγωγή σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών. Οι νέες αυτές σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες αναφέρονται ως σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες του τύπου “staphylococcal enterotoxins-like” (SEI) και ο ρόλος τους στην πρόκληση τροφιμογενούς νόσου δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί (Pexara et al., 2010). Οι κλασικές σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEA–SEE), όπως και οι καινούριες σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, SEH (Su and Wong,

1995) SEG και SEI (Omoe et al., 2002) προκαλούν τροφιμογενή νόσο. Η TSST-1 αρχικά ονομαζόταν εντεροτοξίνη F (Bergdoll et al., 1991, 1982). Αν και αυτή η τοξίνη έχει κοινές βιολογικές ιδιότητες με τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, δεν προκαλεί έμεση.

Αν και οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες διαφέρουν μεταξύ τους σε ότι αφορά τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, έχουν επίσης πολλά κοινά βασικά χαρακτηριστικά. Οι τοξίνες αυτές είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικές και μπορεί να βρίσκονται σε τρόφιμα απουσία του μικροοργανισμού (Jorgensen et al. 2005, Jablonski and Bohach, 1997). Η σταθερότητα στη θερμότητα φαίνεται να εξαρτάται από το θρεπτικό υλικό ή τα τρόφιμα, τον τύπο της τοξίνης, το pH, την αλατότητα και άλλους περιβαλλοντολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με τα επίπεδα μετουσίωσης των τοξινών. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες έχουν τιμές D_{121} από 3 min μέχρι 8 min (Asperger and Zangerl, 2003). Επίσης, οι εντεροτοξίνες είναι ανθεκτικές στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως είναι η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η ρεννίνη και η παπαΐνη (Bergdoll, 1967) και έχουν την ικανότητα να δρουν ακόμα και στις συνθήκες χαμηλού pH που παρατηρείται στο γαστρεντερικό σύστημα (le Loir et al., 2003).

Είναι γνωστό ότι οι σταφυλόκοκκοι μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να παράγουν εντεροτοξίνες. Ο αριθμός των κυττάρων *S. aureus* που απαιτούνται για την ελάχιστη τοξική δόση των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών στον άνθρωπο, εξαρτάται από το τρόφιμο και τον τύπο της εντεροτοξίνης. Η SEA ανιχνεύεται όταν ο πληθυσμός του βακτηρίου είναι σχετικά μικρός (10^4 cfu/g) σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό (Hirooka et al., 1987), ή υψηλός (10^7 cfu/g) σε προϊόντα κρέατος (Notermans et al., 1983). Γενικά, θεωρείται ότι οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες παράγονται σε τρόφιμα σε τοξικές δόσεις για τον άνθρωπο, όταν ο πληθυσμός του *S. aureus* ξεπερνά τα 10^5 cfu/g (Le Loir et al., 2003, Tranter, 1996). Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες μπορούν να παραχθούν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 με 46°C , με βέλτιστη θερμοκρασία στους $40-45^\circ\text{C}$. Στα προϊόντα κρέατος οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες παράγονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 10°C για πολλές εβδομάδες (Genigeorgis et al., 1969; Tatini, 1973). Σε μη παστεριωμένο γάλα στους 10°C , η παραγωγή των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών παρατηρήθηκε μετά από τρεις εβδομάδες (Schmitt et al. 1990). Κίνδυνος για την παραγωγή σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών υπάρχει κυρίως όταν τα τρόφιμα διατηρούνται στους 14 με 15°C για αρκετές ημέρες ή σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετές ώρες (Schmitt et al. 1990). Επίσης, παραγωγή των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών παρατηρείται σε εύρος pH 4,8 – 9,0 με βέλτιστο 5,3-7,0, ενεργότητας νερού (a_w) 0,86-0,99 με βέλτιστο 0,90 (Smith et al., 1983). Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες παράγονται σε θρεπτικά μέσα με 10% NaCl και τιμή pH 5,45 ή υψηλότερο. Δεν ισχύει το ίδιο για την περίπτωση θρεπτικών μέσων με 12% (Genigeorgis et al., 1971). Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών είναι ο μικροβιακός ανταγωνισμός. Η παρουσία μεγάλου πληθυσμού λακτοβάκιλλων (lactic acid bacteria, LAB) έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής της SEA λόγω των ενζύμων και λοιπών μεταβολιτών που παράγουν οι λακτοβάκιλλοι (Chordash and Potter, 1976).

Η ικανότητα των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών να προκαλούν έμεση, οφείλεται στη δράση του επιθηλίου του εντέρου ή στην ενεργοποίηση του κέντρου έμεσης μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου (Le Loir et al., 2003). Ακόμα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι SEA και SEB επάγουν την παραγωγή των κυτταροκινών, οι οποίες είναι σημαντικές έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης και της διάρροιας (Pinchuk et al., 2007).

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση που προκαλείται από τις εντεροτοξίνες του *S. aureus* έχει χρόνο επώασης περίπου 2-6 ώρες μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου. Η διάρκεια της ασθένειας είναι μικρή (6-24 ώρες) και θάνατοι έχουν παρατηρηθεί μόνο στην περίπτωση νήπιων, ηλικιωμένων και ατόμων με επιβαρυνμένη υγεία. Κλασικά συμπτώματα είναι ο έμετος, ο πονοκέφαλος, ο κοιλιακός πόνος και η ναυτία, ενώ σε κάποιες σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθούν και αλλαγές στην πίεση του αίματος.

Όπως προαναφέρθηκε, οι εντεροτοξίνες του *S. aureus* έχουν ισχυρή υπεραντιγονική δράση και είναι ικανές να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων στα ποντίκια και στον άνθρωπο (O'Hehir and Lamb, 1990). Ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των Τ-λεμφοκυττάρων από αυτά τα υπεραντιγόνα έχει σαν αποτέλεσμα την μαζική παραγωγή λυμφοκινών (lymphokines) γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι οι εντεροτοξίνες είναι εκκινητές της φλεγμονής (Murray, 2005). Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι δραστικές ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες. Έχει βρεθεί ότι στα γαλακτοκομικά προϊόντα ακόμη και ποσότητα της τάξης των 0,5 ng/ml ή 0,5 ng/g μπορεί να προκαλέσει σταφυλοκοκκική τοξίνωση (Bergdoll, 1991).

Κεφάλαιο 4^ο

Ο *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* στα τρόφιμα

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες είναι υπεύθυνες για το 4,6% των κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων το 2005, και είναι η τέταρτη αιτία μετά τη *Salmonella* (42,3%), τους τροφιμογενείς ιούς (12,5%) και τα είδη *Campylobacter* (8,1%) (EFSA, 2006, 2007, 2009a, 2010, 2011, 2012). Επιπλέον, το ποσοστό των περιπτώσεων που χρειάστηκαν νοσηλεία λόγω σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (14,1%) ήταν υψηλότερο από αυτό των τροφιμογενών ιών (5,5%) και του είδους *Campylobacter* (7,1%), προκαλώντας επίσης μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων (7% του συνόλου των θανάτων έναντι του 2,2% των τροφιμογενών ιών και 1,1% από τα είδη *Campylobacter*). Ιδιαίτερα στην Ισπανία, οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες προκάλεσαν περισσότερα τροφιμογενή κρούσματα (5,9%) σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρωπαϊκή Ένωση μεταξύ των ετών 2008 και 2010.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και για την Ιαπωνία, όπου οι σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις αφορούσαν το 4,3% των τροφιμογενών κρουσμάτων που μελετήθηκαν το 2009, στο σύνολο 690 περιπτώσεων αλλά χωρίς κάποιο θάνατο να σημειώνεται (MHLW, 2011). Οι εντεροτοξίνες του *S. aureus* σχετίστηκαν με το 7,8% των τροφιμογενών κρουσμάτων που αναφέρθηκαν στην Κίνα μεταξύ των ετών 1994 και 2005, προκαλώντας 3055 υποθέσεις χωρίς όμως και πάλι να σημειωθεί κάποιος θάνατος (Wang et al., 2007). Στις ΗΠΑ μόνο περίπου 6-80 εκατομμύρια άτομα νοσούν από σταφυλοκοκκική τοξίνωση κάθε χρόνο (Altekruse et al., 1997). Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (Food and Drug Administration, FDA) υπολόγισε ότι οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες ήταν υπεύθυνες μόνο για το 0,5% των κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων στις ΗΠΑ, με ποσοστό νοσηλείας στο 0,4% και 6 θανάτους κάθε χρόνο (FDA, 2012).

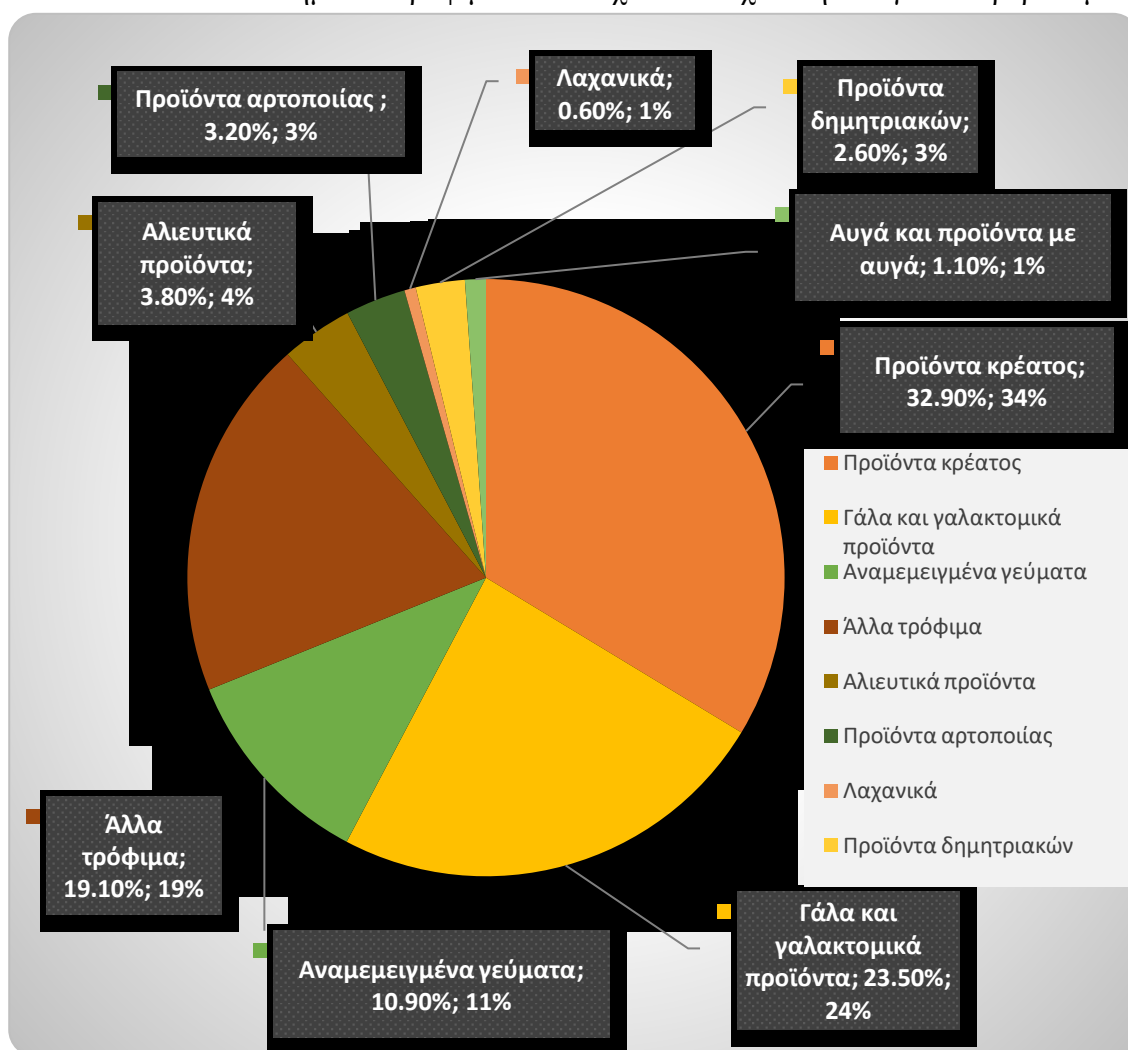
Παρόλα αυτά, είναι γνωστό ότι ο αριθμός των περιπτώσεων σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης είναι μεγαλύτερος από αυτόν που εντέλει δημοσιεύεται καθώς η ασθένεια παρουσιάζει κοινά συμπτώματα με αυτή που προκαλείται από άλλους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να οδηγείται σε λανθασμένη διάγνωση. Επίσης, το γεγονός ότι η ίδια η ασθένεια αυτοπεριορίζεται και παρουσιάζει γρήγορη ανάρρωση βοηθάει στο να μη μπορούν να εντοπιστούν ουσιαστικά όλα τα περιστατικά της ασθένειας. Αναλυτικότερα, μόνο το 40% των τροφιμογενών κρουσμάτων που οφείλονται σε σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη στην Ε.Ε. τελικά επιβεβαιώνονται. Επιπλέον, η ενημέρωση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης δεν είναι υποχρεωτική σε πολλά κράτη-μέλη της Ε.Ε. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πραγματική συχνότητα των σταφυλοκοκκικών τοξινώσεων που οφείλονται σε σταφυλόκοκκο να θεωρείται υψηλότερη από την αναφερόμενη (Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007; Smyth et al., 2004).

Οι σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις εκτός από την σημασία τους για την παγκόσμια δημόσια υγεία έχουν και σημαντικά οικονομικά κόσθη. Για παράδειγμα το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centre for Disease Control and Prevention, CDC) υπολόγισε ότι οι σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις δημιουργούν κόστος που ξεπερνά τα 1,4

τρισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ κάθε χρόνο (Roberts, 2007). Επιπλέον, η ανάκληση μολυσμένων προϊόντων, το κλείσιμο εργοστασίων, οι εκτενείς απολυμάνσεις και η αποζημίωση των ατόμων που μολύνθηκαν μπορεί να δημιουργήσει επιπλέον έξοδα στις βιομηχανίες τροφίμων.

Για την πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης έχουν ενοχοποιηθεί, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα I**, διαφορετικές πηγές τροφίμων. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιβεβαιωμένων σταφυλοκοκκικών τοξινώσεων που οφείλονται σε σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες στην Ε.Ε. από το 2006 οφείλεται σε προϊόντα κρέατος (32,9%), γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα (23,5%) και αναμειγμένα γεύματα ή γεύματα μπουφέ (10,9%) και σε αλιευτικά προϊόντα (3,8%).

Εικόνα I. Ταυτοποιημένα τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί για επιβεβαιωμένα



κρούσματα σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης–στην Ευρωπαϊκή Ένωση μεταξύ των ετών 2006 και 2010 (δεδομένα από EFSA, 2007, 2009a, 2010, 2011, 2012).

Παρόλα αυτά, τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί για σταφυλοκοκκική τοξίνωση διαφέρουν από χώρα σε χώρα λόγω της διαφορετικής κατανάλωσης τροφίμων και των τροφικών συνηθειών (Bhatia et al., 2007; Le-Loir et al. 2003). Στον **Πίνακα I** βλέπουμε τις εξάρσεις των κρουσμάτων σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης ανά χώρα και το τρόφιμο

που θεωρήθηκε υπεύθυνο. Παραδείγματος χάριν, στη Γαλλία αναφέρονται συχνά σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις που σχετίζονται με την κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Cretenet et al., 2011), ενώ τα προϊόντα κρέατος σχετίζονται με κρούσματα που παρατηρούνται στις αγγλοσαξονικές χώρες (Gormley et al., 2011), ενώ τα δημητριακά (κυρίως το ρύζι) και τα αλιευτικά προϊόντα σε ασιατικές χώρες όπως είναι η Ιαπωνία (MHLW, 2011). Στην Ισπανία, οι περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης πιθανώς οφείλονται συχνότερα στην κατανάλωση αλιευτικών προϊόντων καθώς είναι ο δεύτερος καταναλωτής των προϊόντων αυτών στην Ε.Ε. (FAO, 2012).

Κύρια πηγή επιμόλυνσης τροφίμων με *S. aureus* θεωρούνται τα άτομα που διαχειρίζονται τα τρόφιμα αυτά κατά την προετοιμασία και κατεργασία τους (Devita et al., 2007; Sattar et al., 2001; Simon and Sanjeev, 2007). Παρόλα αυτά, τρόφιμα ζωικής προέλευσης (π.χ. γάλα που προέρχεται από ζώα με μαστίτιδα) (Kérouanton et al., 2007; Morandi et al., 2010) καθώς και ενδημικά στελέχη που υπάρχουν στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Le-Loir et al., 2003) μπορεί να είναι επίσης πιθανές πηγές μόλυνσης.

Ο *S. aureus* παρουσιάζει μικρό ανταγωνισμό σε περίπλοκους μικροβιακούς πληθυσμούς, καθώς συχνά εμποδίζεται η ανάπτυξή του ή εκτοπίζεται από άλλους μικροοργανισμούς αλλοίωσης τροφίμων, οι οποίοι αναπτύσσονται ταχύτερα, όπως είναι *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, τα *Enterobacteriaceae* ή τα *Lactobacillaceae*. Επομένως, ο μεγαλύτερος κίνδυνος σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης σχετίζεται με την μόλυνση με το *S. aureus* μετά την καταστροφή (π.χ. μαγειρεμένα προϊόντα) ή την αναστολή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του τροφίμου (π.χ. κατεψυγμένα/παστά τρόφιμα) (Bore et al., 2007).

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που σχετίζονται με το τρόφιμο όπως είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου και οι επιφάνειες επαφής του τροφίμου, καθώς και μη ενδεδειγμένες θερμοκρασίες συντήρησης και πρακτικές υγιεινής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, διατήρησης ή διανομής των προϊόντων μπορεί να ευνοήσουν την ανάπτυξη του *S. aureus* και να διευκολύνουν την παραγωγή τοξινών (Hennekinne et al., 2012).

Πίνακας Ι. Δημοσιευμένες εξάρσεις κρουσμάτων σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης.

