

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Π.Δ.Ε.**

**«Αλλοιωγόνι και Παθογόνι μικροοργανισμοί στα δίθυρα
μαλάκια»**

(Spoilage and food-borne pathogenic of bivalve Molluscans).



Κοντοτόλης Στέφανος

«Αλλοιωγόνους και Παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθυρα μαλάκια»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1. Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.),** Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, (Επιβλέπων).
- 2. Νικόλαος Νεοφύτου (M.Sc., Δρ.),** Επίκουρος Καθηγητής, Υδατοκαλλιέργειες και Περιβάλλον, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας μιας κοπιαστικής και χρονοβόρας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του κατά τη σύνταξη της παρούσας εργασίας, καθώς και τον κ. Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Νεοφύτου μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Δρ Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές, συνάδελφους μα πάνω απ' όλα καρδιακούς μου φίλους Αναγνωστόπουλο Δημήτρη και Κορομηλά Σωτήρη για την βοήθεια και την στήριξή τους.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που περνούσα τον περισσότερο χρόνο αυτά τα χρόνια, τους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν στις χαρές και τις λύπες και μαζί τους δημιούργησα αναμνήσεις που θα μου μείνουν αξέχαστες.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου, τον πατέρα μου Κωνσταντίνο, την μητέρα Άννα, τα αδέρφια μου Γιώργο, Άγγελο και Μαρία για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να επισημάνω ότι η συγκεκριμένη εργασία αφιερώνεται στον αγαπημένο φίλο μου-κολλητό μου-αδερφό μου Τριανταφύλλου Μιχάλη που “έφυγε” άδικα πολύ νωρίς, αφήνοντάς μου μόνο όμορφες αναμνήσεις να θυμάμαι από εκείνον.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Γενικά στοιχεία για τα δίθυρα μαλάκια.....	11
1.2. Βιολογία δίθυρων μαλακίων	12
1.2.1. Στρείδια	12
1.2.2. Μύδια	16
1.3. Διατροφική αξία δίθυρων μαλακίων	19
1.4. Επιπτώσεις από την κατανάλωση δίθυρων μαλακίων στην υγεία του ανθρώπου.....	22
1.5. Στοιχεία μικροβιολογίας δίθυρων μαλακίων.....	25
1.6. Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων.....	27
1.7. Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων	28
1.8. Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM)	30
1.9. Αρχική Μικροχλωρίδα	32
1.10. Παθογόνοι μικροοργανισμοί	33
1.11. Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας	35
1.12. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης.....	36
1.13. Συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες.....	37
1.14. Συντήρηση σε συσκευασία MAP (Modified Atmosphere Package).....	38
1.15. Σκοπός.....	40
2. ΑΛΛΟΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΔΙΘΥΡΑ ΜΑΛΑΚΙΑ	41
2.1.Γενικά.....	41
2.2. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα μύδια	43
2.3. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα στρείδια.....	47
3. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ	52
3.1 Γενικά.....	52
3.2 Escherichia coli (E. coli)	54
3.3. Vibrios	58
3.3.1. Vibrio parahaemolyticus	58
3.3.2. Vibrio vulnificus.....	60
3.3.3. V. Cholerae non-01	61
3.3.4. Vibrio cholerae 01 and 0139	61
3.3.5. Other Vibrios spp.	62
3.4. Campylobacter jejuni.....	63

3.5. Άλλοι οργανισμοί που προκαλούν ανησυχία	65
3.6. Δημοσιευμένα Μικροβιολογικά Κριτήρια	66
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τους αλλοιωγόνους αλλά και τους παθογόνους μικροοργανισμών στα δίθυρα μαλάκια. Η ανασκόπηση αφορούσε κυρίως τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς του γένους *Pseudomonas* spp., τα υδροθειουχο-παραγωγά βακτήρια (*Shewanella putrefaciens*), τα Enterobacteriaceae, τα οξυγαλακτικά βακτήρια καθώς και την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) κυρίως στα μύδια, τα στρείδια κ.α. Παρομοίως έγινε ανασκόπηση της παρουσίας ή μη παθογόνων μικροοργανισμών (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., *Clostridium botulinum*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp.) στα προαναφερθέντα δίθυρα μαλάκια.

Όπως προκύπτει από την έρευνα ο ειδικός αλλοιωγόνος μικροοργανισμός (EAM) για τα δίθυρα μαλάκια των μεσογειακών νερών φαίνεται να είναι το βακτήριο του γένους *Pseudomonas* με την τιμή του πληθυσμού του να κυμαίνεται στα 5-7 log cfu/g στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής. Αντίθετα στα νέρα των τροπικών περιοχών επικρατέστερος μικροοργανισμός είναι *Shewanella putrefaciens* ενώ σε κάποιες περιπτώσεις, κυρίως σε συνθήκες MAP έχουν αναφερθεί ως EAM τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Σε κάθε περίπτωση η ανάπτυξη των αλλοιγόνων μικροοργανισμών σχετίζεται με το μικροβιακό φορτίο που 'κουβαλάνε' τα μαλάκια από το φυσικό τους περιβάλλον. Αφού επικρατήσει ο εκάστοτε EAM, παράγει μεταβολικές ουσίες που σχετίζονται με την υποβάθμιση, την παρουσία δυσάρεστων οσμών και τελικά την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος.

Όσο αναφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθυρα μαλάκια, το ποσοστό των κρουσμάτων διαφέρει σημαντικά σε όλο τον κόσμο, από περίπου 10%

έως 30% του συνόλου των τροφιμογενών κρουσμάτων, και φαίνεται να είναι υψηλότερο στην νοτιο-ανατολική Ασία, αν και λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την Αφρική. Οι συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης, ταυτοποίησης και απαρίθμησης, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για ορισμένα παθογόνα βακτήρια σε δίθυρα μαλάκια αλλά λιγότερο επιτυχώς για άλλα, όπως τα *Vibrios*, όπου δεν επιτευχθεί επαρκώς η διάκριση των παθογόνων από τα μη παθογόνα. Η κύρια μέθοδος πρόληψης και προστασίας του προϊόντος από παθογόνους μικροοργανισμούς είναι η πιστή εφαρμογή της ορθής υγιεινής πρακτικής (GHP) και της ορθής εργοστασιακής πρακτικής (GMP), όταν αναφερόμαστε στη μεταποίηση, καθ' όλα τα στάδια της αλίευσης, της συντήρησης, της επεξεργασίας και της πώλησης.

Λέξεις κλειδιά: δίθυρα μαλάκια, αλλοιωγόνους, παθογόνους, αλλοίωση, Ειδικοί Αλλοιγόνους Μικροοργανισμοί (EAM), Εμπορικός χρόνος ζωής.

ABSTRACT

The aim of this undergraduate thesis was a literature review about spoilage and pathogenic microorganisms in bivalve molluscan. The review mainly concerned spoilage microorganisms such as *Pseudomonas* spp., hydrosulfide-producing bacteria (*Shewanella putrefaciens*), Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria and total viable count (TVC) especially in mussels and oysters. Similarly there was a review about the presence or not of pathogens (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., *Clostridium botulinum*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp.) in bivalves molluscs

The specific spoilage organism (SSO) of bivalve molluscan in Mediterranean waters seems to be *Pseudomonas* spp. with a population level about 5-7 log cfu /g at the end of the shelf-life. In contrast to Mediterranean, in tropical regions *Shewanella putrefaciens* was predominant in most of the cases. In addition to, in MAP condition was reported that lactic acid bacteria dominated. It should be emphasized, that the development of spoilage microorganisms is remarkably associated with the bacterial load that molluscs are contaminated from their natural environment.

The number of cases of pathogens in bivalve molluscan varies considerably around the world, from about 10% to 30% of all food-borne outbreaks and seems to be highest in south-east Asia, although little information are available for Africa. The conventional methods of detection, identification and counting, have been successfully used for certain pathogens in bivalve molluscan but less successfully on other like *Vibrios*, wherein not achieved sufficiently distinguish among pathogens and non pathogens. The primary method of prevention and protection of pathogenic microorganisms is the collection of bivalves from clean waters and the

implementation of good hygiene practices (GHP) and good manufacturing practice (GMP), at all stages of harvesting, preservation, processing and sale.