Έτος	Χώρα	Υπεύθυνο τρόφιμο	Περιπτώσεις	Βιβλιογραφία
1958	ΗΠΑ	Τυρί	200	Johnson et al. (1990)
1968	ΗΠΑ	Σαλάτα με κοτόπουλο	1300	CDC (1968)
1971	Ηνωμένο Βασίλειο	Λουκάνικα	100	Morris et al. (1972)
1975	Πτήση Ιαπωνία - ΗΠΑ	Ζαμπόν	197	Eisenberg et al. (1975)
1976	Πτήση Βραζιλία - ΗΠΑ	Εκλέρ σοκολάτας	80	CDC (1976)
1980	Καναδάς	Πήγμα για τυρί	62	Todd et al. (1981)
1982	ΗΠΑ	Σάντουιτς	121	CDC (1983)
1983	Κρουαζιέρα Καραϊβικής	Γλυκίσματα με κρέμα	215	Waterman et al. (1987)
1983	Γαλλία	Τυρί	20	De-Buyser et al. (1985)
1984	Σκωτία	Τυρί	27	Bone et al. (1989)
1985	Γαλλία, Ην. Βασίλειο, Ιταλία, Λουξεμβούργο	Λαζάνια	50	Woolaway et al. (1986)
1985	ΗΠΑ	Σοκολατούχο γάλα	860	Evenson et al. (1988)
1988	Γαλλία	Σπαγγέτι	70	Kérouanton et al. (2007)
1989	ΗΠΑ	Κονσερβοποιημένα μανιτάρια	102	Levine et al. (1996)
1990	Ταϊλάνδη	Εκλέρ	485	Thaikruea et al. (1995)
1990	ΗΠΑ	Ζαμπόν	100	Richards et al. (1993)
1990	Γαλλία	Σαλάτες	32	Kérouanton et al. (2007)
1992	ΗΠΑ	Σαλάτα με κοτόπουλο	1364	FDA (1992)
1997	Γαλλία	Τυρί	87	Kérouanton et al. (2007)
1997	Γαλλία	Τυρί	47	Kérouanton et al. (2007)
1998	Βραζιλία	ρύζι, φασόλια, ρεβίθια	4000	Carmo et al. (2002)
1998	Βραζιλία	Σαλάτες	180	Colombari et al. (2007)
1999	Βραζιλία	Τυρί	50	Carmo et al. (2002)
2000	Γαλλία	Σαλάτες	160	Kérouanton et al. (2007)
2000	Ιαπωνία	Γάλα σε σκόνη	13420	Asao (2003) Ikeda et al. (2005)
2001	Γαλλία	Τηγανίτες	21	Kérouanton et al. (2007)
2001	Γαλλία	Κρέμα	85	Kérouanton et al. (2007)
2001	Γαλλία	Τυρί	17	Kérouanton et al. (2007)
2002	Γαλλία	Τυρί	45	Kérouanton et al. (2007)
2005	Ινδία	Τηγανιτές πατάτες	>100	Nema et al. (2007)
2006	Γαλλία	Επιδόρπιο με καρύδα	17	Hennekinne et al. (2009)
2007	Βέλγιο	Χάμπουργκερ	15	Fitz-James et al. (2008)
2007	Αυστρία	Γάλα	166	Schmid et al. (2009)
2009	Ιαπωνία	Κρέπες	75	Kitamoto et al. (2009)
2009	Γαλλία	Τυρί	23	Ostyn et al. (2010)
2011	Ισπανία	Μακαρόνι	42	Solano et al. (2013)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Ο *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥΣ

Η παρουσία μικροοργανισμών στα ψάρια είτε αυτές μεταφέρονται από τον άνθρωπο είτε από το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται είναι αρκετά συχνές και εξαρτώνται από την εποχή, το περιβάλλον κλπ. Μεταξύ των μικροοργανισμών συχνά είναι και βακτήρια που είναι παθογόνα τόσο για τα ψάρια όσο και τον άνθρωπο και μπορεί να απομονωθούν από αυτά χωρίς να προκαλούν κάποιο ιδιαίτερο σύμπτωμα σε όλες τις περιπτώσεις (Acha and Szyfres, 2003).

Διάφοροι μικροοργανισμοί, που έχουν σημασία για την Δημόσια Υγεία, όπως είναι τα *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes* και *S. aureus* έχουν επανειλημμένα ανιχνευθεί σε ποικίλα προϊόντα ψαριών (EFSA, 2010; Garrido et al., 2009; Herrera et al., 2006; Kumar et al., 2009; Novotny et al., 2004; Papadopoulou et al., 2006; Yang et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες τάσεις στην κατανάλωση τροφίμων, όπως είναι η κατανάλωση πολλών τροφίμων ωμών ή πολύ ελαφρά μαγειρεμένων. Οι τάσεις αυτές μπορεί να αυξήσουν την παρουσία και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Abee & Wouters, 1999; Cebrián et al., 2007; Rendueles et al., 2011).

Αν και τα στοιχεία της παρουσίας του *S. aureus* στα προϊόντα ψαριών δεν είναι αρκετά, γενικά παρατηρείται αύξηση της παρουσίας του την τελευταία δεκαετία σε κάποιες μελέτες (Abraham et al., 2010; Herrera et al., 2006; Oh et al., 2007; Papadopoulou et al., 2006; Simon & Sanjeev, 2007), και μόνο μία μελέτη σε προϊόντα ψαριών που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία βρήκε χαμηλά ποσοστά του βακτηρίου σε ψάρια (κάτω από 3%) (Normanno et al., 2005).

Σε 3 από τα 10 δείγματα φρέσκου ψαριού, παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση του *S. aureus* από την επιτρεπτή από την νομοθεσία της Βραζιλίας (Vieira et al., 2001). Σε περιοχή της Βραζιλίας, το συγκεκριμένο βακτήριο απομονώθηκε από το 20% των 175 δειγμάτων φρέσκων ψαριών και φιλέτων ψαριού. Παρόλα αυτά, μόνο οι 9 από τα 109 στελέχη του *S. aureus* που απομονώθηκαν παρήγαγαν εντεροτοξίνες (Ayulo et al., 1994).

Οι Da-Silva et al. (2010), Herrera et al. (2006), Oh et al. (2007) και Papadopoulou et al. (2007) έλεγξαν τα φρέσκα ψάρια από την αγορά στην Βραζιλία, την Ισπανία και την Κορέα, αντίστοιχα και οι Simon και Sanjeev (2007) επικεντρώθηκαν στα κατεψυγμένα και ξηρά προϊόντα της Ινδίας ενώ οι Akhondzadeh et al. (2006) ασχολήθηκαν με τα καπνιστά και παστά ψάρια στο Ιράν. Παρομοίως, οι González-Rodríguez et al. (2002) ασχολήθηκαν μόνο με τα καπνιστά ψάρια που βρίσκονταν σε συσκευασίες κενού αέρος. Η μελέτη των González-Rodríguez et al. (2002) που πραγματοποιήθηκε με τα καπνιστά ψάρια που βρίσκονταν σε συσκευασίες κενού αέρος, αποτέλεσε την εξαίρεση καθώς 3 συσκευασίες από τις 54 βρέθηκαν θετικές στην παρουσία του *S. aureus*. Επιπλέον, οι Normanno et al. (2003) ανέφεραν την παρουσία του μικροοργανισμού στο 10% των ιταλικών προϊόντων και οι Alarcón et al. (2006) ανίχνευσαν το *S. aureus* σε 1 στα 10 προϊόντα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία (Vázquez-Sánchez et al., 2012) έδειξε ότι από τα 728 δείγματα που απομόνωσαν στα 125 απομονώθηκε ο *S. aureus*. Η παρουσία του μικροοργανισμού ήταν διαφορετική στις διάφορες κατηγορίες προϊόντων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα φρέσκα προϊόντα ο *S. aureus* βρέθηκε σε ποσοστό 43%, στα κατεψυγμένα προϊόντα σε ποσοστό 30%, στα αλίπαστα ψάρια σε 27%, στα καπνιστά ψάρια το ποσοστό του ήταν 26%, στα έτοιμα για μαγείρεμα προϊόντα σε 25%, σε μη κατεψυγμένα προϊόντα 20%, στα αυγά ψαριών ήταν 17% και τελικά σε προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση το ποσοστό του ήταν στο 10%. Ακόμα, ο *S. aureus* παρατηρήθηκε και σε αντζούγιες σε λάδι σε 2 από τα 4 προϊόντα που μελετήθηκαν. Υψηλή ήταν και η συγκέντρωση του μικροοργανισμού και σε καπνιστά προϊόντα ψαριών σε 3 από τα 43 καπνιστά προϊόντα (7%). Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις του *S. aureus* βρέθηκαν στο 19,4% των φρέσκων προϊόντων, στο 14% τα κατεψυγμένων προϊόντων και στο 13,3% των παστών ψαριών.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα ποσοστά μόλυνσης των φρέσκων προϊόντων ήταν επίσης υψηλά, με ποσοστά που κυμαίνονταν από 10 έως και 30% (Herrera et al., 2006). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σχετικά μικρότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα από τη μελέτη των Vázquez-Sánchez et al. (2012). Ακόμα, χαμηλότερα ποσοστά αναφέρθηκαν σε κατεψυγμένα προϊόντα στην Ινδία, σε ποσοστό 17% (Simon & Sanjeev, 2007).

Ο *S. aureus* έχει, επίσης, ανιχνευθεί κατά τη διαδικασία ξήρανσης και καπνίσματος των χελιών στην Αλάσκα το 1993 (Eklund et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, η συγκέντρωση του *S. aureus* αυξήθηκε σημαντικά 2 με 3 μέρες μετά την επεξεργασία. Επιπλέον αναλύσεις έδειξαν ότι σχηματίστηκε ένα υμένιο πάνω από το ψάρι και ότι τα βακτήρια που βρίσκονταν είτε κάτω είτε μέσα στο υμένιο μπορούσαν να αναπτυχθούν ακόμα και κατά τη διάρκεια του καπνίσματος. Η εξάλειψη της διαδικασίας πριν την ξήρανση και η μείωση της ροής του αέρα κατά τη διάρκεια του καπνίσματος είχε ως αποτέλεσμα στην εναπόθεση του καπνού πριν τον σχηματισμό του υμενίου και βοήθησε το προϊόν να αποκτήσει τα κατάλληλα επίπεδα αλατιού και ενεργότητας νερού που παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του *S. aureus*. Το 1994, αυτές οι τροποποιήσεις εφαρμόστηκαν σε ένα εργοστάσιο στην Αλάσκα και ο *S. aureus* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα τελικά προϊόντα (Eklund et al., 2004).

Συνθήκες όπως η χαμηλή θερμοκρασία διατήρησης, ιδίως των κατεψυγμένων προϊόντων, η χαμηλή ενεργότητα νερού των κατεψυγμένων και παστών προϊόντων ή η δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα φρέσκα ψάρια εμποδίζουν την ανάπτυξη του *S. aureus* και επομένως και την παραγωγή εντεροτοξινών. Παρόλα αυτά, η μη κατάλληλη διατήρηση (ακατάλληλες θερμοκρασίες) ή η επεξεργασία (π.χ. μακρόχρονη αφαλάτωση), μπορεί να ενεργοποιήσουν την παραγωγή εντεροτοξινών. Παραδείγματος χάριν, η αφαλάτωση στους 20°C βρέθηκε ότι είχε ως αποτέλεσμα μη ασφαλή επίπεδα του *S. aureus* στον μπακαλιάρο, και την πιθανή παραγωγή τοξινών (Pedro et al., 2004). Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται αν ο αριθμός των μικροοργανισμών είναι μικρός, η διάρκεια ζωής στο κατάστημα μεγάλη (όπως στα παστά προϊόντα) ή το προϊόν καταναλώνεται ωμό. Επιπλέον, οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι αρκετά θερμοανθεκτικές και ως εκ τούτου η θερμική επεξεργασία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόπος αποφυγής της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (Balaban & Rasooly, 2000; Cremonesi et al., 2005).

Σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής ένωσης [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005] περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, οι σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση περιλαμβάνεται στα κριτήρια υγιεινής κατά την διάρκεια της διαδικασίας για τα αλιευτικά προϊόντα, όμως διατάξεις υπάρχουν μόνο για προϊόντα βρασμένων μαλακοστράκων και μαλακίων (με ή χωρίς κέλυφος) (**Πίνακας II**).

Πίνακας II. Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση ως κριτήρια υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία στα αλιευτικά προϊόντα [Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005].

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας		Όρια		Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	C	m	M	
Με κέλυφος και χωρίς κέλυφος προϊόντα βρασμένων μαλακοστράκων και μαλακίων	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Ο ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ

Για την παραγωγή του υγράλατου μπακαλιάρου χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη του ψαριού αυτού, με τα *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus*, και *Gadus ogac*, να είναι τα πιο σημαντικά από εμπορικής απόψεως και λόγω αυτού και τα πιο καλά μελετημένα. Τα είδη αυτά ανήκουν στην οικογένεια *Gadidae*, στην τάξη *Gadiformes* και στην τάξη *Actinopterygii*. Τα είδη αυτά φέρουν τρία χαρακτηριστικά ραχιαία πτερύγια και δύο πρωκτικά πτερύγια, με τα πρώτα ραχιαία να βρίσκονται πίσω από το κεφάλι, δεν έχουν αγκάθια, τα πυελικά πτερύγια βρίσκονται πριν τον θώρακα και τα δόντια τους βρίσκονται στην ύνιδα. Μέλη της οικογένειας αυτής παρατηρούνται σε εύκρατα ύδατα, κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο. Επομένως, είναι πιθανό να βρει κανείς μέλη της οικογένειας αυτής στον Αρκτικό, τον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό ωκεανό. Τα εν λόγω είδη αποτελούν τυπικά θαλάσσια ψάρια, αλλά κάποια εξ αυτών (όπως το *Gadus morhua*, μεταξύ άλλων) μπορούν να επιβιώσουν σε χαμηλή αλατότητα και, έτσι, μπορούν να επιβιώσουν και σε εκβολές ποταμών και γλυκά νερά. Τα περισσότερα είδη είναι βενθοπελαγικά και τρέφονται με ψάρια και σπονδυλωτά. Για αρκετά από τα είδη αυτά έχει παρατηρηθεί μετανάστευση μεγάλων αποστάσεων (Cohen et al., 1990).

Τα προαναφερθέντα είδη χωρίζονται σε 3 υπο-οικογένειες με διαφορετικά χαρακτηριστικά η κάθε μία. Η υπο-οικογένεια *Gadinae*, η οποία είναι από τις πιο σημαντικές, περιλαμβάνει περίπου 22 είδη και 12 γένη. Τα είδη της οικογένειας αυτής αποτελούν τα πιο σημαντικά είδη ψαριών και σε αυτά περιλαμβάνονται το γένος *Gadus*, ο εγκλεφίνος (haddock), το γένος *Melanogrammus*, καθώς και το γένος *Theragra*. Οι άλλες υπο-οικογένειες είναι οι *Lotinae* και *Phycinae* (Cohen et al., 1990) ή, σύμφωνα με τον Nelson (2006), *Lotinae* και *Ranicipitinae*.

Ο μπακαλιάρος του ατλαντικού είναι πλέον σχετικά σπάνιος και για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί αυστηρά συστήματα διαχείρισης προκειμένου να περιοριστεί η υπερεκμετάλλευσή του (Warm et al., 2000). Οι κύριες περιοχές αλίευσης του μπακαλιάρου βρίσκονται κατά μήκος της ακτογραμμής Newfoundland-Labrador, Ισλανδία, Γροιλανδία, και νήσος Lofoten (Νορβηγία) (Di Luccia et al., 2005). Οι περισσότερες εκφορτώσεις μπακαλιάρου προέρχονται από παραδοσιακές αλιευτικές τράτες του βορείου ημισφαιρίου (Cohen et al., 1990) και στην περίπτωση της Ισλανδίας παρέχουν πάνω από το 40% της ετήσιας αλίευσης μπακαλιάρου (Margeirsson et al., 2007).

Η αλίευση του μπακαλιάρου έχει μειωθεί σταδιακά μεταξύ των ετών 1970 και 2000, από περίπου 3 σε 1 εκατομμύριο τόνους το χρόνο. Το 2010, η παγκόσμια παραγωγή αλίευσης του *Gadus morhua* ήταν 950 τόνους. Μια απότομη αύξηση παρατηρήθηκε στην παραγωγή του μπακαλιάρου σε ιχθυοτροφείο μεταξύ των ετών 2000 - 2003, από 169 σε 2565 τόνους. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και το 2010, όπου η παγκόσμια παραγωγή του *Gadus morhua* ήταν 22.558 τόνους (FAO, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

Η ΑΛΑΤΙΣΗ ΣΤΟΝ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟ

Το αλάτι έχει χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στην συντήρηση του κρέατος και των ψαριών - θαλασσιών επειδή έχει την ικανότητα να επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος και να ενισχύει τη γεύση και το άρωμα τους (Martinez-Alvarez et al., 2005a). Επιπλέον, εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα συγκεκριμένα τρόφιμα μειώνοντας την ενεργότητα νερού του τροφίμου. Παρόλα αυτά, αν και τα πλεονεκτήματα της αλάτισης των προϊόντων είναι πολλά υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα που προκύπτουν από την χρήση του, κυρίως από ψαράδες, σε πολλές χώρες των οποίων οι γνώσεις σχετικά με τις επιδράσεις της αλάτισης είναι μειωμένες. Η αλάτιση, παραδείγματος χάριν, μπορεί να οδηγήσει σε πήξη των πρωτεϊνών ιδιαίτερα αν είναι πολύ ισχυρή και οι κρύσταλλοι αλατιού που χρησιμοποιούνται έχουν μικρή διάμετρο. Αν δεν γίνει σωστά, οι κρύσταλλοι του αλατιού διαλύονται πολύ γρήγορα στο μν με αποτέλεσμα το προϊόν που παίρνουμε να είναι πολύ κατώτερο ποιοτικά καθώς σκληραίνει η επιφάνειά του ενώ το κέντρο του είναι ακόμα υγρό και ευαίσθητο σε μικροβιακή αλλοίωση. Αυτό, όμως τις περισσότερες φορές μπορεί να αποφευχθεί αν γίνει πολύ καλή αλάτιση (Oliveira et al., 2012).

Η ποιότητα του αλατιού που χρησιμοποιείται είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που παίζει κύριο ρόλο στην διαδικασία αλάτισης του ψαριού. Επιμόλυνση του αλατιού με χημικά στοιχεία όπως είναι ο χαλκός, το ασβέστιο και ο σίδηρος μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος ειδικά η συγκέντρωση του μολυντή είναι υψηλότερη από την επιτρεπόμενη με βάση τα διεθνή δεδομένα. Μέταλλα όπως είναι ο χαλκός και ο σίδηρος μπορεί να αυξήσουν τον ρυθμό οξειδωσης που λαμβάνει χώρα στα ψάρια και συνήθως οδηγεί στη δημιουργία κίτρινων κηλίδων (αποχρωματισμός) στο τελικό προϊόν. Το ασβέστιο επίσης έχει καταλυτική δράση στα πρωτεολυτικά ένζυμα. Αν και το καθαρό διάλυμα αλατιού έχει αντισηπτική δράση κυρίως λόγω της ικανότητάς του να απομακρύνει το νερό και έτσι να περιορίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Hermes 2006), δεν μπορεί να αποτρέψει την παντελή ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών. Τα αλόφιλα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλατιού (5-30%) (Magnusson 2006). Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς αυτούς μπορεί να μην είναι παθογόνοι αλλά η παρουσία τους σε υψηλές συγκεντρώσεις τους κάνει ικανούς να καταστρέψουν τους μυϊκούς ιστούς των ψαριών και να προκαλέσουν άσχημες οσμές και ακόμα και να αποχρωματίσουν την επιφάνεια του μν του προϊόντος. Ο συνδυασμός των παραπάνω μαζί με την ενζυμική δραστηριότητα έχει ως αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να είναι κατώτερης ποιότητας.

Οι διαφορετικές μέθοδοι αλάτισης επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο η καθεμία τη δομή και τα χαρακτηριστικά των μυών του ψαριού. Συνήθως η εμβάπτιση σε αλάτι (brining) προσφέρει καλύτερη διείσδυση του αλατιού από ότι άλλες μέθοδοι και το τελικό προϊόν χαρακτηρίζεται από υψηλή ποιότητα και απόδοση. Η διαδικασία της ξηρής αλάτισης (dry salting) καθώς και της υγρής αλάτισης (pickling) μπορεί να είναι υπεύθυνες για τα υψηλά επίπεδα θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και πτητικού βασικού αζώτου στο τελικό προϊόν του ψαριού (Oliveira et al., 2012).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αλάτιση των προϊόντων διαφέρουν σε ότι αφορά τους μηχανισμούς μεταφοράς μάζας και απόδοσης βάρους. Η αλάτιση του μπακαλιάρου έχει εξελιχθεί αρκετά και από μια απλή διαδικασία ενός βήματος είναι πλέον μια διαδικασία πολλών βημάτων, η οποία περιλαμβάνει και στάδιο προ της αλάτισης. Το στάδιο της προ-αλάτισης ακολουθείται από μια τροποποιημένη και σύντομη εκδοχή μιας παλαιότερης μεθόδου αλάτισης, η οποία ονομάζεται ξηρή αλάτιση. Η κύρια διαφορά βρίσκεται στο στάδιο προ-αλάτισης, το οποίο μπορεί να εμπεριέχει την έγχυση άλμης, εμβάπτιση σε άλμη ή της υγρής αλάτισης. Κατά την έγχυση άλμης και της εμβάπτισης σε άλμη, χρησιμοποιείται προπαρασκευασμένη άλμη με συγκεκριμένη συγκέντρωση αλατιού, ενώ με τις διαδικασίες της υγρής αλάτισης και της παραδοσιακής αλάτισης, το ξηρό αλάτι προστίθεται αργότερα στο ψάρι. Στην συνέχεια περιγράφονται οι μέθοδοι της έγχυσης άλμης, της εμβάπτισης σε άλμη, της υγρής και ξηρής αλάτισης.

7.1. Έγχυση Άλμης

Η έγχυση έχει σαν αποτέλεσμα την σχετικά ομοιογενή συγκέντρωση αλατιού στους μυς του ψαριού σε μικρό χρονικό διάστημα, σε σχέση με τις άλλες μεθόδους αλάτισης. Επιπλέον, κάνει δυνατή την προσθήκη και άλλων συστατικών στα προϊόντα, όπως είναι πρωτεΐνες, κάτι που δεν είναι δυνατόν να γίνει π.χ. με την εμβάπτιση σε άλμη. Παρόλα αυτά, η έγχυση από μόνη της μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αλατιού στο ψάρι καθώς μόνο μικρές ποσότητες άλμης μπορούν να εισαχθούν στο μυ. Οι όγκοι έγχυσης της άλμης, η κατανομή της και η διατήρησή τους στους μυς εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά του οργανισμού, τη σύσταση της άλμης καθώς και από τα μηχανήματα και τις ρυθμίσεις που χρησιμοποιούνται, όπως είναι η βελόνα, η πυκνότητα της βελόνας, τα "χτυπήματα" της βελόνας ανά λεπτό, η απελευθέρωση της άλμης (μέσα/έξω), ο χρόνος παραμονής και η πίεση που ασκείται. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα μετά την έγχυση καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης επίσης επηρεάζουν τη διατήρηση της άλμης που έχει εισαχθεί στον ψάρι. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ο κίνδυνος μικροβιακής επιμόλυνσης και η πιθανή βλάβη της δομής του μυ λόγω της πίεσης που ασκείται και των τρυπημάτων από την βελόνα στον μυ (Bakowski et al., 1970; Birkeland et al., 2007; Birkeland et al., 2003; Boles & Swan, 1997a; Boles & Swan, 1997b; Brunk, 1985).

Η άλμη θεωρείται ότι βρίσκεται σε θέσεις αρχικά γύρω από την περιοχή έγχυσης. Η συγκέντρωση του αλατιού γρήγορα διαλύεται από τα υγρά που βρίσκονται στον μυ καθώς το αλάτι μετακινείται από την θέση έγχυσης σε άλλα μέρη του μυ (Offer, 1988). Οι επιδράσεις της έγχυσης μπορεί εν μέρει να περιγραφούν και ως εμβάπτιση σε άλμη, όπου το αλάτι μετακινείται από την θέση έγχυσης λόγω οσμωτικών δυνάμεων. Αυτό που διαφοροποιεί τη διαδικασία αυτή από την εμβάπτιση σε άλμη είναι κυρίως η μικρότερη απόσταση διάχυσης της άλμης, η οποία εξαρτάται από τα μηχανήματα που χρησιμοποιούνται. Επιπροσθέτως, η πίεση που ασκείται στον μυ κατά τη διάρκεια της έγχυσης μπορεί να επηρεάζει τη δομή του μυ και εξαρτάται όμως από τη κατάσταση του οργανισμού που χρησιμοποιείται. Οι βελόνες με μεγάλη διάμετρο, οι υψηλές πιέσεις και οι συνεχείς πίδακες κατά τη διάρκεια της έγχυσης είναι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην αλλοίωση της δομής του μυ και στον σχηματισμό καναλιών ή θέσεων εναπόθεσης άλμης στους μυς. Οι υψηλής πυκνότητας βελόνες μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικές από ότι η αυξημένη πίεση προκειμένου να βελτιωθούν τα επίπεδα βάρους του ψαριού χωρίς να αυξάνεται ο κίνδυνος να δημιουργηθούν δομικές

αλλοιώσεις (Birkeland et al., 2003). Η υψηλή πίεση μπορεί εύκολα να προκαλέσει βλάβες στην δομή του μυ, όπως είναι η δημιουργία μεγάλων κενών σε διάφορα τμήματα του μυ και θραύση των μυϊκών ινών. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η δομή των μυών του ψαριού είναι πολύ πιο ευαίσθητη από αυτή του κρέατος (Freixenet, 1993). Ως εκ τούτου, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ηπιότερες μέθοδοι.

7.2. Εμβάπτιση σε άλμη (Brining)

Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, η εμβάπτιση σε άλμη έγινε η κύρια μέθοδος προ-αλάτισης σε διάφορες χώρες, όπως είναι η Ισλανδία. Η χρήση της τεχνικής αυτής σαν ένα στάδιο πριν την αλάτιση θεωρείται ότι βελτιώνει την ποιότητα και την απόδοση βάρους των προϊόντων. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα με εμβάπτιση των φιλέτων σε άλμη που έχει παρασκευαστεί από χοντρό αλάτι και νερό βρύσης. Η διάχυση του αλατιού στους μύες του ψαριού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η συγκέντρωση και η σύσταση της άλμης, το σχήμα και το πάχος του προϊόντος, η αναλογία της άλμης στο προϊόν και η διάρκεια της εμβάπτισης. Η θερμοκρασία διατηρείται χαμηλή (2-4°C) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ανάπτυξη βακτηρίων στο προϊόν. Ποικίλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στις οποίες ο μυς εμβαπτίζεται σε υψηλή αναλογία άλμης: ψαριού προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της διάχυσης από τη διάχυση των υγρών του μυ στην άλμη (Andres et al., 2002; Andres et al., 2005b; Barat et al., 2002; Barat et al., 2003). Πρακτικά, οι συνηθέστερες αρχικές αναλογίες είναι 1,6:1 ή 2:1, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη συγκέντρωση του αλατιού στην άλμη κατά τη διαδικασία της εμβάπτισης.

Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αλατιού στην άλμη και οι χημικές αλλαγές που αυτές προκαλούν στους μυς του ψαριού είναι εδώ και πολλά χρόνια γνωστές. Ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα, η επίδραση της συγκέντρωσης του αλατιού της άλμης στην πρόσληψη βάρους και στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών του μυ κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης είχε περιγραφεί από τον Callow το 1931 (Lawrie 1998 a,b; Callow, 1947). Παρατηρήθηκε ότι η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του αλατιού στην άλμη (από αλάτι συγκέντρωσης 2%) οδήγησε σε μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους από ότι η άμεση εμβάπτιση των μυών του χοιρινού σε άλμη μεγαλύτερης συγκέντρωσης (πάνω από 6%). Οι διαφορές στην απόδοση βάρους που παρατηρήθηκαν μπορεί να ερμηνευθούν από τη δράση του αλατιού στις πρωτεΐνες στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλατιού, γεγονός που δεν συμβαίνει αν η αρχική συγκέντρωση του αλατιού είναι πάνω από 4-5%. Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να είναι μη αντιστρεπτές. Τα ευρήματα των μελετών αυτών επιβεβαιώθηκαν και από μεταγενέστερες μελέτες (Duerr & Dyer, 1952; Knight & Parsons, 1988; Offer, 1988). Οι Duerr και Dyer (1952) περιέγραψαν τη σχέση μεταξύ της διαλυτότητας των μυϊκών πρωτεϊνών του μπακαλιάρου, τη συγκέντρωση του αλατιού και την πρόσληψη βάρους. Η διαλυτότητα των μυϊκών πρωτεϊνών του μπακαλιάρου, κυρίως η μυοσίνη, και η πρόσληψη βάρους μειώθηκαν όταν η συγκέντρωση του αλατιού στους μυς υπερέβη το 5-6%, το οποίο έλαβε χώρα περίπου 48 ώρες μετά από την εμβάπτιση των φιλέτων μπακαλιάρου σε κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου στους 0°C.

7.3. Υγρή αλάτιση (Pickling)

Κατά τη μέθοδο της υγρής αλάτισης, το ψάρι στοιβάζεται σε διαδοχικές στρώσεις ξηρού αλατος. Η πρόσληψη αλατος ξεκινά με την εξαγωγή υγρών από τους μυς του ψαριού και την διάλυση του αλατιού. Η κορεσμένη άλμη δημιουργείται σε μια επιφανειακή στοιβάδα στο φιλέτο και απομακρύνει επιπλέον υγρασία από τους μυς. Το αλάτι μετακινείται από την επιφάνεια στο εσωτερικό των μυών, ενώ το νερό μετακινείται στην αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή στο περιβάλλον διάλυμα (van Klaveren & Legrende, 1965). Η αναλογία της άλμης στο ψάρι είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται κατά την εμβάπτιση. Συνήθως, η άλμη ρέει στο κάτω μέρος του δοχείου, όπου και σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα. Ως εκ τούτου, η μέθοδος αυτή έχει περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά με την ξηρή αλάτιση παρά με την εμβάπτιση σε άλμη. Το ποσοστό αλάτισης και η συγκέντρωση του αλατιού δεν μπορούν να ελεγχθούν κατά τον ίδιο τρόπο με την μέθοδο της εμβάπτισης. Με την μέθοδο αυτή παρατηρούνται χαμηλότερα ποσοστά απόδοσης βάρους από ότι με την εμβάπτιση (Andres et al., 2005b). Το πόσο χονδρό είναι το αλάτι που χρησιμοποιείται επηρεάζει το ποσοστό αλάτισης του ψαριού, καθώς οι μικρότεροι κρύσταλλοι διαχέονται πιο γρήγορα από ότι οι μεγαλύτεροι (van Klaveren et al., 1965).

7.4. Ξηρή αλάτιση

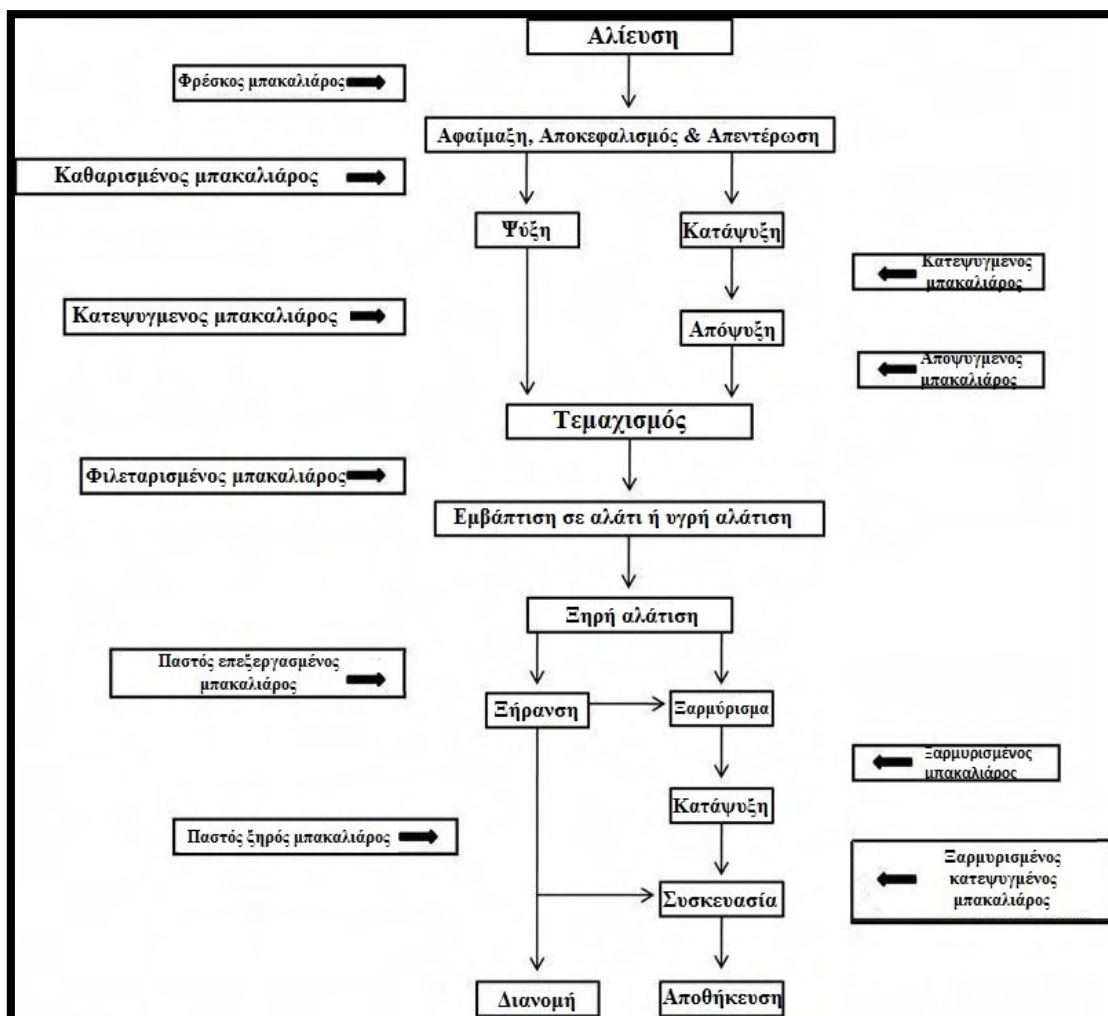
Η ξηρή αλάτιση ήταν η αρχική μέθοδος αλάτισης του μπακαλιάρου. Είναι παρόμοια με την υγρή αλάτιση, με τη μόνη διαφορά ότι η άλμη που σχηματίζεται απομακρύνεται. Τα φιλεταρισμένα σε σχήμα πεταλούδας ή απλά φιλεταρισμένα ψάρια στοιβάζονται σε εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού, χονδρού αλατιού. Σε μια παλαιότερη εκδοχή της μεθόδου αυτής, το ψάρι στοιβαζόταν αρκετές φορές και διατηρούταν έτσι για βδομάδες. Στις μέρες μας, η μέθοδος της ξηρής αλάτισης χρησιμοποιείται σαν στάδιο μετά την εμβάπτιση ή την υγρή αλάτιση. Τα ψάρια στοιβάζονται σε πλαστικά μεγάλα δοχεία και το ύψος της κάθε στοιβάδας είναι 30-40 cm. Τα ψάρια παραμένουν έτσι για 10 με 12 μέρες και στην συνέχεια συσκευάζονται (van Klaveren et al., 1965; Vas-Velche et al., 1998).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Η επεξεργασία του αλατισμένου μπακαλιάρου περιλαμβάνει διάφορα στάδια, όπως αυτά φαίνονται χαρακτηριστικά στη συνέχεια (Εικόνα II).

Εικόνα II. Στάδια παραδοσιακής επεξεργασίας του μπακαλιάρου με τα κύρια ενδιάμεσα προϊόντα (τροποποίηση από Oliveira et al., 2012)



Η αλάτιση είναι μία από τις παλαιότερες μεθόδους διατήρησης ψαριών, ιδιαίτερα του μπακαλιάρου (Martinez-Alvarez et al., 2005a), κατά την οποία ελαττώνεται η ενεργότητα νερού (a_w) του προϊόντος. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών στους μυς του μπακαλιάρου. Η τιμή a_w του παστού μπακαλιάρου κυμαίνεται από 0,7 έως 0,75 (Lupin et al., 1981; Gomez et al., 1993).

Τα προϊόντα που έχουν υποστεί αλάτιση έχουν περιεκτικότητα σε νερό που φθάνει τα 550 με 600 g·kg⁻¹ (περίπου 55% w/w) και σε αλάτι 200 με 250 g·kg⁻¹ (περίπου 20% w/w) (Borgstrom 1968; Zaitsev et al., 1969; Bjørkevoll et al., 2003). Σύμφωνα με τους

van Klaveren και Legendre (1965), Bogason (1987), και Akse et al. (1993), η περιεκτικότητα σε νερό του τελικού προϊόντος κυμαίνεται μεταξύ 55% με 58% και 18% με 21% σε αλάτι, σε σχέση με την περιεκτικότητα σε νερό 80% και αλάτι 0,3% στο ωμό ψάρι. Η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να μειωθεί επιπλέον κατά την ξήρανση του μπακαλιάρου (Bjørkevoll et al., 2003; Lauritzsen et al., 2004).

Ο χρόνο της χημικής κατεργασίας και της επιπλέον επεξεργασίας του ψαριού εξαρτάται από τις απαιτήσεις της εκάστοτε αγοράς. Η παραδοσιακή επεξεργασία του μπακαλιάρου περιλαμβάνει ένα επιπλέον βήμα αλάτισης, δίνοντας έτσι ένα υγρό προϊόν, το οποίο στην συνέχεια ξηραίνεται (Martinez-Alvarez et al., 2005a; Martinez-Alvarez & Gomez-Guillen, 2005). Ο χρόνος που απαιτείται για τα παραπάνω ποικίλλει ανάλογα την περιοχή και τον παραγωγό αλλά χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος του ψαριού, την εμφάνιση της χαρακτηριστικής του γεύσης και την σκληρή συνεκτικότητα της σάρκας του ψαριού (Vilhelmsson et al., 1997). Σε κάποιες περιοχές η επεξεργασία του μπακαλιάρου στηρίζεται κυρίως στα κλασικά στάδια που έχουν αναφερθεί τα προηγούμενα χρόνια (Beatty & Fougere 1957; van Klaveren & Legendre, 1965). Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν τον αποκεφαλισμό, τον εκπλαχισμό, το φιλετάρισμα, τεμαχισμό, την αλάτιση, την χημική κατεργασία και τη συσκευασία του ψαριού (Rodrigues et al., 2005).