Keywords: *bivalve molluscan, spoilage, pathogens, specific spoilage organism (SSO), Shelf- life.*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά στοιχεία για τα δίθυρα μαλάκια

Τα Δίθυρα είναι ομοταξία μαλακίων , των οποίων το κύριο γνώρισμα είναι η παρουσία διπλού οστράκου. Ονομάστηκαν έτσι από τον Αριστοτέλη. Λέγονται

επίσης και ακέφαλα ή πελεκύποδα, επειδή το πόδι τους έχει σχήμα τσεκουριού. Γνωστότεροι αντιπρόσωποι των δίθυρων είναι τα μύδια, τα στρείδια, τα χτένια, οι αχιβάδες, τα κυδώνια, οι λιθοδόμοι και άλλα ζώα. Η εσωτερική τους επιφάνεια ονομάζεται μανδύας. Σε μερικά είδη σχηματίζονται μαργαριτάρια, εξ αιτίας της έκκρισης του μάργαρου, ουσίας που έχει σκοπό να απομονώσει ξένα σώματα που παρεισφρέουν ανάμεσα στο μανδύα. Τα φυσικά μαργαριτάρια δημιουργούνται λόγω ενός παράσιτου που εισέρχεται μεταξύ του όστρακου και του μανδύα. Τα είδη των δίθυρων φθάνουν τα 13.000 περίπου και πολλά από αυτά είναι χρήσιμα στον άνθρωπο, ως τροφή και ως βιομηχανική χρήση (όστρακο). Η ομοταξία τους παρουσιάζει μεγάλη ομοιογένεια, κάτι που διευκολύνει την ταξινόμησή τους. Απαντώνται σε όλο τον κόσμο σε πολυάριθμες κοινωνίες.

Τα δίθυρα μαλάκια (μύδια στρείδια, κυδώνια, κτένια, αχιβάδες κ.α.) ζουν κυρίως στις παράκτιες περιοχές σε μικρό βάθος, προσκολλημένα σε στέρεα αντικείμενα (πέτρες, βράχους, πασσάλους). Σχηματίζουν πολυάριθμες συμπαγείς αποικίες, οι οποίες προσκολλώνται σε στερεά βραχώδη υποστρώματα των ακτών με τη βοήθεια των βυσσογόνων νηματίων, τα οποία εκκρίνονται από τους αντίστοιχους αδένες.

1.2. Βιολογία δίθυρων μαλακίων

1.2.1. Στρείδια

Τα στρείδια (**Εικόνα 1.2.1**) είναι θαλάσσια δίθυρα μαλάκια. Υπάρχουν περισσότερα από 50 είδη στρειδιών, αρκετά από τα οποία είναι εδώδιμα. Συνδέονται με τους βράχους ή βρίσκονται στον πυθμένα της θάλασσας. Δεν έχουν δυνατότητα

κίνησης, αλλά απομακρύνονται συχνά από τη θέση στήριξής τους παρασυρόμενα από τα θαλάσσια ρεύματα.

Το όστρακο του στρειδιού είναι σχήματος ακανόνιστου οβάλ. Αποτελείται από μια αριστερή και μια δεξιά θυρίδα που ενώνονται μαζί στο στενό πρόσθιο άκρο με έναν ελαστικό σύνδεσμο που ενεργεί ως άρθρωση. Και με τις δυο θυρίδες συνδέεται ένας ισχυρός μυς, αποκαλούμενος προσαγωγός, ο οποίος κρατά το όστρακο ισχυρά κλειστό. Όταν ο προσαγωγός μυς χαλαρώνει, ο ελαστικός σύνδεσμος απομακρύνει τις θυρίδες. Το αριστερό όστρακο, επάνω στο οποίο στηρίζεται το στρείδι, είναι βαθύτερο και πιο παχύ από το δεξιό.

Εκτός από τις σκοτεινές, χρωματισμένες περιοχές όπου το κέλυφος συνδέεται με τον προσαγωγό, οι εσωτερικές επιφάνειες των οστράκων είναι άσπρες. Δύο πτυχές της σαρκώδους μεμβράνης, αποκαλούμενες μανδύας, καλύπτουν το μαλακό σώμα του στρειδιού και ευθυγραμμίζουν το εσωτερικό του κελύφους. Ο μανδύας εκκρίνει τις οργανικές και ανόργανες ουσίες που αποτελούν το κέλυφος. Στο πρόσθιο άκρο του σώματος, μεταξύ δύο ζευγαριών λεπτών χειλέων, ή κεραιών, είναι ένα άνοιγμα που αποτελεί το στόμα του στρειδιού. Δύο ζευγάρια δρεπανοειδών αναπνευστικών οργάνων, τα βράγχια, καλύπτονται με τις δομές που ομοιάζουν με τρίχες, αποκαλούμενες βλεφαρίδες. Ένας κοντός οισοφάγος συνδέει το στόμα με το στομάχι. Το σώμα περιέχει επίσης το πεπτικό, αναπαραγωγικό, κυκλοφοριακό, απεκκριτικό, και νευρικό σύστημα (Hedeen, 1986). Το στρείδι τρέφεται με τους μικροοργανισμούς που φτάνουν στο όστρακο με το ρεύμα που δημιουργείται από τη μετακίνηση των βλεφαρίδων και συλλαμβάνονται με τις χειλικές κεραιές προτού να φθάσουν στο στόμα ([http 5](http://5)).



Εικόνα 1.2.1 Στρείδι (*Ostrea edulis*)

Τα στρείδια έχουν ποικίλες διαδικασίες κατά τον κύκλο της ζωής τους. Το ευρωπαϊκό στρείδι και το στρείδι Olympia της αμερικανικής ακτής του Ειρηνικού είναι ερμαφρόδιτα - δηλαδή τα αναπαραγωγικά όργανά τους περιέχουν και τα αυγά και το σπέρμα. Τα αυγά γονιμοποιούνται μέσα στο σώμα και διατηρούνται στα βράγχια έως ότου διαμορφωθούν οι προνύμφες που φέρουν όστρακο. Στο αμερικανικό στρείδι bluepoint της Ατλαντικής ακτής, τα φύλα είναι χωριστά. Τα θηλυκά απελευθερώνουν εκατομμύρια αυγά στο θαλάσσιο νερό, όπου και πραγματοποιείται η γονιμοποίηση. Οι προνύμφες αναπτύσσονται μέσα σε έξι ώρες, κολυμπούν ενεργά για περίπου δύο ή τρεις εβδομάδες, και εγκαθίστανται έπειτα σε πέτρες ή κοχύλια, όπου ωριμάζουν μέχρι το τέλος του πρώτου έτους. Η αναπαραγωγική εποχή ποικίλλει σύμφωνα με το γεωγραφικό πλάτος του βιότοπου (Loosanoff and Harry, 1963).

Τα στρείδια βρίσκονται σε όλο τον κόσμο, διαμορφώνουν συνήθως μεγάλες ομάδες οι οποίες στα θερμά ύδατα εκτείνονται από την παλιρροιακή ζώνη μέχρι το βάθος των 30 μέτρων. Οι ομάδες των αμερικανικών στρειδιών bluepoint βρίσκονται κατά μήκος της ανατολικής ακτής της ηπείρου. Ο κόλπος Chesapeake είναι η περιοχή μεγαλύτερης παραγωγής στρειδιών στον κόσμο, αν και ο αριθμός των στρειδιών έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της υπερβολικής εκμετάλλευσης και της ρύπανσης. Μεγάλες ομάδες εδώδιμων στρειδιών υπάρχουν επίσης στην Ιαπωνία και την Αυστραλία. Το γηγενές αμερικανικό στρείδι Olympia, που είναι πολύ μικρότερο και έχει πιο λεπτό κέλυφος από άλλα εδώδιμα είδη, βρίσκεται στη δυτική ακτή της Βόρειας Αμερικής. Η καλλιέργεια των στρειδιών λαμβάνει χώρα σε πολλές χώρες. Τα νεαρά στρείδια, αποκαλούμενα στρείδια - γόνι, τοποθετούνται στα κατάλληλα κατώτατα σημεία που παρέχονται από τεχνητούς συλλέκτες, όπως κεραμίδι ή κοχύλια. Το περισσότερο μελετημένο και καλά συγκροτημένο σύστημα της καλλιέργειας στρειδιών εφαρμόζεται στην Ιαπωνία, τη Γαλλία, και τις Κάτω Χώρες (Medcoff, 1961).