8.1. Προετοιμασία για αλάτιση

Γενικά ο μπακαλιάρος, υπόκεινται στη διαδικασία της αφαίμαξης και εκσπλαχισμού μετά την αλίευσή του και στην συνέχεια ψύχεται ή καταψύχεται και αποθηκεύεται. Όταν θα φθάσει στην μονάδα επεξεργασίας, το ψάρι αποκεφαλίζεται, τεμαχίζεται και φιλετάρεται. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του μπακαλιάρου κατά μήκος της κοιλιακής μέσης γραμμής και το ψάρι ανοίγεται με την απομάκρυνση της σπονδυλικής του στήλης (Di Luccia et al., 2005). Αμέσως μετά τον τεμαχισμό, το ψάρι πλένεται σε τρεχούμενο καθαρό νερό ή καθαρό θαλασσινό νερό, προκειμένου να απομακρυνθεί το αίμα και συνήθως απομακρύνεται το περιτόναιο από τα κοιλιακά τοιχώματα (μαύρη μεμβράνη) πριν την αλάτιση του (Codex Alimentarius, 2003).

8.2. Αλάτιση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αλάτιση είναι μια διαδικασία κατά την οποία μεταφέρεται μαζί, βασικά νερό και αλάτι, μεταξύ του μπακαλιάρου και του περιβάλλοντός του μέσω διάχυσης (Barat et al., 2004a). Το ποσοστό της εισόδου του αλατιού στο ψάρι αυξάνεται κατά 100 φορές με τον τεμαχισμό, το φιλετάρισμα και την απομάκρυνση του δέρματος του ψαριού. Η αλάτιση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως είναι η ξηρή αλάτιση, η υγρή αλάτιση, η εμβάπτιση σε άλμη, η έγχυση άλμης ή με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων. Η περιεκτικότητα σε νερό στον μπακαλιάρου μειώνεται από 82% σε περίπου 54% κατά τη διάρκεια της παραδοσιακής αλάτισης.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την αλάτιση του μπακαλιάρου έχουν αλλάξει σημαντικά. Οι αλλαγές αυτές έχουν τροποποιήσει τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, έχουν αυξήσει την απόδοση βάρους και έχουν βελτιώσει κάποιες από τις παραμέτρους ποιότητας του προϊόντος (Lindkvist et al., 2008).

Μικρότερος χρόνος επεξεργασίας, χαμηλότερες θερμοκρασίες και οι καλύτερες συνθήκες αποθήκευσης οδηγούν σε ηπιότερη γεύση και πιο λευκό χρώμα (Barat et al., 2003; Lindkvist et al., 2008). Επίσης, στην περίπτωση της αλάτισης, η αλάτιση με έγχυση θα μειώσει τον χρόνο που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθούν τα επιθυμητά επίπεδα αλατιού και έτσι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να διατηρηθούν τα υδατοδιαλυτά στοιχεία των μυών, όπως είναι πρωτεΐνες, βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα. Ως εκ τούτου, μια μέθοδος που περιλαμβάνει μικρή περίοδο αλάτισης είναι κατάλληλη για τη διατήρηση των στοιχείων αυτών (Larsen & Elvevoll, 2008).

8.3. Ξήρανση

Το 2005, η Δανία και η Νορβηγία αποτελούσαν τους κύριους παραγωγούς και εξαγωγείς μπακαλιάρου (Di Luccia et al., 2005). Αρχικά, τα ψάρια τα αποκεφάλιζαν, τα εκσπλάχνιζαν και τα άφηναν να ξηραθούν για περίπου 3 μήνες κατά τη διάρκεια του χειμώνα ή της άνοιξης, και στη συνέχεια το προϊόν διατηρούνταν σε δροσερό και ξηρό μέρος (Di Luccia et al., 2005). Παρόλα αυτά, η προετοιμασία του ξηρού αλατισμένου μπακαλιάρου είναι μια διαφορετική διαδικασία και συνήθως ο μπακαλιάρος αφού αλατιστεί ξηραίνεται σε εργοστάσια των χωρών του εισαγωγέα (Rodrigues et al., 2003, 2005).

Τα ξηρά προϊόντα είναι ιδανικά για μεταφορά και αποθήκευση καθώς είναι ελαφριά και δεν καταλαμβάνουν μεγάλο χώρο (Di Luccia et al., 2005). Ο ξηρός αλατισμένος μπακαλιάρος πωλείται κυρίως χωρίς να έχει συσκευαστεί, χωρίς να συνοδεύεται συγκεκριμένες συστάσεις αποθήκευσης και αφαλάτωσης και γενικά καταναλώνεται αφού μαγειρευτεί ενώ σε κάποιες περιπτώσεις καταναλώνεται και ωμός αφού αφαλατιστεί (Rodrigues et al., 2003; Pedro et al., 2004).

Η διαδικασία επεξεργασίας του ξηρού αλατισμένου μπακαλιάρου περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: αλάτιση, πλύση, ένα στάδιο προ της ξήρανσης, ξήρανση, και συσκευασία (Rodrigues et al., 2003). Ο χρόνος διατήρησης του προϊόντος αυξάνεται με την αφυδάτωση του ψαριού (Di Luccia et al., 2005). Αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα, απαιτητική και κατά τη διάρκεια της υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μεταφερθούν μικροοργανισμοί από το περιβάλλον στον προϊόν (Rodrigues et al., 2003).

Η ξήρανση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες κοντά στους 20°C και σχετική υγρασία κάτω από 70% (Barat et al., 2006; Bras & Costa 2010). Το νερό που υπάρχει στον μπακαλιάρο εξατμίζεται και απομακρύνεται μέσω του αέρα. Οι Jason και Peters (1973) δήλωσαν ότι η ξήρανση του μπακαλιάρου λαμβάνει χώρα σε 3 στάδια: το πρώτο αφορά τη συνεχή απώλεια νερού και το δεύτερο και τρίτο τη μείωση της απώλεια του νερού. Το πρώτο στάδιο εξαρτάται από τη μεταφορά του ξηρού αέρα και τη μεταφορά θερμότητας ενώ το δεύτερο και τρίτο στάδιο εξαρτώνται από τη Fickian διάχυση του νερού στο ψάρι.

Εκτός όμως από απώλεια νερού κατά την ξήρανση του μπακαλιάρου παρατηρείται και μικρή απώλεια αλατιού. Οι Barat et al (2006) παρατήρησαν απώλειες της τάξης του 2% με 4% σε αλάτι από την επιφάνεια γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση των κρυστάλλων του χλωριούχου λόγω της επεξεργασίας του μπακαλιάρου.

Αλλαγές στην ποιότητα κατά τη διάρκεια της ξήρανσης έχουν παρατηρηθεί στο χρώμα, την υφή καθώς και χημικές και μικροβιολογικές αλλαγές. Η ξήρανση προκαλεί το κιτρίνισμα στον μπακαλιάρο. Οι Lauritzsen et al. (2004) ανέφεραν ότι η μείωση της περιεκτικότητας τους νερού προκαλεί αλλαγές στο χρώμα του ψαριού. Οι Stien et al. (2005) κατέδειξαν ότι η απώλεια του νερού προκαλεί μείωση της διαφάνειας αυξάνοντας το κίτρινο χρώμα του ψαριού. Το χρώμα του ψαριού επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως είναι η παρουσία ιόντων ασβεστίου ή μαγνησίου στο αλάτι, δίνοντας έτσι ένα πιο λευκό χρώμα στο ψάρι (Horner 1992; Lauritzsen et al., 2004; Martinez-Alvarez & Gomez-Guillen, 2005). Άλλοι λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται η αλλαγή του χρώματος του ψαριού είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών (Lauritzsen et al., 2004; Stien et al., 2005), η οξειδωση των φωσφολιπιδίων (Anon 1967; Stien et al., 2005), καθώς και άλλες αντιδράσεις που οφείλονται στην παρουσία ιόντων σιδήρου και χαλκό (Anon, 1967).

Η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό και η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι έχει σαν αποτέλεσμα η ενεργότητα του νερού να είναι χαμηλότερη από 0,75, μια τιμή κατά την οποία δεν παρατηρείται η ανάπτυξη αλόφιλων μικροοργανισμών. Σε ευνοϊκές συνθήκες και άλλα βακτήρια που είναι αλοανθεκτικά (halotolerant), ειδικά οι κατά Gram θετικοί κόκκοι που επιβιώνουν κατά τις διαδικασίες της αλάτισης και ξήρανσης του ψαριού, μπορεί να αναπτυχθούν και να μειώσουν την ποιότητα του προϊόντος (Rodrigues et al., 2003). Κατά την ξήρανση η ενεργότητα του νερού μειώνεται ελάχιστα από 0,73 – 0,75 σε 0,70 (Rodrigues et al., 2003).

Το τελικό στάδιο της ξήρανσης καθορίζεται συνήθως ως την χρονική στιγμή που το ψάρι μπορεί να διατηρήσει την οριζόντια θέση του όταν το κρατά κανείς με το ένα χέρι (Bras and Costa, 2010).

Οι βέλτιστες συνθήκες ξήρανσης του μπακαλιάρου προτάθηκαν από τους Linton και Wood (1945) με ταχύτητα αέρα από 1 έως 1,25 m/s, σχετική υγρασία 45% με 55%, και θερμοκρασία στους 26°C (Jason, 1965). Στην βιομηχανία οι συνθήκες ξήρανσης ποικίλλουν και συνήθως χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες χαμηλότερες των 25°C, με σταθερή ροή αέρα και υγρασία καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Νορβηγία παρατήρησαν ποικίλες συνθήκες κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, με υψηλότερες θερμοκρασίες (20 με 26°C) και ταχύτητα αέρα (1,9 με 2,4 m/s) και χαμηλότερη σχετική υγρασία (50% με 35%) (Barat et al., 2006).

8.4. Διατήρηση

Ο ακριβής έλεγχος της θερμοκρασίας και της υγρασίας είναι σημαντικός για την ανάπτυξη αλόφιλων βακτηρίων και την σταθερότητα των παραμέτρων ποιότητας καθώς κάποιοι μικροοργανισμοί και κάποια ένζυμα είναι ακόμα ενεργά παρά τη μεγάλη συγκέντρωση του αλατιού και τις συνθήκες ψύξης (Rodrigues et al., 2003; Pedro et al., 2004). Επιπλέον, η μέθοδος διατήρησης είναι σημαντική κυρίως σε περιπτώσεις όπου η διατήρηση υπό ψύξη δεν είναι δυνατή, αφού έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων εμποδίζεται σε συσκευασία που δεν υπάρχει οξυγόνο καθώς τα βακτήρια αυτά χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους (Aas et al., 2010). Ακόμα, ο μπακαλιάρος δεν πρέπει να αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των -4°C καθώς αλλοιώνεται το χρώμα του ψαριού (Nguyen et al., 2011).

Πολλά προβλήματα μπορεί να προκύψουν λόγω της μη σωστής προετοιμασίας, συσκευασίας, ξήρανσης ή/και αλάτισης του μπακαλιάρου. Τα κύρια προβλήματα που προκύπτουν κατά την προετοιμασία είναι σχισμές, θρόμβοι, κομμάτια από το ήπαρ του ψαριού. Η παρουσία ξένων σωμάτων και παράσιτων ή παρασιτικών λοιμώξεων θεωρούνται επίσης προβλήματα κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας. Η υψηλή συγκέντρωση αλατιού και χαμηλή συγκέντρωση νερού στον μπακαλιάρo κάνουν ικανή την ανάπτυξη αλόφιλων βακτηρίων στο ψάρι αυτό (Hess 1942b,c; Hess & Gibbons 1942; Freixo & Botelho 1947; Venkataraman & Screenivasam 1954; Trova & Galamba 1955; Vilhelmsson et al., 1996). Ως εκ τούτου, το κοκκίνισμα που προκαλείται από αλόφιλα (Bjarnason, 1986) σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες διατήρησης και οι καφέ κηλίδες που δημιουργούνται από μύκητες (Beatty & Fougere, 1957) θεωρούνται από τα μοναδικά μικρόβια που αναπτύσσονται στον παστό και ξηρό παστό μπακαλιάρo (Bjørkevoll et al., 2003). Από το 1950, μερικές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανάπτυξη αλοφιλών και ανθεκτικών βακτηρίων στον παστό και υγράλατο μπακαλιάρo και τα προϊόντα του (Dussault 1962; Ishida et al., 1976; Fujii et al., 1977; Vilhelmsson et al., 1996, 1997; Rodrigues et al., 2003; Aas et al., 2010). Αρκετά κατά Gram-θετικά βακτήρια έχουν απομονωθεί από τα αρχικά στάδια της αλάτισης του μπακαλιάρου καθώς και από τα τελικά προϊόντα του (Vilhelmsson et al., 1996, 1997). Οι Vilhelmsson et al (1996) χαρακτήρισαν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ήπια αλόφιλων βακτηρίων (128) παρόλο που δεν κατάφεραν να τα ταυτοποιήσουν. Παρόλα αυτά, το *Staphylococcus arlettae/xylosus* ταυτοποιήθηκε ως το μοναδικό βακτηριακό στέλεχος που παρατηρήθηκε στον μπακαλιάρo με μεγάλη συχνότητα. Επιπλέον, οι Doe και Heruwati (1988) ανίχνευσαν το *S. xylosus* σε παστό μπακαλιάρo.

Επιπροσθέτως, η αυξημένη ανθεκτικότητα στο αλάτι μαζί με τα αυξημένα επίπεδα υγρασίας, καθώς και άλλα θέματα που μπορεί να προκύπτουν κατά την παραγωγή του μπακαλιάρου, μπορεί να δημιουργήσουν συνθήκες που θα επιτρέπουν την περαιτέρω επιβίωση βακτηρίων που είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού καθώς και αλόφιλων βακτηρίων που παρατηρούνται σε πολλά προϊόντα του μπακαλιάρου (Huss & Valdimarsson, 1990). Ακόμα, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συμβεί ακόμα και ανάπτυξη ακραία αλόφιλων μικροοργανισμών (van Klaveren & Legendre, 1965). Ο Freixo (1947) μελέτησε τον παστό μπακαλιάρo με χαμηλά ποσοστά αλατιού στον οποίο και παρατήρησε πολλούς πορτοκαλί κόκκους του στελέχους *S. aureus*.

Η αυξανόμενη επιβίωση των βακτηρίων στον μπακαλιάρo μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ανάπτυξη μικροοργανισμών στο αφαλατισμένο προϊόν. Αυτό συμβαίνει καθώς, μετά την ενυδάτωση του, οι συνθήκες γίνονται ευνοϊκές για την ανάπτυξη των βακτηρίων, λόγω του υψηλού ποσοστού σε νερό (περίπου 70% w/w) και τη χαμηλή συγκέντρωση αλατιού (2% με 4% w/w NaCl) στο προϊόν (Bjørkevoll et al., 2003). Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια κατά τη διάρκεια της αφαλάτωσης, τα παθογόνα βακτηρία να αναπτυχθούν και να αποτελέσουν απειλή για τη δημόσια υγεία, κυρίως επειδή τα τρόφιμα αυτά μπορούν να καταναλωθούν χωρίς απαραίτητα να μαγειρευτούν (Rodrigues et al., 2003) ή σε περίπτωση του *S. aureus* να έχει προηγηθεί η παραγωγή εντεροτοξινών του που είναι ανθεκτικές στην θερμική επεξεργασία.

Επομένως, κάποια προϊόντα μπακαλιάρου που βρίσκονται στην αγορά έχουν αρκετά προβλήματα με μικροοργανισμούς που οφείλονται κατά πάσα πιθανότητα στην μέθοδο αφαλάτωσης τους (Pedro et al., 2004). Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στα αφαλατισμένα προϊόντα

(Vilhelmsson et al., 1996; Pedro et al., 2002a; Bjørkevoll et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Pedro et al., 2004; Lorentzen et al., 2010a,b, 2011).

8.5. Αφαλάτωση

Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε αλάτι στο ψάρι (16% με 20% w/w), ο αλίπαστος μπακαλιάρος θα πρέπει να αφαλατωθεί πριν την κατανάλωσή του (Bjørkevoll et al., 2003, 2004; Barat et al., 2006; Fernandez-Segovia et al., 2006, 2007; Magnusson et al., 2006; Munoz- Guerrero et al., 2010) και ως εκ τούτου, το τελικό προϊόν δεν μοιάζει εμφανισιακά με το παστό ψάρι (περιεκτικότητα σε αλάτι 2% με 3%) (Pedro et al., 2002a; Lorentzen et al., 2010a). Η διαδικασία αφαλάτωσης είναι παραδοσιακή και χρονοβόρα και λαμβάνει χώρα στο χώρο του καταναλωτή (Barat et al., 2004b,c; Bjørkevoll et al., 2004; Munoz-Guerrero et al., 2010). Αρκετά συχνά το ψάρι κόβεται σε μερίδες και στην συνέχεια εμβαπτίζεται σε νερό βρύσης για τουλάχιστον 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο (Barat et al., 2004c; Andres et al., 2005a) με αρκετές αλλαγές του νερού (Martinez- Alvarez 2002; Barat et al., 2004c; Martinez- Alvarez et al., 2005b). Η διαδικασία αυτή συνήθως διαρκεί 2 μέρες αν και εξαρτάται από το πάχος του ψαριού (Andres et al., 2005a; Martinez-Alvarez et al., 2005b). Η διαδικασία της αφαλάτωσης στη βιομηχανική μονάδα είναι παρόμοια με αυτή που πραγματοποιείται στο χώρο του καταναλωτή (Barat et al., 2004b; Martinez-Alvarez et al., 2005b). Παρόλα αυτά, η παραδοσιακή ενυδάτωση σε μεγάλη κλίμακα, με τη χρήση δοχείων νερού, έχει παρουσιάσει διάφορα προβλήματα σε σχέση με την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και την ποιότητα του προϊόντος. Η διαδικασία αφαλάτωσης μπορεί να είναι χρονοβόρα και ο χειρισμός των ανοιχτών δοχείων νερού προβληματικός.

Επιπλέον, στο στάδιο αυτό υπάρχει μεγάλος κίνδυνος μόλυνσης από μικροοργανισμούς λόγω του μεγάλου χώρου που καταλαμβάνουν τα δοχεία νερού (Bjørkevoll et al., 2004). Ακόμα, η εμπορική ενυδάτωση και διανομή συχνά οδηγεί σε αποθήκευση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι η συμβατική ενυδάτωση στον χώρο του καταναλωτή (Lorentzen et al., 2010a). Οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της αφαλάτωσης περιλαμβάνουν την βελτίωση της υφής του μπακαλιάρου (Barat et al., 2004a), βοηθώντας την απόδοση βάρους και έτσι αυξάνονται και τα οικονομικά οφέλη της βιομηχανίας (Barat et al., 2004b,c). Η περιεκτικότητα σε NaCl μειώνεται σε συγκεντρώσεις ικανές για την κατανάλωση καθώς το ψάρι απορροφά νερό (Hall, 1997; Martinez-Alvarez, 2002), οπότε και αυξάνεται και το βάρος του ψαριού (Barat et al., 2004a, c). Έτσι, τα δείγματα γίνονται πιο μαλακά κατά τη διάρκεια της αφαλάτωσης (Barat et al., 2004c).

Η βελτιστοποίηση της αφαλάτωσης του μπακαλιάρου σε βιομηχανική κλίμακα περιλαμβάνει την ανάλυση πολλών παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία, η ποιότητα του μπακαλιάρου, το μέγεθος του δείγματος, οι μυς του ψαριού, τα πρόσθετα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν, η αναλογία μπακαλιάρου/νερού, ο χρόνος και η διαχείριση του νερού (Barat et al., 2004c). Η σκληρότητα του νερού μπορεί επίσης να επηρεάσει την αφαλάτωση και επομένως και το τελικό προϊόν (Andres et al., 2005a).

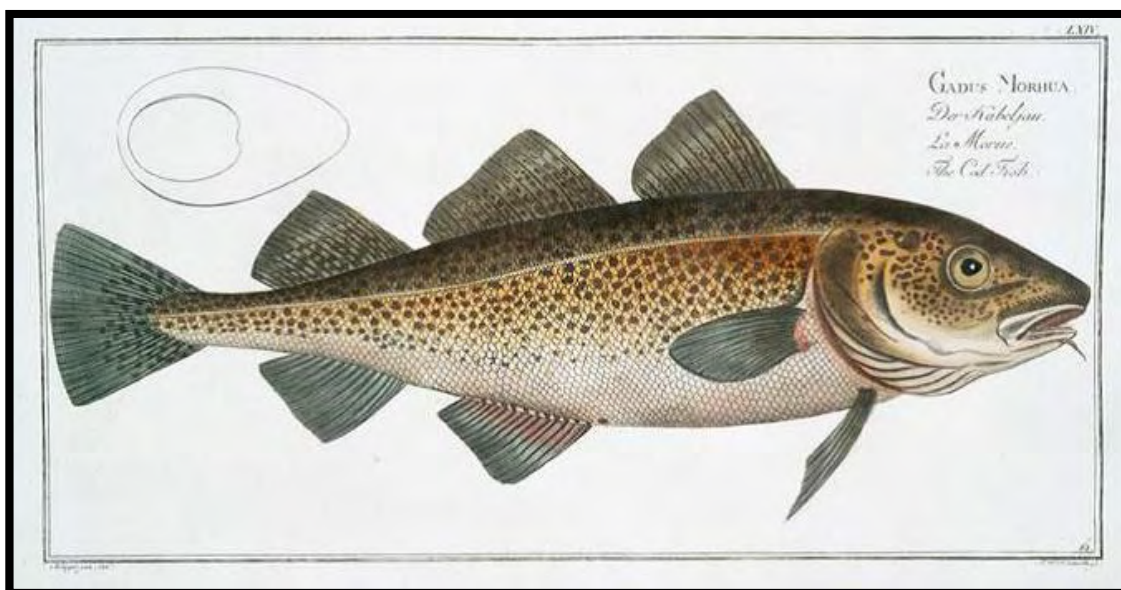
Η θερμοκρασία είναι επίσης πολύ σημαντική καθώς μπορεί να αναπτυχθούν πολλοί μικροοργανισμοί μετά την αφαλάτωση (Pedro et al., 2002a,b). Υψηλές θερμοκρασίες

αυξάνουν την ταχύτητα αφαλάτωσης αλλά το προϊόν είναι αρκετά ασταθές οπότε συνήθως προτιμώνται θερμοκρασίες μεταξύ 0 με 4°C (Martinez-Alvarez et al., 2005b).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

Ο *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΥ

Ο υγράλατος μπακαλιάρος (*Gadus morhua*) αποτελεί δημοφιλές φαγητό των χωρών της Μεσογείου, της Λατινικής Αμερικής και της Νότιας Αμερικής, καθώς είναι αναπόσπαστο κομμάτι της γαστρονομικής τους κουλτούρας. Συνήθως προτιμάται λόγω της ιδιαίτερης γεύσης και υφής του, και η κατανάλωσή του είναι ιδιαίτερα μεγάλη σε κάποιες από τις χώρες αυτές. Παραδείγματος χάριν, η Πορτογαλία είναι η 4η χώρα στην κατανάλωση ψαριών, με ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση πάνω από 66 kg ενώ η εισαγωγή του υγράλατου μπακαλιάρου στην Πορτογαλία φθάνει το 42%. Ο μεγαλύτερος παγκοσμίως εξαγωγέας μπακαλιάρου είναι η Νορβηγία, γεγονός που ενδιαφέρει όχι μόνο τους παραγωγούς του ψαριού (κυρίως Νορβηγία και Ισλανδία) αλλά και τις χώρες των καταναλωτών του μπακαλιάρου (Dias et al., 2001). Ο υγράλατος μπακαλιάρος χρησιμοποιείται συχνά σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή του ξηρού αλίπαστου μπακαλιάρου και στη συνέχεια το ψάρι πωλείται χωρίς να συσκευαστεί και εκτός ψυγείου (Codex Stan 167, 1995). Υπάρχουν διάφορες διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες που αφορούν τις παραμέτρους ποιότητας του υγράλατου μπακαλιάρου και περιλαμβάνουν τα επιτρεπτά όρια σχετικά με την περιεκτικότητα σε αλάτι και υγρασία (Pedro et al., 2002c), αλλά χωρίς να γίνονται συστάσεις σχετικά με την αποθήκευση ή/και τις συνθήκες αφαλάτωσης.



Εικόνα III. Ο ατλαντικός μπακαλιάρος (Εθνική Βιβλιοθήκη της Νέας Υόρκης, 2002).

Σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει η λαθεμένη άποψη ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν στα αλίπαστα τρόφιμα και οι κανόνες υγιεινής, απαραίτητοι για τα άλλα τρόφιμα, δεν θεωρούνται απαραίτητοι κατά την επεξεργασία και πώληση των αλίπαστων προϊόντων. Παρόλα αυτά, κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν σε συγκεντρώσεις αλατιού υψηλότερες του 10% NaCl, όπως είναι τα *L.*

monocytogenes και *Vibrio parahaemolyticus*, και πολλά από αυτά μπορούν να επιβιώσουν σε κορεσμένα διαλύματα άλατος (Huss, 1994). Η *Salmonella* μπορεί να επιβιώσει σε συγκεντρώσεις άλατος 10% για 1 με 3 μήνες, ενώ ο *S. aureus* μπορεί να επιβιώσει για πολλές εβδομάδες σε αλίπαστα ψάρια (Huss & Valdimarsson, 1990). Τα φρέσκα ψάρια που πρόκειται να γίνουν παστά υπόκεινται στους ίδιους χειρισμούς μέχρι να ξεκινήσει η επεξεργασία τους με εκείνα που πρόκειται να πουληθούν φρέσκα. Μόλις το ψάρι αλιευθεί καθαρίζεται και στη συνέχεια τεμαχίζεται. Ο μπακαλιάρος πριν αλατιστεί εν μέρει αφαίρεση οστών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιμολύνει όλη την επιφάνεια του ψαριού με βακτήρια. Αν και η ενδεδειγμένη πλύση του ψαριού μειώνει την επιμόλυνση, πολλά βακτήρια δεν απομακρύνονται και το ψάρι μπορεί να φέρει, σε κάποιες περιπτώσεις, ανεπιθύμητα βακτήρια. Επίσης, η επεξεργασία, η αποθήκευση, η διανομή ή η προετοιμασία για την κατανάλωση μπορεί να αποτελέσει πηγή επιμόλυνσης του ψαριού (Huss et al., 1997). Επιπλέον, ο υγράλατος μπακαλιάρος συνήθως καταναλώνεται μαγειρεμένος αφού ξαρμυριστεί για 24-72 ώρες, αλλά υπάρχουν και κάποιες συνταγές οι οποίες περιλαμβάνουν ωμό μπακαλιάρo.

Όπως έχει αναφερθεί, οι σταφυλόκοκκοι που παράγουν πηκτάση (όπως ο *S. aureus*) δεν αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του μπακαλιάρου (Rodrigues, 2005). Ο συνήθης τρόπος μεταφοράς του *S. aureus* στην τροφική αλυσίδα προέρχεται σχεδόν πάντα από τον άνθρωπο (π.χ. με τον χειρισμό) στα τρόφιμα ή στον εξοπλισμό. Ως εκ τούτου, το βακτήριο αυτό χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης των συνθηκών υγιεινής κατά τη διάρκεια του χειρισμού του Τροφίμου (Pedro et al., 2004). Παρόλα αυτά, ο *S. aureus* δεν παρατηρείται συχνά στον παστό μπακαλιάρo ενώ σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Rodrigues et al. (2003) δεν επιβεβαιώθηκε η παρουσία του βακτηρίου σε δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε υγράλατο μπακαλιάρo και στα προϊόντα του παρατηρήθηκε ότι μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων του υγράλατου μπακαλιάρου παρουσίασαν επιμόλυνση με κολοβακτηρίδια ενώ στα αφαλατωμένα προϊόντα του μπακαλιάρου τα ποσοστά επιμόλυνσης με τα συγκεκριμένα βακτήρια ήταν υψηλότερα για τα δείγματα όπου η αφαλάτωση πραγματοποιήθηκε στους 20°C, σε σχέση με αυτά που έγινε στους 3°C (Pedro et al., 2004).

Οι Pedro et al. (2004) παρατήρησαν ότι ο *S. aureus* ήταν κύριος παθογόνος μικροοργανισμός στον υγράλατο μπακαλιάρo. Το βακτήριο ταυτοποιήθηκε από όλα σχεδόν τα δείγματα που μελετήθηκαν καθώς ήταν ο κύριος παθογόνος παράγοντας στον υγράλατο μπακαλιάρo με τιμές που κυμαίνονταν από 10 έως 10² μικροοργανισμούς/g. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την έλλειψη συνθηκών υγιεινής κατά το χειρισμό του ψαριού. Παρόλα αυτά, το υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης αυτών των μικροοργανισμών σε σχέση με τα κολοβακτηρίδια, τόσο στα αλατισμένα όσο και στα αφαλατωμένα προϊόντα, πιθανώς οφείλεται στην μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των κατά Gram-θετικών βακτηρίων στα χαρακτηριστικά του υγράλατου μπακαλιάρου. Τα αποτελέσματα αυτά δεν προκαλούν έκπληξη καθώς ο χειρισμός του υγράλατου μπακαλιάρου δεν υπόκειται σε αυστηρούς κανόνες υγιεινής και επίσης ότι οι κατά Gram-θετικοί κόκκοι, που είναι γενικά ανθεκτικοί σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού και υψηλές τιμές περιεκτικότητας σε NaCl, μπορούν να επιβιώσουν σε περίπτωση που μολύνουν το ψάρι. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από παλαιότερα αποτελέσματα των Vilhelmsson et al. (1997) στον μπακαλιάρo, όπου ο κύριος βακτηριακό τύπος που βρέθηκε να μολύνει τον υγράλατο μπακαλιάρo ήταν στελέχη του γένους *Staphylococcus*. Ακόμα και σε δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 4°C, ανιχνεύθηκαν

επίπεδα του σταφυλόκοκκου που έφθαναν τους 10^3 μικροοργανισμούς/g. Επιπλέον, μη ασφαλή επίπεδα του *S. aureus* παρατηρήθηκαν όταν η αφαλάτωση έγινε στους 20°C, με την πιθανή δημιουργία τοξινών.

Γενικά, τα δείγματα του υγρού μπακαλιάρου που είχαν ξαρμυστεί παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό επιμόλυνσης. Τα αφαλατωμένα δείγματα, ιδιαίτερα εκείνα που είχαν ξαρμυριστεί στους 20°C, είχαν μεγαλύτερες τιμές επιμόλυνσης σε σχέση με τα αρχικά ψάρια. Κανένα δείγμα δεν είχε επιμολυνθεί με *Salmonella*, *V. parahaemolyticus* ή *L. monocytogenes*, παρόλο που στο παρελθόν είχε αναφερθεί περιστατικό μόλυνσης μπακαλιάρου με *Salmonella* (Pedro et al., 2004).

Η τιμή του pH θεωρήθηκε από τους Pellegrino et al. (1988) ως ο καλύτερος δείκτης της συνολικής ποιότητας του υγρού μπακαλιάρου. Οι τιμές του pH στη μελέτη των Pedro et al. (2004) κυμαίνονταν από 5,7 μέχρι 6,5. Παρόλα αυτά, δεν βρέθηκε κάποια σχέση μεταξύ των τιμών pH του υγρού μπακαλιάρου και της ποιότητάς του. Αν και η υψηλότερη τιμή προήλθε από δείγμα που είχε υψηλό βακτηριακό φορτίο.

Γενικά, υψηλότερα ποσοστά βακτηρίων παρατηρήθηκαν στον υγρό μπακαλιάρο παρά στον ξηρό αλίπαστο μπακαλιάρο. Η θερμοκρασία ξαρμυρίσματος φαίνεται ότι επηρεάζει την ανίχνευση ή/και τη επιμόλυνση με διάφορα βακτήρια όπως είναι το *E. coli*, οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι στο αφαλατωμένο προϊόν. Η αφαλάτωση στους 20°C, αντί στους 3°C, μπορεί να οδηγήσει σε μη ασφαλή επίπεδα του *S. aureus*, κάνοντας επίσης πιθανή και την παραγωγή τοξινών από τον μικροοργανισμό. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη εφαρμογής κανόνων υγιεινής στη βιομηχανία παραγωγής αλίπαστων και την σημαντικότητα της αφαλάτωσης σε συνθήκες ψύξης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρασκευή δειγμάτων

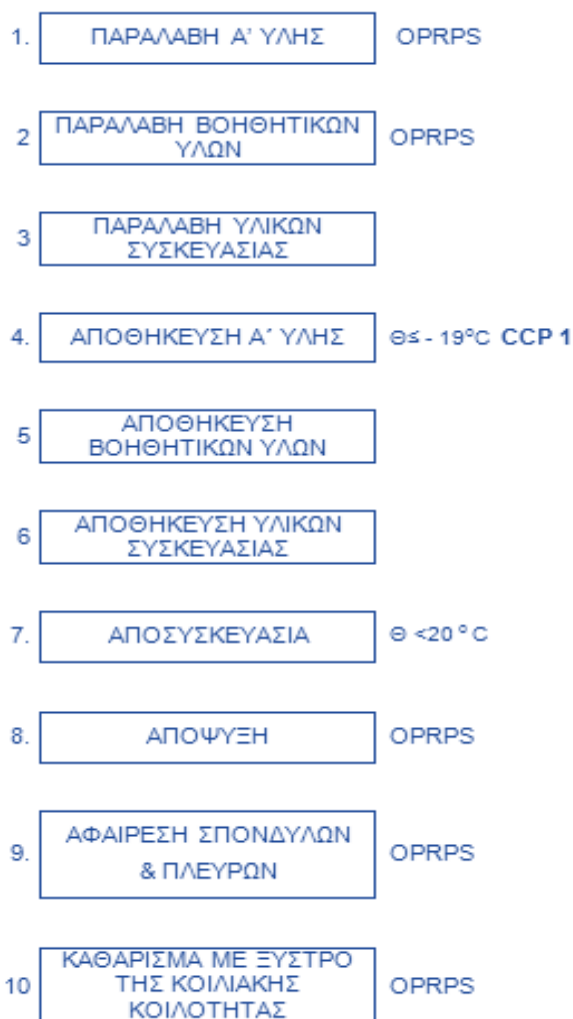
Φιλέτα υγράλατου μπακαλιάρου (*Gadus morhua*) παραχωρήθηκαν από την εταιρεία Seaworld ΑΕ (Καρδίτσα). Η διαδικασία παραγωγής του υγράλατου μπακαλιάρου έχει ως εξής:

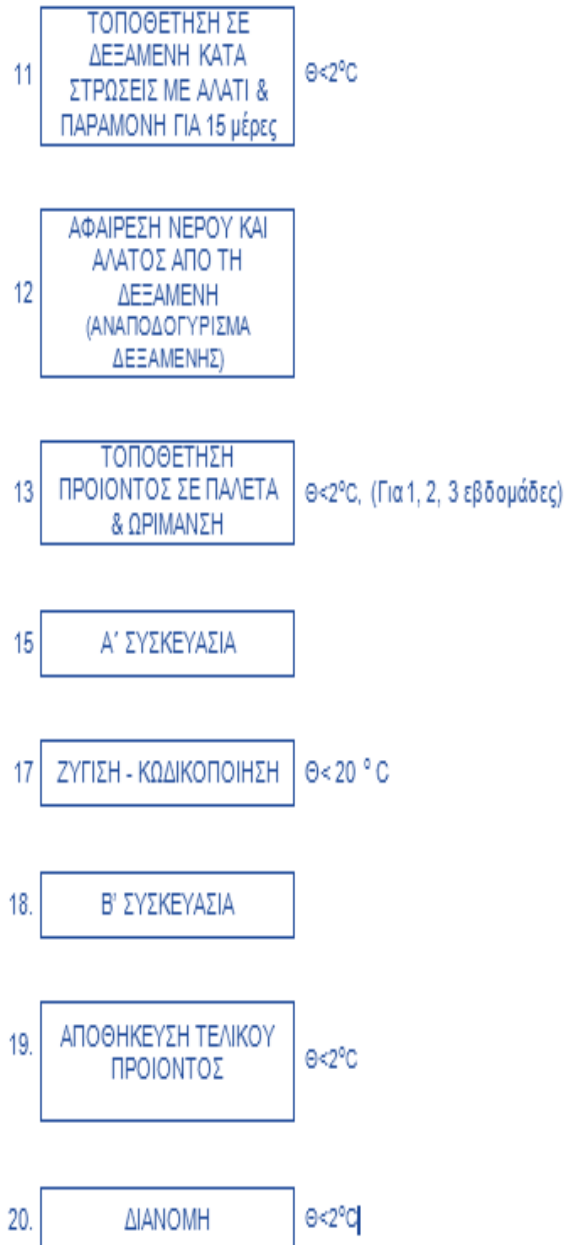
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

Προϊόν αλίευσης: Μπακαλιάροι (*Gadus morhua*) άνευ κεφαλής block σε γ/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.





Τα φιλέτα υγράλατου 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 50 ± 5 g το καθένα, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Oliveira et al. (2014).

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς του *S. aureus* κατά τη διαδικασία του ζαρμυρίσματος στα δείγματα της ενοφθαλμίστηκε το παθογόνο σε πληθυσμούς περίπου $4 \log$ cfu/g σάρκας υγράλατου μπακαλιάρου, σύμφωνα με τους Ekhtiartzadeh et al. (2012).