Το ευρωπαϊκό στρείδι είναι ταξινομημένο ως *Ostrea edulis*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συστηματική κατάταξη:

Φύλο:	Μαλάκια (Mollusca)
Τάξη:	Δίθυρα (Bivalvia)
Τάξη:	Ostreoida
Οικογένεια:	Ostreidae
Γένος:	<i>Ostrea</i> .

1.2.2. Μύδια

Όπως κάθε δίθυρο, έτσι και το μύδι (**Εικόνα 1.2.2**) έχει δυο θυρίδες που φέρουν ένα εξόγκωμα, τον σπόνδυλο. Ο σπόνδυλος είναι το πιο παλιό σημείο του κελύφους και γύρω του δημιουργούνται με το χρόνο δακτύλιοι αύξησης. Αυτοί, άλλοτε σχηματίζονται ετησίως και άλλοτε όχι, γεγονός που δεν επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της ηλικίας με τη μέτρηση των δακτυλίων αύξησης. Η γραμμή του κλείθρου του οστράκου δεν φέρει δόντια ή χονδροφόρο, ο σύνδεσμος είναι εξωτερικός και το όστρακο έχει δυο μυϊκά αποτυπώματα. Τα μύδια είναι αμφιπλευροσυμμετρικά δίθυρα μαλάκια, με τις θυρίδες του οστράκου συμπιεσμένες πλευρικά. Το κλείσιμο των δύο θυρίδων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των προσαγωγών μυών, τοποθετημένων μεταξύ των εσωτερικών επιφανειών των δυο θυρίδων, στις οποίες προσκολλώνται στερεά, ώστε μετά την απόσπαση των προσαγωγών μυών από τις θυρίδες να διακρίνονται σε αυτές τα μυϊκά αποτυπώματα. Το σώμα του μυδιού στερείται κεφαλής, φέρει όμως πόδα και σπλαχνικό σάκο. Το σώμα περιβάλλεται από τον μανδύα, ο οποίος παράγει με έκκριση τις θυρίδες του οστράκου ([http 4](http://4)).



Εικόνα 1.2.2 Μύδια (*Mytilus galloprovincialis*)

Τα ώριμα θηλυκά έχουν χρώμα σάρκας κοκκινωπό, ενώ τα ώριμα αρσενικά έχουν χρώμα κιτρινωπό. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρυθμός αύξησης των μυδιών ποικίλει από περιοχή σε περιοχή, καθώς επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία του νερού όπου αναπτύσσονται, η ρύπανση, η διαθέσιμη τροφή, οι γενετικοί παράγοντες κ.α. Η περίοδος αναπαραγωγής ποικίλει από χώρα σε χώρα. Το μύδι, όπως και άλλα δίθυρα, έχει παρατεταμένη περίοδο αναπαραγωγής. Στη Μαύρη Θάλασσα γεννά κυρίως το χειμώνα και το φθινόπωρο, στη Γαλλία γεννά όλο το χρόνο, ενώ στην Αδριατική και στην Ελλάδα γεννά κυρίως το χειμώνα. Η μεγάλη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου βοηθά το μύδι να σχηματίζει πληθυσμούς πολλών ατόμων και να εξαπλώνεται γρήγορα (Loosanoff and Harry, 1963).

Πρόκειται για κοσμοπολίτικο οργανισμό, με μαύρο κέλυφος, που ζει κολλημένο σε σκληρό υπόστρωμα όπως βράχια, πάσσαλοι, τοίχοι, πέτρες, κελύφη κ.α. Στα σκληρά αυτά υποστρώματα προσκολλάται με τη βύσσο, που εκκρίνεται από το πόδι του μυδιού. Το έκκριμα ρέει από το αυλάκι του ποδιού στο υπόστρωμα και

έτσι σχηματίζεται μια ίνα. Όταν αυτή η ίνα σταθεροποιηθεί το πόδι αποσύρεται, αφήνοντας την ίνα προσκολλημένη στο υπόστρωμα. Ένας συστολέας μυς της βύσσου βοηθά το μύδι να απομακρυνθεί όταν υπάρξει ανάγκη. Είναι πολύ ανθεκτικός οργανισμός και μπορεί να ζει τόσο σε καθαρά ύδατα όσο και σε ύδατα με υψηλό βαθμό ρύπανσης, όπως σε λιμάνια και κοντά σε αγωγούς αποβλήτων. Είναι οστρακοειδές με γρήγορη ανάπτυξη και με μεγάλη θρεπτική αξία. Καλλιεργείται από την αρχαιότητα με πολλούς τρόπους που ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή. Οι συνηθέστεροι τρόποι καλλιέργειάς τους είναι σε πασσάλους, σε σειρές, με τη μέθοδο BOUCHOT και σε σχεδίες. Ο γόνος συλλέγεται από τη θάλασσα. Η περιοχή της καλλιέργειας πρέπει να είναι καθαρή, πλούσια σε οξυγόνο, με ρεύματα που απομακρύνουν τους ρύπους και τα προϊόντα μεταβολισμού των μυδιών. Επιπλέον, τα ύδατα εκτροφής πρέπει να είναι πλούσια σε τροφή, κυρίως φυτοπλαγκτόν. Το μύδι είναι ευρέως διαδεδομένο στο Βόρειο ημισφαίριο. Συναντάται στα Αρκτικά νερά, στην Ιαπωνία, στις ακτές του Ειρηνικού, στον Ατλαντικό, στον Καναδά, στη Γροιλανδία κ.α. Συναντάται επίσης στη Μεσόγειο και στη Βόρειο Αφρική, στη Μαύρη Θάλασσα, στην Αδριατική και στη Βαλτική ([http 6](http://6)). Ο περιοριστικός παράγοντας της εξάπλωσης των μυδιών φαίνεται να είναι η θερμοκρασία, και το νοτιότερο όριο εξάπλωσής τους συμπίπτει με την ισόθερμη των 27 °C. Το βορειότερο άκρο είναι ασαφώς προσδιορισμένο. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα μύδια αφθονούν στο Labrador που παραμένουν παγωμένα σε θερμοκρασία -20 °C για 6-8 μήνες ετησίως (Yamocki et al., 1994). Προτιμούν τη μεσοαιγιαλίτιδα και τα ρηχότερα τμήματα της υποαιγιαλίτιδας ζώνης, αν και περιστασιακά ζουν σε μεγαλύτερα βάθη. Ζουν κυρίως σε υποστρώματα με ελαφριά κλίση, η δε κατανομή τους μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή επηρεάζεται από την παρουσία θηρευτών, τη δράση των κυμάτων, τους φυσικούς παράγοντες και τη διαθεσιμότητα τροφής. Οι κυριότεροι θηρευτές των

μυδιών είναι τα γαστερόποδα, οι αστερίες και τα καβούρια, γι' αυτό και οι καλλιέργειές τους πρέπει να μην είναι πάνω στο βυθό προκειμένου να προστατεύονται από τους εχθρούς τους ([http 1](http://1)). Το Μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis* έχει την ικανότητα να ζει σε πολύ δύσκολες συνθήκες, όπως σε συνθήκες ανοξίας. Λόγω της μεγάλης του προσαρμοστικότητας μπορεί να καλλιεργηθεί σχεδόν σε όλη τη γη, αν και οι φυσικοί του πληθυσμοί περιορίζονται στη ζώνη εξάπλωσής του (το μεσογειακό μύδι έχει ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 10-20ο C).