Κάθε ένα δείγμα τοποθετήθηκε σε γυάλινη φιάλη 600 ml με αναλογία μάζας φιλέτου / νερού 1:9 (Barat et al., 2004; Andres et al., 2005; Oliveira et al., 2015). Κάθε 12 ώρες το απεσταγμένο νερό των δοχείων αδειάζονταν και αναπληρώνονταν με νέο νερό.

Τέλος, όλα τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες που συντηρήθηκαν αντίστοιχα σε 3 θερμοκρασίες $5 \pm 1^\circ \text{C}$, $10 \pm 1^\circ \text{C}$ και $20 \pm 1^\circ \text{C}$ για 72 ώρες, προσομοιάζοντας ορθή και μη ορθή θερμοκρασία ξαρμυρίσματος.

Φυσικοχημικός έλεγχος

Από κάθε μια από τις 3 ομάδες δειγμάτων λαμβάνονταν δείγμα και πραγματοποιούνταν εξέταση την ώρα 0 και στη συνέχεια κάθε 12 ώρες και συγκεκριμένα τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60, και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αλάτι, του συντελεστή ενεργού νερού (a_w) και του pH. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε αλάτι γινόταν σύμφωνα με τον AOAC 1995. Το pH των δειγμάτων προσδιοριζόταν με πεχάμετρο (pH meter WTW, type 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Germany).

Μικροβιολογική Ανάλυση

Από κάθε μια από τις 3 ομάδες δειγμάτων λαμβάνονταν 2 δείγματα και πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές εξετάσεις την ώρα 0 και στη συνέχεια κάθε 12 ώρες και συγκεκριμένα τις ώρες 0, 12, 24, 36, 48, 60, και 72 μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι το τέλος του ξαρμυρίσματος για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των *Enterobacteriaceae* και του *S. aureus*. Την ημέρα 0 πραγματοποιήθηκε επιπλέον μικροβιολογικός έλεγχος των φιλέτων υγρού μπακαλιάρου, ώστε να καθοριστεί η κατάσταση της πρώτης ύλης.

Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες ποσότητα 25 g σάρκας υγρού μπακαλιάρου από κάθε ένα από τα 2 δείγματα δοχείο στις διάφορες θερμοκρασίες, τοποθετούνταν 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, γινόταν δε ενοφθαλμισμός σε διπλά τρυβλία.

OMX

Ο προσδιορισμός της OMX, εκτιμήθηκε με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA, LAB M), με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO 4833 : 2013.

Τα τρυβλία επωάζονταν στους $30 \pm 1^\circ \text{C}$ για 72 ± 3 ώρες για την OMX και στους 7°C για 7 ημέρες για τα ψυχρόφιλα βακτήρια. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες που αναπτύσσονταν στο τρυβλίο, ανεξαρτήτως μεγέθους, χρώματος ή σχήματος.

Enterobacteriaceae

Ο προσδιορισμός των *Enterobacteriaceae*, εκτιμήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO 21528 – 2 : 2004. Ποσότητα 1 ml από την αρχική αραιώση αλλά και από επόμενες δεκαδικές αραιώσεις, μεταφέρθηκε με στείρο τρόπο σε κενά τρυβλία και

ακολούθησε προσθήκη 15 – 20 ml θρεπτικού υλικού Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA – LAB M). Μετά την ομοιόμορφη διασπορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο και τη στερεοποίηση του υλικού, έγινε επιστιβάδευση ποσότητας 10 ml περίπου από το παραπάνω υλικό, για δημιουργία μικροαερόφιλων συνθηκών. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν στους $37 \pm 1^\circ \text{C}$ για 24 – 48 ώρες. Ως *Enterobacteriaceae* καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες ροζ – κόκκινου ή μωβ χρώματος με ή χωρίς άλω, ανεξαρτήτου μεγέθους.

S. aureus

Τέλος, ο προσδιορισμός του πληθυσμού του *S. aureus*, πραγματοποιήθηκε στο εκλεκτικό υλικό Baird Parker agar (Baird Parker agar – Oxoid, UK), με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως και 10^{-4} , μεταφέροντας 1 ml από την αρχική αραιώση σε 9 ml MRD. Από την αρχική και τις επόμενες δεκαδικές αραιώσεις, ποσότητα 0,1 ml θα προστέθηκε στην επιφάνεια καλά στεγνωμένων τρυβλίων που περιέχουν Baird Parker agar. Με στείρα κεκαμμένη ράβδο, έγινε επιφανειακή εξάπλωση του ενοφθαλμίσματος στο υλικό και ακολουθούσε επώαση 18 – 24 ωρών στους 37°C .

Η παρασκευή όλων των θρεπτικών υλικών πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή τους και συντηρήθηκαν σε ψυγείο στους $4^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$.

Στατιστική επεξεργασία

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 $P < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Φυσικοχημικός έλεγχος

Ο φυσικοχημικός έλεγχος των αρχικών δειγμάτων (0 h) έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε αλάτι ήταν 19,5%, το a_w 0,75 και το pH 6,44. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από άλλους ερευνητές, όπου η περιεκτικότητα σε NaCl του υγράλατου μπακαλιάρου βρέθηκε να κυμαίνεται από 16 έως 20% και ο συντελεστής ενεργού νερού περίπου 0,73 έως 0,75 (Rodrigues et al. 2003, Oliveira et al. 2012).

Στο τέλος της διαδικασίας ξαμυρίσματος (72 h) και στις 3 θερμοκρασίες (5° C, 10° C και 20° C) η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 1,9 % , το a_w 0,975 και το pH 6,88. Η ενυδάτωση του υγράλατου μπακαλιάρου και η μείωση της περιεκτικότητας σε NaCl κατά τη διαδικασία του ξαμυρίσματος ήταν ταχύτερη στους 20 ° C σε σχέση με τους 10 ° C και με τους 5 ° C. Έτσι, στις 24 ώρες η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl για τους 5° C, 10° C και 20° C ήταν 6,4%, 4,2% και 2,7%, αντίστοιχα. Ομοίως, οι Oliveira et al. (2012) σε παρόμοια μελέτη βρήκαν ότι μετά από διαδικασία ξαμυρίσματος υγράλατου μπακαλιάρου για 72 ώρες σε θερμοκρασίες 5° C, 10° C και 15° C, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν περίπου 2% και το ποσοστό υγρασίας από 82 έως 82,6%, ενώ ο ρυθμός ενυδάτωσης του προϊόντος και απομάκρυνσης του NaCl αυξανόταν ανάλογα με τη την αύξηση της θερμοκρασίας.

Μικροβιολογική ανάλυση

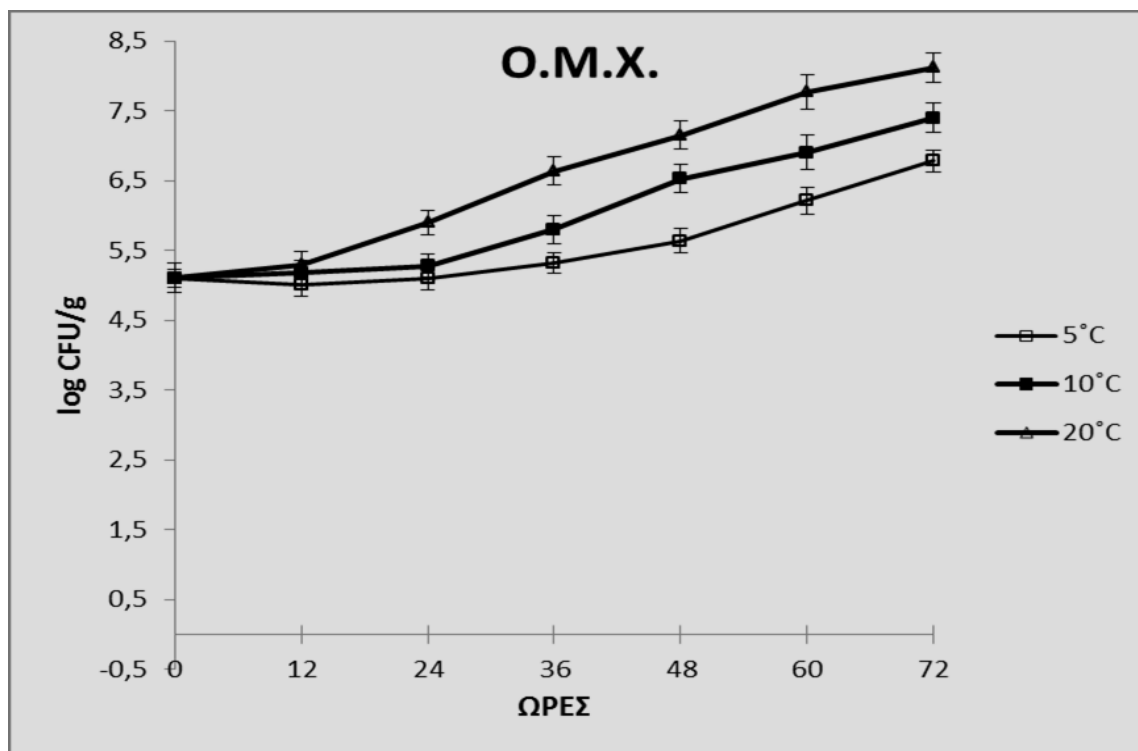
Οι πληθυσμοί για την OMX, των εντεροβακτηρίων και του *S. aureus*, στις 3 διαφορετικές ομάδες δειγμάτων υγράλατου μπακαλιάρου στους 5 ± 1° C, 10 ± 1° C και 20 ± 1° C παρουσιάζονται στα σχήματα 1 έως 3, αντίστοιχα.

O.M.X.

Οι αρχικοί πληθυσμοί για την OMX ήταν 5,1 log cfu/g και στη συνέχεια εμφάνισαν ανάπτυξη στους 5° C φτάνοντας στους 6,7 log cfu/g στις 72 ώρες (Σχήμα 1). Ομοίως, στους 10 ° C οι πληθυσμοί της O.M.X. αναπτύχθηκαν μετά τις 24 ώρες και έφτασαν τους 7,4 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για την O.M.X. στα δείγματα που έγινε το ξαμύρισμα στους 10 ° C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ($P<0.05$) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5° C. Αντίστοιχα, για τα δείγματα που ξαμυρίστηκαν στους 20 ° C οι πληθυσμοί της O.M.X. παρουσίασαν αύξηση και έφτασαν τους 8,1 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ($P<0.05$) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 ° C. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα που ξαμυρίστηκαν στους 10 ° C και στους 20 ° C έδειξε ότι οι πληθυσμοί της O.M.X. ήταν μεγαλύτεροι από 7 log cfu/g που θεωρείται το ανώτερο όριο αποδοχής των αλιευμάτων την 72^η και από την 60^η ώρα, αντίστοιχα (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF 1986).

Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα εργασία αναφέρονται από τους Oliveira et al. (2014), οι οποίοι βρήκαν ότι σε δείγματα υγράλατου μπακαλιάρου που ξαμυρίστηκε σε 3 θερμοκρασίες 5° C, 10° C και 15° C για 72 ώρες οι πληθυσμοί της O.M.X. στους 10 και 15° C, ξεκίνησαν να αναπτύσσονται την 36^η και 24^η ώρα, αντίστοιχα. Αυτό

αποδόθηκε στον αυξημένο ρυθμό ενυδάτωσης και μείωσης της περιεκτικότητας σε αλάτι σε σχέση με τους 5° C. Πράγματι και στην παρούσα εργασία στις 36 ώρες στους 10° C και στις 24 ώρες στους 20 ° C, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε NaCl ήταν 3,5% και 2,6%, αντίστοιχα. Ανάλογη ήταν η αύξηση του συντελεστή ενεργού νερού ο οποίος στις 36 ώρες στους 10° C και στις 24 ώρες στους 20 ° C είχε φτάσει περίπου το 0,97 που σε σχέση με το μειωμένο αλάτι δεν είναι ιδιαίτερα αποτρεπτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

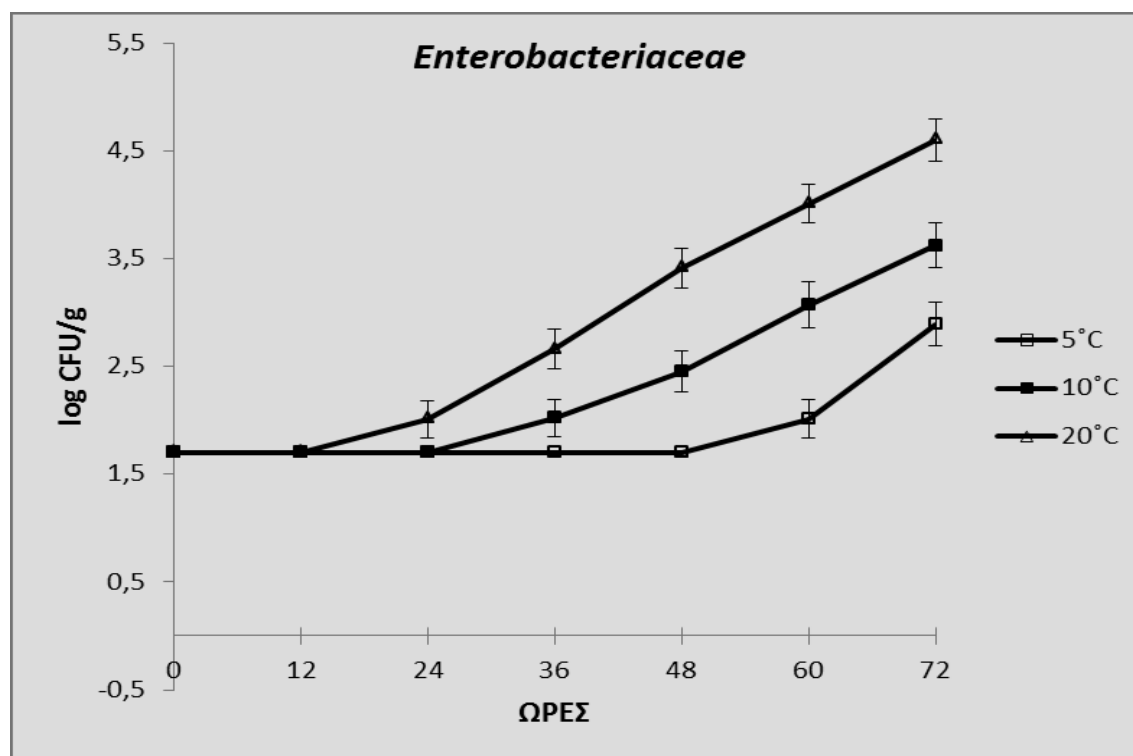


Σχήμα 1. Μεταβολή των πληθυσμών της O.M.X. σε υγράλατο μπακαλιάρο κατά τη διαδικασία ξαρμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.

Enterobacteriaceae

Οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων στα δείγματα στους 5 °C βρίσκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι και τις 48 ώρες, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 2,89 log cfu/g την 72^η ώρα (Σχήμα 2). Αντίστοιχα, στους 10 °C οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων παρέμειναν <2 log cfu/g μέχρι και τις 24 ώρες και στη συνέχεια παρουσίασαν αύξηση φτάνοντας τους 3,62 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για τα *Enterobacteriaceae* στα δείγματα που έγινε το ξαρμύρισμα στους 10 °C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ($P<0.05$) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5 °C. Τέλος, για τα δείγματα που ξαρμυρίστηκαν στους 20° C οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων παρουσίασαν αύξηση από τις 24 ώρες και έφτασαν τους 4,6 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ($P<0.05$) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10 °C.

Σε συμφωνία με την παρούσα εργασία, οι Oliveira et al. (2014) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων σε δείγματα υγρού μπακαλιάρου, που ξαμυρίστηκε στους 5° C, 10° C και 15° C για 72 ώρες, παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) μέχρι την 36^η και 24^η ώρα στους 10 και 15° C, αντίστοιχα. Αυτό αποδόθηκε στη μειωμένη περιεκτικότητα σε αλάτι και την αυξημένη θερμοκρασία εκείνη τη χρονική στιγμή, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 2. Μεταβολή των πληθυσμών των *Enterobacteriaceae* σε υγρό μπακαλιάρo κατά τη διαδικασία ξαμυρίσματος στους 5 °C (-Δ-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-□-) για 72 ώρες.

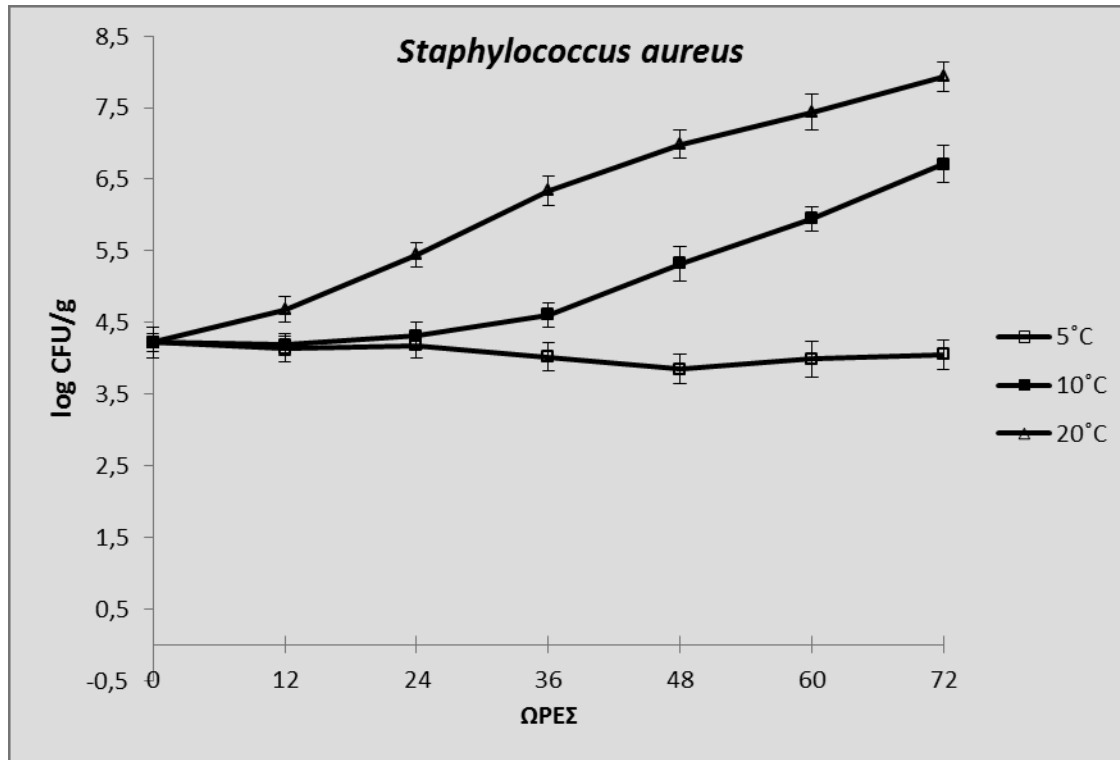
S. aureus

Οι αρχικοί πληθυσμοί για το *S. aureus* ήταν 4,22 log cfu/g και στη συνέχεια παρουσίασαν μικρή μείωση στους 5° C φτάνοντας στους 4,06 log cfu/g στις 72 ώρες (Σχήμα 3).

Στους 10 ° C οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού αναπτύχθηκαν μετά τις 24 ώρες και έφτασαν τους 6,71 log cfu/g στις 72 ώρες. Οι πληθυσμοί για το *S. aureus* στα δείγματα που έγινε το ξαμύρισμα στους 10 ° C, παρέμειναν σημαντικά υψηλότεροι ($P < 0.05$) από τις 36 ώρες και μέχρι τις 72 ώρες σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 5° C.

Τέλος, για τα δείγματα που ξαμυρίστηκαν στους 20° C οι πληθυσμοί του *S. aureus* παρουσίασαν αύξηση από τις 24 ώρες και έφτασαν τους 7,9 log cfu/g στις 72 ώρες, παραμένοντας σημαντικά υψηλότεροι ($P < 0.05$) από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων στους 10° C.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη της συμπεριφοράς του *S. aureus* κατά τη διαδικασία του ξαρμυρίσματος του υγρού μπακαλιάρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ξαρμύρισμα του τροφίμου σε θερμοκρασίες 10 °C και 20 °C είχε ως αποτέλεσμα από τις 48 και 36 ώρες και μέχρι το τέλος της διαδικασίας οι πληθυσμοί του παθογόνου να είναι ιδιαίτερα υψηλοί αποτελώντας κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Αντίθετα, στους 5 °C το ξαρμύρισμα του υγρού μπακαλιάρου αποτελεί μια διαδικασία που ολοκληρώνεται ιδανικά περίπου στις 48 ώρες (NaCl περίπου 3,5%, a_w 0,97 και υγρασία 82%) με πληθυσμούς του *S. aureus* που δεν παρουσιάζουν σημαντικούς κινδύνους για την ασφάλεια του καταναλωτή.



Σχήμα 3. Μεταβολή των πληθυσμών *S. aureus* σε υγρό μπακαλιάρο κατά τη διαδικασία ξαρμυρίσματος στους 5 °C (-□-), στους 10 °C (■) και στους 20 °C (-▴-) για 72 ώρες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο υγράλατος μπακαλιάρος είναι ένα ιδιαίτερα δημοφιλές τρόφιμο ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες (Oliveira et al. 2012). Το προϊόν είναι ιδιαίτερα σταθερό λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε αλάτι (19%) και του χαμηλού συντελεστή a_w (περίπου 0,75). Η διαδικασία του ξαμυρίσματος είναι απαραίτητο στάδιο στην προετοιμασία του, αποτελεί όμως μια ιδιαίτερα χρονοβόρο διαδικασία που μπορεί να υπερβεί και τις 48 ώρες.

Δυστυχώς, η μη διάθεση, σε επίπεδο λιανικής πώλησης, στον καταναλωτή σαφών και ορθών οδηγιών για τη σωστή διαδικασία ξαμυρίσματος σε συνδυασμό με τη διάχυτη πεποίθηση των καταναλωτών ότι ο υγράλατος μπακαλιάρος λόγω της πολύ υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι, αποτελεί ένα απόλυτα ασφαλές προϊόν, έχει ως αποτέλεσμα η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

Επίσης, ο *S. aureus* αποτελεί έναν παθογόνο μικροοργανισμό που μπορεί να επιβιώσει σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και προτείνεται να εξετάζεται σε επίπεδο τελικού προϊόντος στα πλαίσια της ασφάλειας του συγκεκριμένου τροφίμου (Köse 2010). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το παθογόνο μπορεί να φτάσει σε υψηλούς πληθυσμούς, επικίνδυνους για τη δημόσια υγεία, όταν ο υγράλατος μπακαλιάρος ξαμυρίζεται σε θερμοκρασίες 10° C και 20° C, αντίθετα με τους 5 ° C. Συνεπώς, πρέπει ο υγράλατος μπακαλιάρος να εξετάζεται σε επίπεδο τελικού προϊόντος για τον πληθυσμό του *S. aureus* και ίσως την παρουσία τοξίνης.

Τέλος προτείνεται ότι σε επίπεδο λιανικής πώλησης πρέπει να γίνεται ενημέρωση του καταναλωτή για την ορθή διαδικασία ξαμυρίσματος σε θερμοκρασία ψύξης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aas GH, Skjerdal OT, Stoknes I, Bjørkevoll I. 2010. Effects of packaging method on salt-cured cod yield and quality during storage. *J Aquat Food Prod Technol* 19:149–61.
2. Abee, T., Wouters, J.A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology* 50, 65-91.
3. Abraham, A., Sergelidis, D., Kirkoudis, I., Anagnostou, V., Kaitsa-Tsiopoulou, E., Kazila, P., Papa, A., 2010. Isolation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in freshwater fish and Greek marketplaces. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19 (2), 93-102.
4. Acha P.N., Szyfres B., *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, vol. I: Bacterioses and Mycoses, vol. II: Chlamydioses, Rickettsioses and Viruses, vol. III: Parasitoses, third ed., Pan American Health Organization, Washington, 2003
5. Akhondzadeh, A., Misaghi, A. and Kamkar, A., 2006. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Control*, 17 (3), 183-188.
6. Akse L, Gundersen B, Lauritzsen K, Ofstad R, Solberg T. 1993. Salt fish. Report No. 1. Tromsø, Norway: Norwegian Inst. of Fisheries and Aquaculture (Fiskeriforskning). p 1–61.
7. Alarcón, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology* 100, 352-364.
8. Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerging infectious diseases*. 1997;3(3):285-93.
9. Andres, A., Rodriguez-Barona, S., Barat, J. M., & Fito, P. (2002). Note: Mass transfer kinetics during cod salting operation. *Food Science and Technology International*, 8(5), 309-314.
10. Andres A, Rodriguez-Barona S, Barat JM. 2005a. Analysis of some cod-desalting process variables. *J Food Eng* 70:67–72.
11. Andres, A., Rodriguez-Barona, S., Barat, J. M., & Fito, P. (2005b). Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 467-471.
12. Andrew, A.E. 2001. *Fish processing technology*. University of Ilorin press, Nigeria. Pp. 7 8.
13. Anon. 1967. Causas do amarelecimento do bacalhau salgado. *Conservas de peixe* 257:17–20.
14. Asperger H, Zangerl P (2003) *Staphylococcus aureus*. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF. (eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press and Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp 2563–2569.
15. Ayulo A.M., Machado R.A., Scussel V.M. (1994): Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 171–178.
16. Bakowski, M., Riewe, J., Borys, A., & Straszewski, T. (1970). Effect of brine volume on salt content of bacon sides and bacon cuts. *Gospodarka Miesna*, 22(8/9), 16-19.

17. Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61, 1-10.
18. Balaban N, Goldkorn T, Nhan RT, Dang LB, Scott S, Ridgley RM, et al. Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science*. 1998;280(5362):438-40.
19. Barat, J. M., Rodriguez-Barona, S., Andres, A., & Fito, P. (2002). Influence of increasing brine concentration in the cod-salting process. *Journal of Food Science*, 67(5), 1922-1925.
20. Barat, J. M., Rodriguez-Barona, S., Andres, A., & Fito, P. (2003). Cod salting manufacturing analysis. *Food Research International*, 36(5), 447-453.
21. Barat JM, Rodríguez-Barona S, Andrés A, Visquert M. 2004b. Mass transfer analysis during the cod desalting process. *Food Res Intl* 37:203–8.
22. Barat JM, Rodríguez-Barona S, Castell 'o M, Andrés A, Fito P. 2004c. Cod desalting process as affected by water management. *J Food Eng* 61:353–7.
23. Barat JM, Gallart-Jornet L, Andres A, Akse L, Carlehog M, Skjerdal OT. 2006. Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. *J Food Eng* 73:9–19.
24. Barat JM, Rodriguez-Barona S, Andres A, Ibanez JB. 2004a. Modeling of the cod desalting operation. *J Food Sci* 69:183–9.
25. Barg, N. L. and Harris, T. (1997) Toxin-mediated syndromes. In *The staphylococci in human disease*. (ed.: Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 527-543. Churchill Livingstone, New York, NY.
26. Beard-Pegler, M. A., Stubbs, E. and Vickery, A. M. (1988) Observations on the resistance to drying of staphylococcal strains. *J. Med. Microbiol.* 26, 251- 255.
27. Beatty SA, Fougere H. 1957. The processing of dried salted fish. *Bulletin No. 112*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada.
28. Beck HS, Wise WS, Dodd FH. Cost benefit analysis of bovine mastitis in the UK. *The Journal of dairy research*. 1992;59(4):449-60.
29. Bergdoll MS. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Staphylococcus aureus*. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. 1991;74(4):706-10.
30. Bergdoll MS (1967) The staphylococcal enterotoxins. In: Mateles RI, Wogan GN (eds) *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*. MA: MIT Press, Cambridge, pp 1–25.
31. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Danis JP (1991) A new staphylococcal enterotoxins, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancett* 9:1007.
32. Bergdoll MS, Crass, BA, Reiser RF, Robbins RN, Lee AC, Chensey PJ, Danis JP, Vergerott JM, Wand PJ (1982) An enterotoxin-like protein *Staphylococcus aureus* strains form patients with toxic schock syndrom. *Ann Inter Med* 96(2):969.
33. Bhatia, A., Zahoor, S., 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J. Clin. Diagnoses Res.* 1, 188–197.
34. Birkeland, S., Akse, L., Joensen, S., Tobiassen, T., & Skara, T. (2007). Injection-Salting of pre rigor Fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 72, 29-35.
35. Birkeland, S., Skara, T., Bjerkeng, B., & Rora, A. M. B. (2003). Product Yield and Gaping in Cold-smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets as Influenced by Different Injection-salting Techniques. *Journal of Food Science*, 68(5), 1743-1748

36. Bjarnason J. 1986. Fishhandler's manual. Curing of salt fish. 2nd ed. Reykjav'ík: Icelandic Fisheries Laboratories.
37. Bjørkevoll I, Olsen RL, Skjerdal OT. 2003. Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *Intl J Food Microbiol* 84: 175–87.
38. Bjørkevoll I, Olsen J-V, Olsen RL. 2004. Rehydration of salt-cured cod using injection and tumbling technologies. *Food Res Intl* 37:925–31.
39. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R. (1957) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th edn. Williams & Wilkins. Baltimore, MD.
40. Bogason SG. 1987. Salting of cod fillets. *Fiskvinnslan* 4:39–44.
41. Boerema JA, Clemens R, Brightwell G (2006) Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 107(2):192–201
42. Bohach, G. A., Dinges, M. M., Mitchell, D. T., Ohlendorf, D. H. and Schlievert, P. M. (1997) Exotoxins. In *The Staphylococci in human disease* (ed.: Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 83- 111. Churchill Livingstone. New York, NY.
43. Bohach, G.A., D. J. Fast, R. D. Nelson, and P. M. Schlievert. 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit. Rev. Microbiol.* 17(4):251-272
44. Boles, J., & Swan, E. (1997a). Effects of brine ingredients and temperature on cook yields and tenderness of prerigor processed roast beef. *Meat Science*, 45(1), 87-97.
45. Boles, J. A., & Swan, J. E. (1997b). Effects of brine ingredients and temperature on cook yields and tenderness of pre-rigor processed roast beef. *Meat Science*, 45(1), 87-97.
46. Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Rode, T.M., Holck, A., 2007. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* 153, 2289–2303.
47. Borgstrom G. 1968. Salting (curing) and smoking. In: Borgström G, editor. *Food technology*. New York: Macmillan Co. p 273–89.
48. Bos R, van Duikeren S, van Hall T, Lauwen MM, Parrington M, Berinstein NL, et al. Characterization of antigen-specific immune responses induced by canarypox virus vaccines. *J Immunol.* 2007;179(9):6115-22.
49. Boyce, J. M. (1997) Epidemiology and prevention of nosocomial infections, p. 309-329. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, NY.
50. Bras A, Costa R. 2010. Influence of brine-salting prior to pickle salting in the manufacturing of various salted-dried fish species. *J Food Eng* 100: 490–5.
51. Brunk, M. (1985). [Injection of brine into fish fillets.] *Einspritzen von Salzlake in Fischfilets.*, Arbeiten aus dem Institut für Biochemie und Technologie; No. 2. Hamburg: Inst. für Biochem. & Tech. der Bundesforschungsanstalt für Fischerei
52. Callow, E. H. (1947). The Action of Salts and other Substances Used in the Curing of Bacon and Ham. *British Journal of Nutrition*, 1(2-3), 269-274.
53. Chesney PJ, Halsey NA, Marcy SM. Treatment of bacterial infections. *The New England journal of medicine.* 1997;337(11):793-4.
54. Chordash RA, Potter NN (1976) Stability of staphylococcal enterotoxin A to selected conditions encountered in foods. *J Food Sci* 41:906– 909.
55. Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas P., 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic

- strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology* 118, 304-311.
56. Codex Alimentarius. 2003. Code of practice for fish and fishery products. CAC/RCP 52. Rome: FAO/WHO. 134 p.
 57. Codex Stan 167, 1995. Codex Standard for Salted Fish and Dried Salted Fish of the Gadidae Family of Fishes. Codex Stan 167-1989, Rev. 1, 10 p.
 58. Cohen DM, Inada T, Iwamoto T, Scialabba N. 1990. FAO species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol 10. Rome: FAO. 442 p.
 59. Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B., 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes* 19, 299-305.
 60. Cretenet, M., Even, S., Le-Loir, Y., 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. Technol.* 91, 127–150.
 61. Da-Silva, M.L., Matté, G.R., Germano, P.M.L., Matté, M.H., 2010. Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in São Paulo, Brazil. *Journal of Food Safety* 30, 94-110.
 62. Davis, J. P., P. J. Chesney, P.J. Wand, and M. LaVenture. 1980. Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors and prevention. *N. Engl. J. Med.* 303:1429-1435.
 63. DeVita, M.D., Wadhwa, R.K., Theis, M.L., Ingham, S.C., 2007. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *J. Foodserv.* 18, 76–79.
 64. Dias, J.F., Filipe, J.C., Guia, F., Menezes, R., and Guerreiro, V. 2001. A saga do “fiel amigo”: As indústrias portuguesas do bacalhau. *Global Econ. Manag.* 1: 1-11.
 65. Di Luccia A, Alviti G, Lamacchia C, Faccia M, Gambacorta G, Liuzzi V, Spagna Musso S. 2005. Effect of the hydration process on water-soluble proteins of preserved cod products. *Food Chem* 93:385–393.
 66. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34, table of contents.
 67. Doe PE, Heruwati ES. 1988. A model for the prediction of the microbial spoilage of sun-dried tropical fish. *J Food Eng* 8:47–72.
 68. Duerr, J. D., & Dyer, W. J. (1952). Proteins in fish muscle. IV. Denaturation by salt. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 8(5), 325-331
 69. Dussault HP. 1962. Enumeration of coliform bacteria in light salted fish brines. *J Fisheries Res Board Can* 19:437–44.
 70. EFSA, 2006. The Community summary reports on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA J.* 94, 1–288.
 71. EFSA, 2007. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J.* 130, 1–352.
 72. EFSA, 2009a. The Community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *EFSA J.* 271, 1–102.

73. EFSA, 2009b. Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and food. EFSA Sci. Rep. 301, 1–10.
74. EFSA, 2010. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA J. 8, 1–368.
75. EFSA, 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J. 9, 1–378.
76. EFSA, 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J. 10, 1–442.
77. EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control, 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal 8 (1), 1496.
78. Eklund M.W., Peterson M.E., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Pelroy G.A. (2004): Control of bacterial pathogens during processing of cold-smoked and dried salmon strips. J. Food Protect., 67, 347–351.
79. FAO. 2010. Species Fact Sheets. *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). FAO Fisheries and Aquaculture Department. Available from: <http://www.fao.org/fishery/species/2218/en>.
80. FAO, 2012. Fishery and aquaculture statistics, 2010th ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
81. FDA, 2012. *Staphylococcus aureus*, in: Lampel, K.A., Al-Khaldi, S., Cahill, S.M. (Eds.), Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Second Edition. Center for Food Safety and Applied Nutrition, pp. 87–92.
82. Fernandez-Segovia I, Escriche I, Fuentes A, Serra JA. 2007. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods. Intl J Food Microbiol 116:64–72.
83. Fernandez-Segovia I, Escriche I, Gómez-Sintes M, Fuentes A, Serra JA. 2006. Influence of different preservation treatments on the volatile fraction of desalted cod. Food Chem 98:473–82.
84. Freixenet, L. (1993). [Spray injection of meat. Influence of the brine pressure on quality of injected products.] Spruehinjektion bei Fleisch. Einfluss des Poekellakedruckes auf die Qualitaet der Produkte. Fleischwirtschaft, 73(5), 504, 506, 509-510, 512, 514.
85. Freixo J, Botelho AT. 1947. Alteracao vermelha do bacalhau “Rouge”. Boletim da Pesca 14:3–17.
86. Fujii T, Ishida Y, Kadota H. 1977. Changes in microflora during storage at low temperature of salted fish. Bull Jpn Soc Sci Fisheries 43:1241–7.
87. Garrido, V., Vitas, A.I., García-Jalón, I., 2009. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. Food Control 20 (11), 986-991.
88. Genigeorgis C, Foda MS, Mantis A, Sadler WW (1971) Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. Appl Microbiol 21:862–866
89. Genigeorgis C, Riemann H, Sadler WW (1969) Production of enterotoxin B in cured meats. J Food Sci 34:62–68.