Το Μεσογειακό μύδι είναι ταξινομημένο ως *Mytilus galloprovincialis*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συστηματική κατάταξη :

Φύλο:	Μαλάκια (Mollusca)
Τάξη:	Δίθυρα (Bivalvia)
Υπόταξη:	Pteriomorphia
Τάξη:	Mytiloidea
Οικογένεια:	Mytilidae
Γένος:	<i>Mytilus</i>

1.3. Διατροφική αξία δίθυρων μαλακίων

Η χοληστερόλη είναι απαραίτητη στο σώμα επειδή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση σημαντικών ενώσεων όπως στα χολικά οξέα (τα οποία βοηθούν στην πέψη του λίπους στο έντερο), στις αναπαραγωγικές ορμόνες και στη βιταμίνη D. Τα κύτταρα στον οργανισμό συνθέτουν περίπου τα δύο τρίτα της χοληστερόλης, ενώ το

υπόλοιπο ποσοστό προέρχεται από τρόφιμα που καταναλώνονται (Byrd-Bredbenner et al., 2009). Αν και τα περισσότερα ζωικά προϊόντα είναι υψηλά σε κορεσμένα λίπη, αποτελούν επίσης πηγές διαιτητικής χοληστερόλης. Η εξέταση του περιεχομένου της χοληστερόλης στα δίθυρα μαλάκια, είναι σημαντικό να προσμετρά και άλλες στερόλες που μπορεί να υπάρχουν. Τα δίθυρα μαλάκια είναι χαμηλά σε λιπαρά, και μερικά, περιέχουν μια υψηλή συγκέντρωση της χοληστερόλης. Ωστόσο, οι μη-χοληστερόλες στερόλες (επίσης γνωστές ως στερόλες ή στανόλες (φυτικές στερόλες ή στανόλες)) βρέθηκαν σε φυτοφάγα μαλάκια, όπως μύδια και χτένια. Αυτές οι ενώσεις μη-χοληστερόλης είναι απορροφήσιμες από το έντερο και μπορούν να μειώσουν την απορρόφηση της χοληστερόλης (Byrd-Bredbenner et al., 2009) και με τον τρόπο αυτό να έχουν θετική επίδραση στην υγεία. Τα δίθυρα μαλάκια έχουν συγκεντρώσεις χοληστερόλης μικρότερες των 80 χιλιοστόγραμμων ανά 100 γραμμάρια (βρώσιμο τμήμα) και έτσι λοιπόν μπορούν να καταναλώνονται από εκείνο το τμήμα ανθρώπων που βρίσκεται σε προσπάθεια να περιορίσει τη διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης. Η καταλληλότητα των δίθυρων μαλακίων σε μια διατροφή χαμηλή σε λιπαρά προκύπτει από τη φύση του βρώσιμου τμήματος να είναι χαμηλό σε λιπαρά, συμπεριλαμβανομένου του κορεσμένου λίπους (Dong et al., 2001).

Ο σίδηρος είναι ένα βασικό μεταλλικό στοιχείο στο μόριο αίμης της αιμοσφαιρίνης, το συστατικό των ερυθρών κυττάρων του αίματος που μεταφέρει οξυγόνο στην κυκλοφορία του αίματος. Οι άνθρωποι που δεν καταναλώνουν αρκετό σίδηρο μπορεί να πάσχουν από σιδηροπενική αναιμία. Παγκοσμίως, περίπου 1 δισεκατομμύριο άνθρωποι έχουν σιδηροπενική αναιμία, και περίπου 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι έχουν ανεπάρκεια σε ψευδάργυρο (Muller et al., 2005). Στις ΗΠΑ, περίπου 3,3 εκατομμύρια γυναίκες που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχουν σιδηροπενική αναιμία (Byrd-Bredbenner et al., 2009). Τα διάφορα είδη

δίθυρων μαλακίων είναι πλούσιες πηγές σιδήρου. Ιδίως οι αχιβάδες έχουν αρκετό σίδηρο στα 100 γραμμάρια για να καλύψουν περίπου το 78% της Διαιτητικής Πρόσληψης Αναφοράς για ηλικίες 19-50, μη-έγκυες γυναίκες και μεγαλύτερη από αυτή για ενήλικες άνδρες και για τις γυναίκες μεγαλύτερες των 51 ετών. Τα στρείδια και τα μύδια συμβάλλουν και αυτά σε σημαντικές ποσότητες. Παρά το γεγονός ότι το βόειο κρέας και τα άλλα κόκκινα κρέατα καλούνται συχνά ως πλούσιες πηγές σιδήρου λόγω της παρουσίας του σιδήρου της αίμης, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι ο σίδηρος σε δίθυρα μαλάκια πρέπει επίσης να απορροφηθεί εύκολα.

Σε γενικές γραμμές, τα δίθυρα μαλάκια είναι καλές πηγές ψευδαργύρου, και τα στρείδια του Ειρηνικού, τα μπλε μύδια και τα κυδώνια Manila αποτελούν καλές πηγές σιδήρου. Πέντε λιπαρά οξέα (16: 0, 16: 1, 18: 1, 20: 5n-3, και 22: 6n-3) που αντιπροσωπεύουν το 60% έως 84% της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα βρίσκονται στους οργανισμούς αυτούς. Πιο χαμηλά στην περιεκτικότητα το παλμιτικό οξύ που κυμαίνεται από 13% έως 32% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Επίσης, τα δίθυρα μαλάκια περιέχουν μακράς αλυσίδας ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (37,6% έως 54,3%), με τα θαλάσσια χτένια να περιέχουν περισσότερο από το 50% ενώ τα n-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να κυμαίνονται από 1,5% έως 6,5%. Γενικότερα τα δίθυρα μαλάκια ποικίλλουν ευρέως σε περιεκτικότητα θρεπτικών συστατικών παρά όλα αυτά αποτελούν πολύτιμες προσθήκες στη διατροφή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συγκεντρώσεις Εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA) και Δεκαεξανοϊκού οξέος (DHA) στα δίθυρα μαλάκια (Dong et al., 2001).

Συγκέντρωση EPA και DHA *	
Αχιβάδα	0.14
Μύδι	0.44
Στρείδι	0.69
Χτένι	0.20

**Μικρογραμμάρια ανά 100 γραμμάρια βρώσιμης ποσότητας*

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Συγκεντρώσεις στα δίθυρα μαλάκια (Dong et al., 2001).

	Συγκέντρωση Σιδήρου (Fe) *	Συγκέντρωση Ψευδαργύρου (Zn)*	Συγκέντρωση Χαλκού (Cu) *	Συγκέντρωση Βιταμίνης 12*
Αχιβάδα	13.98	1.37	0.34	49
Μύδι	3.95	1.6	0.09	12
Στρείδι	5.11	16.62	1.58	16
Χτένι	0.29	0.95	0.05	1.5

**Μικρογραμμάρια ανά 100 γραμμάρια βρώσιμης ποσότητας*

1.4. Επιπτώσεις από την κατανάλωση δίθυρων μαλακίων στην υγεία του ανθρώπου.

Τα δίθυρα μαλάκια, όπως τα στρείδια, τα μύδια και τα κτένια, προσλαμβάνουν την τροφή τους με διήθηση του θαλάσσιου ύδατος στο οποίο ζουν. Όταν τα δίθυρα μαλάκια αναπτύσσονται σε καθαρά ύδατα αποτελούν ένα ασφαλές τρόφιμο για τον άνθρωπο. Εντούτοις, μαζί με το νερό, τα δίθυρα μαλάκια διηθούν βακτήρια και ιούς που περιέχονται σε αυτό, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνουν στο

εσωτερικό τους, και κυρίως στο γαστρεντερικό τους σωλήνα, παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να παραμένουν εκεί ζωντανοί για αρκετό χρονικό διάστημα (Desenclos et al.,1991). Αυτοί οι παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν βλάπτουν τα ίδια τα δίθυρα μαλάκια, αλλά μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια σε ανθρώπους που θα τα καταναλώσουν. Έτσι, καθώς καταναλώνονται συνήθως ωμά, είναι απαραίτητο η καλλιέργεια τους να γίνεται σε πολύ καθαρά νερά, υψηλότερης καθαρότητας από αυτή που απαιτείται για κολύμβηση ή ψάρεμα (Gerba and Goyal, 1978, Vaughn et al., 1980, http 3).

Τα προβλήματα ανθρώπινης υγείας που συνδέονται με την κατανάλωση δίθυρων μαλακίων έχουν καταγραφεί ήδη από τους μεσαιωνικούς χρόνους (Lees, 2000).

Ο ρόλος των δίθυρων μαλακίων στη συσσώρευση των μικροοργανισμών έχει μελετηθεί διεξοδικά από τα τέλη του 19ου αιώνα, οπότε και έγινε γνωστή η μετάδοση εντεροπαθογόνων ασθενειών από την κατανάλωση μολυσμένων μαλακίων (Desenclos et al., 1991, Halliday et al., 1991).