90. Gentry, L. O. (1997) Osteomyelitis and other infections of bones and joints. In *The Staphylococci in human disease* (ed. Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 455- 573. Churchill Livingstone. New York, NY.
91. Gomez R, Fernandez-Salguero J. 1993. Note: water activity of Spanish intermediate-moisture fish products. *Rev Espanola De Ciencia Y Technol De Allimentos* 33:651–6.
92. González-Rodríguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. Á., Otero, A., & García-López, M. L. (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International journal of food microbiology*, 77(1), 161-168.
93. Gormley, F.J., Little, C.L., Rawal, N., Gillespie, I.A., Lebaigue, S., Adak, G.K., 2011. A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008). *Epidemiol. Infect.* 139, 688–699.
94. Hall GM. 1997. *Fish processing technology*. 2nd ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. 292 p.
95. Hennekinne, J.-A., De-Buyser, M.-L., Dragacci, S., 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 815–836.
96. Hermes, E.J., 2006. *Manual of fish Handling and Processing*. EC-Cambodia Project on Standards, Quality and conformity Assessment. EuropeAid/120277/C/SV/KH.
97. Herrera, F. C., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2006). Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of applied microbiology*, 100(3), 527-536.
98. Hess E. 1942b. Studies on salt fish: VII. Red halophilic bacteria in seawater and fish slime and intestines. *J Fisheries Res Board Can* 5:438–9.
99. Hess E. 1942c. Studies on salt fish: IX. Effect of environment upon growth of red halophilic bacteria. *J Fisheries Res Board Can* 6a:10–6.
100. Hess E, Gibbons NE. 1942. Studies on salt fish: X. Effect of disinfectants and preservatives on red halophilic bacteria. *J Fisheries Res Board Canada* 6a:17–23.
101. Hirooka EY, DeSalzberg SPC, Bergdoll MS (1987) Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. *J Food Protect* 50:952–955.
102. Horner WFA. 1992. Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: Hall GM, editor. *Fish processing technology*. London: Blackie Academic and Professional. p 31–71.
103. Hucker, G. J., & Breed, R. S. (1948). Genus *Micrococcus*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
104. Huis in tVeld., J.H.J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 1 18.
105. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, et al. (2007) Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189: 8719-8726.
106. Huss HH, Valdimarsson G. 1990. *Microbiologia de pescado salado*. *FAO Fisheries Tech News* 10:1–2.
107. Huss, H.H. 1994. Assurance of seafood quality. *FAO Fish. Tech. Paper No. 334*. Rome, FAO, 169 p.
108. Huss, H.H., Dalgaard, P., and Gram, L. 1997. Microbiology of fish and fish products. In: *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to*

- Quality. J.B. Luten, T. Børresen, J. Oehlenschläger (Eds.), pp. 413-430, Elsevier Science BV, Amsterdam.
109. Ing M.B., Baddour L.M. and Bayer A.S.: 'Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis and complications'. In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley K.B., Archer G.L. (ed), 1: 331-54, New York: Churchill Livingstone, 1997.
 110. Ishida Y, Fujii T, Kadota H. 1976. Microbiological studies on salted fish stored at low temperatures – I. Chemical and microbial changes of salted fish during storage. *Bull Jpn Soc Sci Fisheries* 42:351–8.
 111. Jablonski LM, Bohach G (1997) *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Monteville TJ. (eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC, pp 353–357.
 112. James, W. D. and Roth, R. R. (1992) *Skin microbiology*. In *Encyclopedia of microbiology*, vol. 4, pp. 23-32. Academic Press. San Diego, CA.
 113. Jason AC. 1965. Drying and dehydration. In: Borgstrom G, editor. *Fish as food*, vol. III. New York: Academic Press. p 1–54.
 114. Jason AC, Peters GR. 1973. Analysis of bimodal diffusion of water in fish muscle. *J Phys D: Appl Phys* 6:512–21.
 115. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rovik LM (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol* 99:158–167
 116. Kaneko J, Kamio Y (2004) Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 981-1003.
 117. Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369–375.
 118. Kester, C. T., Adelekan, A. O., & Ajose, D. J. (2012). Assessment of the microbial hazardous status of cold-smoked Atlantic Cod, *Gadus morhua*, retailed in some selected markets in Ota, Ogun State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(18), 3970-3975.
 119. Kloos, W. E. and Schleifer, K. -H. (1986) Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2 (ed.: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.), pp. 1013-1035. Williams & Wilkins. Baltimore, MD.
 120. Kloos, W. E. (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in human disease* (ed.: Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 113-137. Churchill Livingstone. New York, NY.
 121. Knight, P., & Parsons, N. (1988). Action of NaCl and polyphosphates in meat processing: Responses of myofibrils to concentrated salt solutions. *Meat Science*, 24(4), 275-300.
 122. Kumar, R., Surendran, P.K., Thampuran, N., 2009. Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. *Food Control* 20, 376-380
 123. Lambert, L. H., Cox, T., Mitchell, K., Rosselló-Mora, R. A., del Cueto, C., Dodge, D. E., Orkand, P. and Cano, R. J. (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 511-518.
 124. Lauritzsen K, Akse L, Gundersen B, Olsen RL. 2004. Effects of calcium, magnesium and pH during salt-curing of cod (*Gadus morhua* L.). *J Sci Food Agric* 84:683–92.

125. Larsen R, Elvevoll EO. 2008. Water uptake, drip losses and retention of free amino acids and minerals in cod (*Gadus morhua*) fillet immersed in NaCl or KCl. *Food Chem* 107:369–76.
126. Lawrie, R. (1998a). The storage and preservation of meat II. Moisture control. *Lawrie's Meat Science* (pp. 178-199). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
127. Lawrie, R. A. (1998b). The structure and growth of muscle. *Lawrie's Meat Science*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited
128. Lawrynowicz-Paciorek, M., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A., Windyga, B., 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 319–323.
129. Lee JH. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Veterinary microbiology.* 2006;114(1-2):155-9.
130. Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and environmental microbiology.* 2003;69(11):6489-94.
131. Le-Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2:63-76.
132. Lindkvist KB, Gallart-Jornet L, Stabell MC. 2008. The restructuring of the Spanish salted fish market. *Can Geographer/Le G' eographe Can* 52:105–20.
133. Linton EP, Wood AL. 1945. Drying of heavily-salted fish. *J Fisheries Res Board Can* 6d:380–91.
134. Lorentzen G, Mennen S, Olsen RL, Skjerdal T. 2011. Invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains of caco-2 cells in response to a period of extreme salt stress reflecting salt-curing and rehydration of cod (*Gadus morhua* L.). *Food Control* 22:1040–5.
135. Lorentzen G, Olsen RL, Bjørkvoll I, Mikkelsen H, Skjerdal T. 2010a. Survival of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in muscle of cod (*Gadus morhua* L.) during salt-curing and growth during chilled storage of rehydrated product. *Food Control* 21:292–7.
136. Lorentzen G, Ytterstad E, Olsen RL, Skjerdal T. 2010b. Thermal inactivation and growth potential of *Listeria innocua* in rehydrated salt-cured cod prepared for ready-to-eat products. *Food Control* 21:1121–6.
137. Lupin HM, Boeri RL, Moschiar SM. 1981. Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. *J Food Technol* 16:31–8.
138. Magnusson, H. 2006. Microbiological changes during storage of salted cod fillets. *Icelandic Fisheries Report summary.*
139. Magnusson H, Sveinsdottir K, Lauzon HL, Thorkelsdottir A', Martinsdottir E. 2006. Keeping quality of desalted cod fillets in consumer packs. *J Food Sci* 71:M69–76.
140. Marchese, A., Balistreri, G., Tonoli, E., Debbia, E. A. and Schito, G. C. (2000) Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains isolated in a large Italian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 38, 866-869.
141. Margeirsson S, Jonsson GR, Arason S, Thorkelsson G. 2007. Influencing factors on yield, gaping, bruises and nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets. *Journal of Food Engineering* 80:503-508.
142. Martinez-Alvarez O. 2002. Desalado del bacalao (*Gadus morhua*) seco salado y su conservaci'on en fresco. *Alimentacion, Equipos y Tecnol (Madrid)* 169:51–4.

143. Martínez-Alvarez O, Gómez-Guillén MC. 2005. The effect of brine composition and pH on the yield and nature of water-soluble proteins extractable from brined muscle of cod (*Gadus morhua*). *Food Chem* 92:71–7.
144. Martínez-Alvarez O, Borderias J, Gómez-Guillén MC. 2005b. Use of hydrogen peroxide and carbonate/bicarbonate buffer for soaking of bacalao (salted cod). *Eur Food Res Technol* 221:226–31.
145. Martínez-Alvarez O, Borderias AJ, Gómez-Guillén MC. 2005a. Sodium replacement in the cod (*Gadus morhua*) muscle salting process. *Food Chem* 93:125–33.
146. Martínez-Alvarez O, Gómez-Guillén MC. 2005. The effect of brine composition and pH on the yield and nature of water-soluble proteins extractable from brined muscle of cod (*Gadus morhua*). *Food Chem* 92:71–7.
147. Martínez-Alvarez Oscar and Gómez-Guillén Carmen, (2004), Influence of mono- and divalent salts on water loss and properties of dry salted cod fillets, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)
148. Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, et al. (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 552: 54-60.
149. MHLW, 2011. Food poisoning statistics 2009. Japan.
150. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B., 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.* 124, 66–72.
151. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Brusetti, L., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2010. Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Res. Vet. Sci.* 88, 427–435.
152. Mossel DAA (1975) Occurrence, prevention and monitoring of microbial quality loss of foods and dairy products. *CRC Crit Rev Environ Control* 5:1–140
153. Muller-Alouf, H., C. Carnoy, M. Simonet and J. E. Alouf. 2001. Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon.* 39:1691-1701.
154. Muñoz-Guerrero H, Gutierrez MR, Vidal-Brotons D, Barat JM, Gras ML, Alcaina MI. 2010. Environmental management of the residual brine of cod desalting. Quantification of mass transfer phenomena and determination of some parameters on the residual brine important for its treatment by membrane technology. *J Food Eng* 99:424–9.
155. Muñoz D., Crucita G. D. M., Martímathnez C., Marjal H., Zerpa A. (2010). Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y enterobacterias en carne de pepitona, Arca zebra, comercializada en Cumana, Venezuela. *Zoot. Trop.* 26, 505–513
156. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal medicine journal.* 2005;35 Suppl 2:S106-19.
157. Nelson JS. 2006. *Fishes of the world*. Fourth edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc. 624 p.
158. Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens M, et al. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008;52(10):3817-9.

159. Nguyen MV, Jonsson A, Thorarinsdóttir KA, Arason S, Thorkelsson G. 2011. Effects of different temperatures on storage quality of heavily salted cod (*Gadus morhua*). *Intl J Food Eng* 7(1), Article 3.
160. Normanno, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V., Germinario, G.L., Parisi, A., 2003. Hygienic-sanitary evaluations about typically raw-eaten seafoods (Apulia). *Industrie Alimentari* 42 (429), 961-964.
161. Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di-Giannatale, E., Salinetti, A.P., La-Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V., 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.
162. Notermans S, Heuvelman CJ (1983) Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci* 48:1832–1835, 1840.
163. Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I., 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinary Medicine – Czech* 49 (9), 343-358
164. Offer, G. K., P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. In: R. Lawrie, *Developments in meat science* 4 (pp. 63-171). London: Elsevier Applied Science.
165. Ogston, A. (1880) Über Abscesse. *Arch. Klin. Chir.* 25, 588-600.
166. Oh, S.K., Lee, N., Cho, Y.S., Shin, D.B., Choi, S.Y., Koo, M., 2007. Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *Journal of Food Protection* 70 (5), 1153-1158.
167. O' Hehir, R.E., and J.R. Lamb. 1990. Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8884-8888.
168. Oliveira, H., Pedro, S., Nunes, M. L., Costa, R., & Vaz-Pires, P. (2012). Processing of salted cod (*Gadus* spp.): a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 11(6), 546-564.
169. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K (2002) Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. *J Clin Microbiol* 40:857–862.
170. Papadopoulou, C., Economou, E., Zakas, G., Salamoura, C., Dontorou, C., Apostolou, J., 1 2007. Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. *Journal of Food 2 Quality* 30, 28-42.
171. Palumbo, S.A., J.L. Smith, and J.C. Kissinger. 1977. Destruction of *Staphylococcus aureus* during frankfurter processing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 740–744.
172. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP., Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. 2002 Sep;70(9):4987-96.
173. Pedro S, Magalhaes N, Albuquerque MM, Batista I, Nunes ML, Bernardo MF. 2002a. Preliminary observations on spoilage potential of flora from desalted cod (*Gadus morhua*). *J Aquat Food Prod Technol* 11:143–50.
174. Pedro S, Rodrigues MJ, Nunes ML, Albuquerque MM, Batista I. 2002b. Bacalhau: qualidade e inovac,~ao tecnol'ogica. In: Ruano F, Cardador F, Batista

- I, Falcão M, Monteiro T, Henriques V, editors. *Produtos da Pesca. Qualidade, segurança e inovação tecnológica. Jornadas técnicas e científicas do IPIMAR. Publicações avulsas do IPIMAR N.º 9.* Lisboa: Inst. De Investigação das pescas e do mar. p 49–58.
175. Pedro, S., Magalhães, N., Albuquerque, M.M., Batista, I., Nunes, M.L., and Bernardo, M.F. 2002c. Preliminary observations on spoilage potential of flora from desalted cod (*Gadus morhua*). *J. Aqua. Food Prod. Technol.* 11(3/4): 143-150.
 176. Pedro, S., Albuquerque, M.M., Nunes, M.L., Bernardo, M.F., 2004. Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (*Gadus morhua*) and desalted products at low and high temperatures. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13 (3), 39-48
 177. Pellegrino, C., Giaccone, V., and Ponzoni, N. 1988. Microbiological control of cod preserves. I. Salted products. *Ind. Aliment.* 27(261): 541-545, 550.
 178. Pexara, A., Burriel, A., Govaris, A. (2010). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins in foodborne diseases. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(4), 316-322.
 179. Pinchuk IV, Beswick JJ, Saada JI, Suarez G, Winston J, Mifflin RC, Di Mari JF, Powell DW, Reyes VE (2007) Monocyte Chemo - attractant Protein-1 Production by Intestinal Myofibroblasts in Response to Staphylococcal Enterotoxin A: Relevance to Staphylococcal Enterotoxigenic Disease. *J Immunol* 178:8097- 8106.
 180. Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58, 755-805.
 181. Projan, S. J. and Novick, R. P. (1997) The molecular basis of pathogenicity. In *The staphylococci in human disease* (ed.: Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 55-81. Churchill Livingstone, New York, NY.
 182. Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M., 2011. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1251-1260
 183. Roberts, T., 2007. WTP estimates of the societal costs of U.S. food-borne illness. *Am. J. Agric. Econ.* 89, 1183–1188.
 184. Rodrigues MJ, Ho P, López-Caballero ME, Vaz-Pires P, Nunes ML. 2003. Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiol* 20:471–81.
 185. Rodrigues MJ, Ho P, López-Caballero ME, Bandarra NM, Nunes ML. 2005. Chemical, microbiological, and sensory quality of cod products salted in different brines. *J Food Sci* 70:M1–6.
 186. Rosenbach, F. G. (1884) *Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen.* J. F. Bergmann's Verlag. Wiesbaden, Germany.
 187. Sattar, S.A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R.C., Scott, E., Kain, J., 2001. Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *J. Appl. Microbiol.* 90, 962–970.
 188. Schaeffler S, Jones D, Perry W, Baradet T, Mayr E, Rampersad C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City hospitals: inter-hospital spread of resistant strains of type 88. *Journal of clinical microbiology.* 1984;20(3):536-8.
 189. Schleifer, K.H., Bell, J.A., 2009. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov., in: Vos, P.D., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A.,

- Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes*. Springer, pp. 392–426.
190. Schukken YH, Gonzalez RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL, et al. CNS mastitis: nothing to worry about? *Veterinary microbiology*. 2009;134(1-2):9-14.
 191. Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W (1990) Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Inter J Food Microbiol* 11:1-20
 192. Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(2):282-5.
 193. Sheagren, J. N. (1998) *Staphylococcal infections*. In *Internal medicine 5th edn.* (ed.: Stein, J. H.), pp. 1546-1553. Mosby Inc. St. Louis, MO.
 194. Simon, S.S., Sanjeev, S., 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control* 18, 1565-1568.
 195. Smith JL, Buchanan RL, Palumbo SA (1983) Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. *J Food Protect* 46:545–555.
 196. Smyth, C.J., Smyth, D.S., Kennedy, J., Twohig, J., Bolton, D., 2004. *Staphylococcus aureus*: from man or animals—an enterotoxin iceberg?, in: Maunsell, B., Sheridan, J., Bolton, D.J. (Eds.), *Food Pathogen Epidemiology: Microbes, Maladies and Methods, Proceedings of an International EU-RAIN Conference, 3–4 December Padua (Italy)*. Teagasc - The National Food Centre, Dublin, pp. 85–102.
 197. Stien LH, Hirmas E, Bjørnevik M, Karlsen Ø, Nortvedt R, Rørøa AMB, Sunde J, Kiessling A. 2005. The effects of stress and storage temperature on the color and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Res* 36:1197–206.
 198. Strauss, E. (1998) A possible new approach to combating staph infections. *Science* 280, 379.
 199. Su YC, Wong ACL. (1995) Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, *H Appl Environ Microbiol* 61:1438– 1443.
 200. Tatini SR (1973) Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J Milk Food Technol* 36:559-563.
 201. Tenhagen BA, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *The Journal of dairy research*. 2009;76(2):179-87.
 202. Todd, E. C. D. 1978. Foodborne disease in six countries. A comparison. *J. Food. Prot.* 41:559-565.
 203. Tranter, H. S. (1996) Foodborne staphylococcal illness. *Lancet* 336, 1044-1046.
 204. Tropa E, Galamba A. 1955. *Bactérias halófilas do vermelho do bacalhau*. Comissão Reguladora do Comércio do Bacalhau. Lisboa: Ministério da Economia.
 205. van Klaveren FW, Legendre R. 1965. Salted cod. In: Borgström G, editor. *Fish as food*. Vol III. London: Academic Press. p 133–63.
 206. Vas-Velche, M., Capell, C., & Gibbs, P. (1998). Cured, smoked and dried fish. In: R. Lawley & P. Gibbs, *Microbiology handbook*. 3) Fish and seafood (pp. 119-155). Surrey: Leatherhead Food RA.

207. Vázquez-Sánchez, D., López-Cabo, M., Saá-Ibusquiza, P., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2012). Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *International journal of food microbiology*, 157(2), 286-296.
208. Venkataraman R, Screenivasam A. 1954. Studies on the red halophilic bacteria from salted fish and salt. *Proc Indian Acad Sci* 319:17–23.
209. Vieira R.H.S.F., Rodrigues D.P., Gocalves F.A., Menezes F.G.R., Aragao J.S., Sousa O.V. (2001): Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 43, 145–148.
210. Vilhelmsson O, Hafsteinsson H, Kristjansson JK. 1996. Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured salted cod (bachalao). *J Appl Bacteriol* 81:95–103.
211. Vilhelmsson O, Hafsteinsson H, Kristjansson JK. 1997. Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod. *Intl J Food Microbiol* 36:163–70.
212. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(12):1965-6.
213. Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.L., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., Otto, M., 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 13, 1510–1514.
214. Warm K, Nelsen J, Hyldig G. 2000. Sensory quality criteria for five fish species. *Journal of food quality* 23:583-601.
215. Weese, J. S., J. Rousseau, A. Deckert, S. Gow, and R. J. Reid-Smith. 2011. *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs. *BMC Vet. Res.* 7:41.
216. Whiting, R. C., Sackitey, S., Calderone, S., Morely, K. and Phillips, J. G. (1996) Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 231-243.
217. Wilkinson, B. J. (1997) Biology. In *The Staphylococci in human disease* (ed.: Crossley, K. B. and Archer, G. L.), pp. 1-38. Churchill Livingstone. New York, NY.
218. Woodford, N., Warner, M. and Aucken, H. M. (2000) Vancomycin resistance among epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 258-259.
219. World Health Organisation (WHO), 2007. Global public health security in the 21st century Geneva. In: *The world health report*, WHO, Geneva.
220. Yang, Z., Jiao, X., Zhou, X., Cao, G., Fang, W., Gu, R., 2008. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. *International Journal of Food Microbiology* 125, 279-285.
221. Zaitsev V, Kizevetter I, Lagunov L, Makarov T, Minder L, Podsevalov V. 1969. Fish curing and processing. Moscow: MIR Publishers. p 198–327.