Πράγματι, η κατανάλωση μαλακίων έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση ασθενειών όπως ο τυφοειδής πυρετός, η χολέρα, η λοιμώδης ηπατίτιδα και πολλές άλλες γαστρεντερικές λοιμώξεις (Riprey, 1994).

Τα είδη δίθυρων μαλακίων που έχουν συσχετισθεί με τις παραπάνω ασθένειες είναι κυρίως τα μύδια, τα στρείδια και τα κυδώνια και σε μικρότερο βαθμό τα κτένια. Τα είδη αυτά διηθούν την τροφή τους και όλα, με εξαίρεση τα κτένια, αναπτύσσονται σε εκβολές ποταμών και σε παράκτια ύδατα, περιοχές που συχνά ρυπαίνονται από απόβλητα. Υπό κανονικές συνθήκες, διηθούν με τα βράγχια τους μεγάλες ποσότητες θαλασσινού νερού, προκειμένου να αποσπάσουν μονοκύτταρα μαστιγοφόρα, οπότε

εάν το νερό περιέχει μικροοργανισμούς κοπρανόδους μόλυνσης, αυτοί περνούν στον πεπτικό σωλήνα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν αδρανοποιούνται με τη διαδικασία της πέψης και έχει αποδειχθεί η παρουσία τους τόσο στην επιφάνεια των βραγχίων όσο και στον πεπτικό σωλήνα μετά από φιλτράρισμα μερικών λίτρων νερού (Ahmed, 1991).

Εντούτοις, παρά το γεγονός ότι τα δίθυρα μαλάκια θεωρούνται ιδανικοί βιολογικοί δείκτες παρακολούθησης λόγω της βιοσυσσώρευσης που παρουσιάζουν σε σχέση με το νερό στο οποίο ζουν, έχει αποδειχθεί ότι ο συντελεστής συσσώρευσης είναι μεταβλητός και εξαρτάται από παράγοντες όπως η πυκνότητα σε άλας και η θερμοκρασία, που με τη σειρά τους επηρεάζουν το ρυθμό διήθησης των οργανισμών αυτών. Κάτω από μια θερμοκρασία, που είναι ορισμένη για κάθε είδος (π.χ. 2 °C για το μύδι *M. edulis*), η διήθηση σταματά (Ward and Hackney, 1991).

Η περιεκτικότητα σε βακτήρια των δίθυρων μαλακίων παρουσιάζει σημαντικές και ταχείες διακυμάνσεις που σχετίζονται με τη χημική και τη μικροβιολογική ποιότητα του νερού. Πράγματι, στις περιοχές εκβολής των ποταμών όπου η παρουσία μικροοργανισμών κοπρανόδους προέλευσης ποικίλει ανάλογα με τη διεύθυνση του παλιρροιακού κύματος, τα μύδια και τα στρείδια έδειξαν να αντιδρούν σχεδόν αμέσως στις αλλαγές της ποιότητας του νερού όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν κατάλληλη. Το χειμώνα, σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 2 °C, στρείδια δεν ανταποκρίνονται στις αλλαγές, αλλά διατηρούν χαμηλή συγκέντρωση σε βακτήρια ακόμη κι αν υπάρχει μεγάλη αύξηση των βακτηρίων στο νερό. Αντίθετα, τα μύδια εξακολουθούν να ανταποκρίνονται στις αλλαγές της ποιότητας του νερού ακόμη και σε θερμοκρασίες κάτω των 2o C (Bailey et al., 1996).

Οι γρήγορες αυτές αντιδράσεις των μαλακίων στη βακτηριακή ποιότητα του περιβάλλοντος ύδατος δείχνουν ότι τα βακτήρια δεν διαπερνούν τους ιστούς αλλά παραμένουν στον τροφικό σωλήνα ή στα βράγχια ή στην επιφάνεια του μανδύα απ' όπου και μπορούν να απομακρυνθούν. Στον μηχανισμό αυτό στηρίζεται η διαδικασία καθαρισμού των εδώδιμων μαλακίων από τα κοπρανώδη βακτήρια, κατά την εξυγίανσή τους, προκειμένου να γίνουν κατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Hastings and Heinle, 1995).

1.5. Στοιχεία μικροβιολογίας δίθυρων μαλακίων

Η κατανάλωση δίθυρων μαλακίων έχει σχετιστεί με πολλές ασθένειες που οφείλονται σε βακτήρια (π.χ. του γένους *Vibrio*), σε ιούς (Ιός Ηπατίτιδας Α και Ιοί Noro), καθώς και σε τοξίνες (Lees, 2000). Στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν σημειωθεί βακτηριακές και ιογενείς επιδημίες από την κατανάλωση ωμών δίθυρων μαλακίων ήδη από το 1884 (Rippey, 1994). Ορισμένα βακτήρια που φυσιολογικά βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον (*Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio vulnificus*) μπορούν να συσσωρευτούν στα δίθυρα μαλάκια και να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο. Αυτά τα βακτήρια βρίσκονται συνήθως στα θερμά ύδατα, με συνέπεια τα δίθυρα μαλάκια να είναι πιθανότερο να μολυνθούν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Blackstone et al., 2003).

Επιδημίες λόγω μόλυνσης από βακτήρια και ιούς έχουν σημειωθεί από την κατανάλωση δίθυρων μαλακίων προερχόμενων τόσο από ανοιχτές όσο και από κλειστές περιοχές καλλιέργειας (Gerba and Goyal, 1978, Vaughn, 1980). Άτομα με ασθένειες όπως διαβήτης, ηπατικές ασθένειες ή ασθένειες του ανοσοποιητικού

συστήματος βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με τα υγιή άτομα, γι' αυτό θα πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση ωμών δίθυρων μαλακίων.

Παραδοσιακά, τα κολοβακτηριοειδή και κυρίως το βακτήριο *Escherichia coli* έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες της υγειονομικής ποιότητας των δίθυρων μαλακίων, με επιτυχία στην πρόληψη των βακτηριακών γαστρεντερικών μολύνσεων ([http 7](http://7)). Μελέτες, όμως, έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει πάντα θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία κοπρανωδών βακτηρίων, και κυρίως του κολοβακτηριδίου *E. coli*, και την παρουσία εντερικών ιών (Gerba et al., 1979, Vaughn et al., 1979, Ellender et al., 1980, Jofre, 1992), ιών Νορο, και του ιού της Ηπατίτιδας Α (Wanke and Guerrant, 1990, Desenclos et al., 1991). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι οι ιοί εντερικής προέλευσης επιβιώνουν στο θαλασινό νερό 2 έως 130 ημέρες, δηλαδή πολύ μεγαλύτερο διάστημα από τα κοπρανώδη βακτήρια στο ίδιο περιβάλλον (Melnick and Gerba, 1980). Ορισμένες μελέτες μάλιστα έχουν δείξει διαφορετικό βαθμό μείωσης βακτηρίων και ιών σε δίθυρα μαλάκια μετά από επεξεργασία εξυγίανσης (De Mesquita et al., 1991, Richards, 1988, Richards et al., 1983, Baggi et al., 2001).

Καθώς λοιπόν η παρουσία βακτηρίων και ιών στο θαλασινό νερό δεν παρουσιάζει πάντα θετική συσχέτιση, υπάρχει ανάγκη εύρεσης άλλων δεικτών της ιογενούς περιττωματικής μόλυνσης προκειμένου να βελτιωθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος των δίθυρων μαλακίων. (Vaughn and Metcalf, 1974, Gerba, 1979). Τρεις κατηγορίες βακτηριοφάγων, δηλαδή ιών που μολύνουν βακτήρια, έχουν προταθεί ως πιθανοί δείκτες των ιών κοπρανώδους προέλευσης που μολύνουν τον άνθρωπο:

- οι σωματικοί κολιφάγοι (Vaughn and Metcalf, 1974), οι οποίοι μολύνουν ειδικά στελέχη του βακτηρίου *E. coli* με προσκόλληση σε λιποπολυσακχαριδικούς ή πρωτεϊνικούς υποδοχείς του κυτταρικού τοιχώματος

- οι βακτηριοφάγοι που μολύνουν τα βακτήρια του γένους *Bacteroides fragilis* (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991, Jofre et al., 1986, Lucena et al., 1994), αναερόβιων βακτηρίων που ζουν στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα

- οι F-specific RNA βακτηριοφάγοι (F-specific RNA) (Havelaar et al. 1984, Havelaar et al. 1986, IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology 1991), οι οποίοι μολύνουν το κολοβακτηρίδιο *E. coli* με προσκόλληση σε υποδοχείς που βρίσκονται στα συζευκτικά ινίδια (F ινίδια) του βακτηρίου. Επιπλέον, η ανίχνευση των αδενοϊών με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει προταθεί ως μοριακός δείκτης της προερχόμενης από ιό μόλυνσης ανθρώπινης προέλευσης (Pina et al., 1998).

1.6. Μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων

Τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα συστήματα - μίγματα χημικών συστατικών τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από τα δομικά συστατικά που παρέχουν για τον μυϊκό ιστό και τα απαραίτητα προϊόντα για το μεταβολισμό, εξυπηρετούν τον άνθρωπο είτε βοηθώντας στην ανάπτυξη του οργανισμού και τη διατήρηση της κατάστασης υγείας του, είτε προμηθεύοντας την απαιτούμενη ενέργεια για τις λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος.

Επειδή τα τρόφιμα περιέχουν θρεπτικά συστατικά πρέπει να διαφυλάσσεται η θρεπτικότητα και να επιδιώκεται η βελτίωση της θρεπτικής αξίας αυτών, λαμβάνοντας πρόνοια για τις μικρότερες δυνατές αλλοιώσεις και για τη μείωση στο ελάχιστο των παραγόντων μόλυνσης. Οι επεξεργασίες παραγωγής και συντήρησης των τροφίμων πρέπει να είναι κατάλληλες, ώστε να παρέχουν προϊόντα ασφαλή με

υψηλό βαθμό αποδοχής από τον καταναλωτή. Η καταλληλότητα ενός τροφίμου είναι υποκειμενική και στηρίζεται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτού (εμφάνιση, οσμή, γεύση, χρώμα, υφή). Η ποιότητα του τροφίμου ορίζεται ως ο βαθμός προσαρμογής στις απαιτήσεις του καταναλωτή, οι οποίες έχουν σχέση με τη θρεπτικότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Εξαρτάται από την ποιότητα των πρώτων υλών και από την τεχνολογία παραγωγής, εκφράζεται δε με τα χαρακτηριστικά του γνωρίσματα όπως είναι το άρωμα, η γεύση, η σύσταση κ.ά. Έτσι η ποιότητα ενός τροφίμου αποτελεί την οριακή «συνισταμένη των επί μέρους ποιοτήτων» των υλικών και των μεθόδων τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του συγκεκριμένου προϊόντος.

Ως αλλοίωση των τροφίμων θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld., 1996). Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης όπως το βοδινό, το χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, κλπ. Για το λόγο αυτό απαιτείται πολύ προσεκτικός χειρισμός κατά την αποθήκευσή τους. Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (τάγγιση) (Ashie et al., 1996, Gram et al., 1996).

1.7. Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους ναπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard, 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα εκδηλώνεται με αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (οσμή, γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill, 1986). Οι

μικροοργανισμοί αυτοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση και από επιμόλυνση (μείανση).

Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan, 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss, 1996, Huis in't Veld, 1996). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της τροπικής ζώνης, αποτελείται κυρίως από θετικά κατά Gram βακτήρια (coryneforms, Micrococcaceae) και Enterobacteriaceae (Wood, 1953, Gillespie & Macrae, 1975, Shewan, 1977, Liston, 1980, Gram, 1990), αλλά σε αρκετές περιπτώσεις είναι παρόμοια με τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων των εύκρατων κλιμάτων (Colwell & Liston, 1962, Gram et al., 1990).

Τα νωπά αλιευτικά προϊόντα μπορεί να επιμολυνθούν από μια πληθώρα μικροοργανισμών που προέρχονται από το φυσικό τους περιβάλλον, τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας (Jay et al., 2005). Οι ιχθύες οι οποίοι προέρχονται από μολυσμένα ύδατα φέρουν μεγάλους αριθμούς βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (Huss, 1995). Ο άνθρωπος μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα με παθογόνα βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus* του οποίου πολλές φορές είναι φορέας και με εντερικά παθογόνα λόγω έλλειψης ορθής υγιεινής πρακτικής. Επιπλέον, άλλοι μικροοργανισμοί όπως είναι το *Listeria monocytogenes* έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στις επιφάνειες επεξεργασίας και να

δημιουργούν βιοϋμένια. Η επαφή των προϊόντων με τις επιφάνειες αυτές κατά την επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση.

Κατά τη συντήρηση, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram, 1999, Dalgaard, 2003).

1.8. Ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM)

Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου, λόγω της επικράτησης των μικροοργανισμών (Nychas et al., 2008). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές με τις μεταβολές που παρατηρούνται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι η οσμή, το άρωμα και η γενική εμφάνιση (Parlapani et al., 2014). Οι Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss, 1996, Gram & Dalgaard, 2002). Οι EAM αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης των $7-9 \log$ cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους, έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard et al., 1993, Gram & Huss, 1996, Huis in't Veld, 1996). Το

επίπεδο ανάπτυξης των ΕΑΜ, μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιπροσωπεύει την αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Dalgaard, 1993).

Η επικράτηση των ΕΑΜ δεν είναι καθορισμένη αλλά εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά την παραγωγική αλυσίδα, όπως η επεξεργασία, η μεταφορά και η συντήρηση (Nychas et al., 2008). Οι μικροοργανισμοί που τελικά θα επικρατήσουν, είναι αυτοί οι οποίοι διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Είναι γνωστό πλέον ότι σε κάθε τρόφιμο πέντε είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (**Πίνακας 5**). Οι παράγοντες αυτοί μαζί αποτελούν τις συνιστώσες από κάθε ένα διαφορετικό σημείο του τροφίμου, η εξέλιξη του οποίου είναι διαφορετική στο χωροχρόνο, επηρεάζει και επηρεάζεται από τους μικροοργανισμούς. Η τροποποίηση ή ο έλεγχος ενός ή περισσότερων παραγόντων οδηγεί σε διαφορετική επιλογή και εξέλιξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγάλη διάρκεια ζωής (Nychas et al., 2005).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη

Ενδογενής (Intrinsic)	Δομή του κρέατος του μυδιού, a_w , pH, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών
Παράγοντες κατά την επεξεργασία (Processing)	Επηρεάζουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
Εξωγενής (Extrinsic)	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (Implicit)	Ανταγωνισμός και συνεργισμός μεταξύ των βακτηρίων
Συνεργιστικοί παράγοντες	Αλληλεπίδραση παραγόντων

1.9. Αρχική Μικροχλωρίδα

Όπως και με τους ιχθύες, το επίπεδο και το είδος της αρχικής μικροχλωρίδας των δίθυρων μαλακίων αντικατοπτρίζει ένα συνδυασμό παραγόντων, που περιλαμβάνουν το περιβάλλον από το οποίο έχουν συλληφθεί ή έχουν συγκομισθεί, τη διατροφή και τις συνθήκες ζωής τους, τη γεωγραφία της περιοχής που συλλαμβάνονται ή καλλιεργούνται, την εποχή, τη θερμοκρασία και τη ποιότητα των υδάτων στα οποία υπάρχουν. Μετά τη σύλληψη ή τη συγκομιδή, η χλωρίδα θα αλλάξει ανάλογα με τις μεθόδους χειρισμού ή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται. Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με τα δίθυρα μαλάκια εξαρτώνται από τον τρόπο χειρισμού στον οποίο το προϊόν υποβάλλεται, ιδιαίτερα αφού έχει μαγειρευτεί. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της αποκελύφωσης των μαγειρεμένων μυδιών, υπάρχει η δυνατότητα για διασταυρούμενη μόλυνση τόσο από

τον άνθρωπο όσο και από το περιβάλλον. Τα μέτρα ελέγχου για την αποτροπή αυτών των πιθανών κινδύνων που εμφανίζονται περιλαμβάνουν την κατάρτιση και την επίβλεψη των εργατών, καθώς και ορθών πρακτικών υγιεινής (GHP). Κακές διαδικασίες υγιεινής αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης με βακτήρια που είναι επιβλαβή για τη δημόσια υγεία (Reilly, 1992).

1.10. Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι δυνατό να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Η αύξηση ή όχι των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Gram et al., 2002, Skandamis & Nychas, 2002).

Ορισμένα παθογόνα βακτήρια όπως τα *C. Botulinum* type E, παθογόνα στελέχη *Vibrio spp.* και *Aeromonas spp.* απαντώνται φυσικώς στα υδάτινα οικοσυστήματα και άλλα όπως τα *Clostridium botulinum* type A, B και *L. Monocytogenes* απαντώνται γενικότερα στο περιβάλλον (Huss et al., 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να βρεθούν και στα δίθυρα μαλάκια συνήθως σε χαμηλούς πληθυσμούς. Ορισμένα άλλα βακτήρια όπως τα *Salmonella spp.* και διάφορα άλλα εντερικά παθογόνα όπως τα *Shigella spp.*, παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli* κ.ά. είναι δυνατόν να βρεθούν στα υδάτινα οικοσυστήματα και περαιτέρω στους ιχθύες από κόπρανα ανθρώπων και ζώων (Parlapani et al., 2013). Επιπλέον, μικροοργανισμοί όπως το *L. Monocytogenes*, *S. Aureus*, *Bacillus cereus*, *C.*

Perfringens και εντερικά παθογόνα μπορεί να βρεθούν στα αλιευτικά προϊόντα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους (Feldhusen, 2000). Τα παθογόνα βακτήρια ως επί το πλείστον απαιτούν θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 5 °C για την αύξησή τους. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά ανταγωνίζονται με τους αλλοιγόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι πολλαπλασιάζονται συγκριτικά πιο γρήγορα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Tsigarida et al., 2000). Έτσι, τα επιμολυσμένα προϊόντα πιθανόν να αλλοιωθούν πριν από την παραγωγή της τοξίνης ή την αύξηση μεγάλου αριθμού παθογόνων. Όταν τα προϊόντα αυτά μαγειρευθούν εξαλείφεται σχεδόν ο κίνδυνος πρόκλησης τροφοδηλητηριάσεων (Feldhusen, 2000). Οι μικροοργανισμοί της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης είναι δυνατό να παρεμποδίσουν ή να ευνοήσουν την αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών (Jay, 1996, Tsigarida et al., 2000, Vold et al., 2000). Οι Tsigarida et al. (2000), μελετώντας την επίδραση της συσκευασίας σε κενό (vacuum packaging), σε MAP (40%CO₂/ 30%O₂/ 30%N₂) και σε αέρα στην αύξηση/επιβίωση του *L. Monocytogenes* σε ιστό βόειου κρέατος, αναφέρουν ότι όταν τα *Pseudomonas spp.* αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό (στην αερόβια συσκευασία και σε MAP/ VP σε υψηλής διαπερατότητας φιλμ) ευνοείται η αύξηση του παθογόνου. Σε άλλες όμως συνθήκες (MAP/VP με χαμηλής διαπερατότητας φιλμ) όπου ο κυρίαρχος πληθυσμός είναι το *B. thermosphacta*, δεν παρατηρείται αύξηση του παθογόνου. Το *L. Monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, η παρουσία του οποίου έχει αναφερθεί αρκετές φορές στα αλιεύματα (Jørgensen & Huss 1998, Gram, 2001). Στις συσκευασίες των αλιευμάτων σε MAP, η αύξηση του *L. Monocytogenes* πολλές φορές δεν παρεμποδίζεται (Gibson & Davis, 1995). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη πρόσθετων εμποδίων όπως είναι τα φυσικά ή/και τα χημικά συντηρητικά αποτελούν αποτελεσματική λύση στο παραπάνω πρόβλημα (Parlapani et al., 2014).

1.11. Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας

Οι μικροβιολογικοί δείκτες χρησιμοποιούνται είτε ως δείκτες της γενικότερης μικροβιολογικής κατάστασης και της υγιεινής των πρώτων υλών, των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων και των χώρων παραγωγής, είτε ως δείκτες δυνητικών μικροβιολογικών κινδύνων (παθογόνοι μικροοργανισμοί).

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες υγιεινής διαφέρουν από χώρα σε χώρα και από περιοχή σε περιοχή διότι δεν υπάρχουν γενικοί σταθερότυποι που να ορίζουν ποιοι δείκτες είναι πιο χρήσιμοι ή ποιοι είναι απαραίτητο να μετρηθούν (Samakura et al., 2003).

Οι πιο κοινοί δείκτες σήμερα είναι τα κολοβακτηριοειδή (Total coliforms), το *Enterococcus spp.* και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal coliforms) (Noble et al., 2003). Επειδή, όμως, το μεγαλύτερο ποσοστό των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων αποτελείται από το είδος *E. coli* και είναι αμφισβητούμενο το γεγονός αν τα υπόλοιπα βακτήρια των ειδών *Citrobacter*, *Enterobacter*, και *Klebsiella* κατά πόσο θα μπορούσαν να είναι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, η U.S. Environmental Protection Agency το 1986 πρότεινε ως πιο αξιόπιστο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης το είδος *E. coli* (<http> 2).

Η παρουσία των μικροοργανισμών δεικτών στα τρόφιμα σε πληθυσμό που ξεπερνά ένα προκαθορισμένο όριο σε cfu/g τροφίμου δε συνεπάγεται την ύπαρξη παθογόνων αλλά καθιστά πιθανή την παρουσία τους (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000).

Οι μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια (Jay, 2005):

- Να υπάρχουν στο τρόφιμο όταν υπάρχει ο παθογόνος μικροοργανισμός για την παρουσία του οποίου αποτελούν ένδειξη.

- Να απουσιάζουν από τα τρόφιμα όταν αυτά δε φέρουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή να υπάρχουν σε πολύ μικρό αριθμό.
- Ο πληθυσμός τους στο τρόφιμο να βρίσκεται σε συσχέτιση με τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού.
- Να έχουν απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και ρυθμό ανάπτυξης παρόμοια με τον παθογόνο.
- Ο ρυθμός καταστροφής τους να είναι τουλάχιστον όμοιος με του παθογόνου και σε ιδανικές περιπτώσεις να είναι ελαφρά ανθεκτικότεροι από τον παθογόνο.

Οι μικροοργανισμοί δείκτες κοπρανόδους μόλυνσης των τροφίμων πρέπει επιπλέον (Jay, 2005):

- Να απαντώνται μόνο στον εντερικό σωλήνα.
- Να βρίσκονται σε αρκετά υψηλούς πληθυσμούς στα κόπρανα ώστε να είναι δυνατό να καταμετρηθούν ακόμη και σε μεγάλες αραιώσεις.
- Να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο περιβάλλον του υπό εξέταση τροφίμου.
- Να μπορούν εύκολα να προσδιορισθούν ακόμη και όταν απαντώνται σε χαμηλό πληθυσμό.

1.12. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της αλλοιογόνου δυναμικής των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολικών τους προϊόντων που προκαλούν την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη. Περαιτέρω, είναι δυνατό η χρήση τέτοιων

μεταβολιτών ως χημικοί δείκτες μικροβιολογικής αλλοίωσης. Οι κυριότεροι χημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N) (Scherer et al., 2006, Mol et al., 2007).

Το TVB-N όπως και στους ιχθύες έτσι και στην περίπτωση των δίθυρων μαλακίων παραμένει σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης (<20mgN/100g), άρα δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας τους στο στάδιο της αποθήκευσης (Manousaridis et al., 2005), κάτι που δεν ισχύει για τα καρκινοειδή όπου το TVB-N παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα αρχικά στάδια της συντήρησης (Boziaris et al., 2008). Επιπλέον, η τιμή του TMA είναι αρκετά υψηλή από τα πρώτα στάδια της αλλοίωσης στα καρκινοειδή (καραβίδα, καβούρι κ.α) που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα (Boziaris et al., 2008, Parlapani et al., 2015).

1.13. Συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες

Η διάρκεια ζωής των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού και από τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Pastoriza et al., 1996). Η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες και ειδικότερα στον πάγο, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τρόπους συντήρησης των ιχθύων (Kyrgana et al., 1997). Πληθώρα πειραμάτων έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την εκτίμηση του χρόνου ζωής των ιχθύων σύμφωνα με τις οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε θερμοκρασίες ψύξης. Η διάρκεια ζωής των ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στον πάγο, κυμαίνεται συνήθως από 15 έως 18 ημέρες, ενώ του λαβρακιού από 11 έως 15 ημέρες. Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής παρατηρήθηκε στο

σολομό (*Salmo salar*) από τη Β. Ευρώπη όπου ο χρόνος ζωής εκτιμάται σε 20 ημέρες. Ο χρόνος ζωής μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Η θερμοκρασία των υδάτων από όπου αλιεύονται οι ιχθύες επιδρά σημαντικά στη διάρκεια του χρόνου ζωής τους (Sumner et al., 1986). Οι ιχθύες των τροπικών κλιμάτων που συντηρούνται σε πάγο παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από αυτή των ιχθύων των ψυχρότερων κλιμάτων (Disney, 1976, Shewan, 1977, Lima dos Santos, 1981, Gram, 1989). Στο παρελθόν έχει αναφερθεί ότι η διατηρησιμότητα ιχθυηρών από την ανατολική Αφρική ξεπερνά τις τρεις εβδομάδες (Disney et al., 1969). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί σύμφωνα με το ότι η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων που προέρχονται από τροπικά κλίματα αποτελείται από μικρότερο αριθμό ψυχρόφιλων ή ψυχρότροφων μικροοργανισμών από ότι η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων από τα ψυχρότερα κλίματα (Shewan, 1977). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων που προέρχονται από τα ψυχρά ύδατα αποτελείται κυρίως από ψυχρότροφους αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, οι οποίοι πιθανόν δεν υπόκεινται θερμικό σοκ με την τοποθέτηση των ιχθύων στον πάγο, με αποτέλεσμα να προσαρμόζονται συντομότερα από αυτούς που εποικούν στους ιχθύες των τροπικών κλιμάτων, να εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και τελικά ορισμένοι από αυτούς να φθάνουν συντομότερα σε αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση (Ashie et al., 1996).

1.14. Συντήρηση σε συσκευασία MAP (Modified Atmosphere Package)

Παράλληλα με την αποθήκευση των ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες, έχουν αναπτυχθεί άλλες τεχνολογίες με σκοπό την διατήρηση της ποιότητας και την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των τροφίμων. Μεταξύ αυτών των

τεχνολογιών, η συσκευασία σε MAP έχει υιοθετηθεί από ένα μεγάλο αριθμό Βιομηχανιών Τροφίμων στην Ευρώπη (Davies, 1995), καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων, η οποία σε συνδυασμό με θερμοκρασίες ψύξης είναι ικανή να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος. Τα αέρια που συνθέτουν την ατμόσφαιρα MAP είναι το CO₂, το O₂ και το N₂. Το CO₂ χρησιμοποιείται συνήθως σε υψηλή συγκέντρωση εξαιτίας της βακτηριοστατικής δράσης του. Η χρήση του CO₂ στις συσκευασίες MAP επιμηκύνει σημαντικά τη φάση προσαρμογής και μειώνει τον ειδικό ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών σε αντίθεση με τη συσκευασία αέρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Farber, 1991, Nosedá et al., 2012). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η επιμήκυνση του εμπορικού χρόνου ζωής του προϊόντος. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των αλιευτικών προϊόντων σε MAP είναι δυνατόν να αυξηθεί από μερικές ημέρες έως και μία εβδομάδα ή/και περισσότερο (Pastoriza et al., 1998). Οι Pastoriza et al. (1998) αναφέρουν ότι ο χρόνος ζωής φιλέτων μπακαλιάρου (*Merluccius merluccius*) στους 0 °C ήταν 7 ημέρες κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες και 14 ημέρες κατά τη συντήρησή τους υπό συνθήκες MAP (50% CO₂ 5% O₂ 45% N₂), γεγονός που δείχνει ότι ο χρόνος ζωής αυξήθηκε 100% με τη χρήση του MAP. Το O₂, το οποίο ευνοεί την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών που ευθύνονται για την αλλοίωση των αλιευμάτων, χρησιμοποιείται σε χαμηλά επίπεδα (Sivertsvik et al., 2002). Το N₂ είναι αδρανές αέριο και δεν επιδεικνύει αντιμικροβιακή δράση. Στη συσκευασία MAP όμως, αντικαθιστά πολλές φορές το O₂ επιβραδύνοντας την οξειδωτική τάγγιση και παρεμποδίζοντας την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών (Sivertsvik et al., 2002).

Η χρήση του CO₂ σε αρκετά υψηλή αναλογία και η έλλειψη O₂ μπορεί να αποτελέσει απειλή για τον καταναλωτή διότι επιτρέπει, υπό συγκεκριμένες συνθήκες

συντήρησης, την αύξηση του υποχρεωτικά αναερόβιου παθογόνου βακτηρίου *Clostridium botulinum*. Η χρήση του O₂ είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου αυτού βακτηρίου (Lannelongue et al., 1982). Το CO₂ ακόμη και σε συγκέντρωση 5-10% είναι δυνατόν να αναστείλει την αύξηση των αερόβιων βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται στα αλιεύματα σε θερμοκρασίες ψύξης και είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση στις συνθήκες αυτές (Dainty, 1971). Σύμφωνα με Davies (1997), η συσκευασία σε MAP αν και είναι δυνατόν να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής ενός αλιευτικού προϊόντος, παράλληλα μπορεί να επιτρέψει την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να αναπτύξουν προσαρμοστικότητα σε αντίξοα περιβάλλοντα (Davies, 1997, Skandamis & Nychas, 2002). Η χρήση πρόσθετων εμποδίων όπως είναι τα φυσικά συντηρητικά ή άλλες νεοεμφανιζόμενες τεχνολογίες αποτελούν σημαντικά υποσχόμενα όπλα για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων.

1.15. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τους αλλοιογόνους και τους τροφιμογενούς παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθυρα μαλάκια.

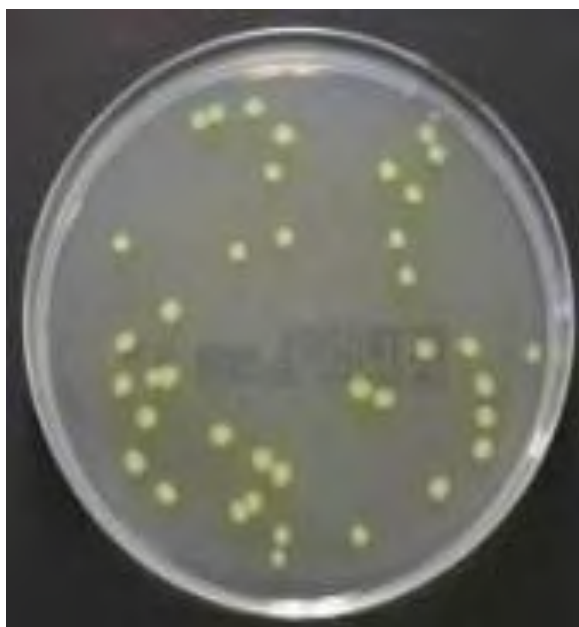
2. ΑΛΛΟΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΔΙΘΥΡΑ ΜΑΛΑΚΙΑ

2.1.Γενικά

Τα δίθυρα μαλάκια είναι ιδιαίτερα ευπαθή προϊόντα. Η ταχεία μείωση της ποιότητας και της φρεσκάδας προκαλείται από μικροβιακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς. Η παραγωγή των μικροβιακών μεταβολιτών οφείλεται σε μικροβιακή ανάπτυξη και επηρεάζει την οσμή των προϊόντων αυτών (Gram & Huss, 1996). Στην μετά θάνατον δραστηριότητα τα αυτολυτικά ένζυμα εντός των μυών επιφέρουν διάφορες αλλαγές κατά την αποθήκευση-συντήρηση, ενώ η ενζυματική αμαύρωση του κελύφους των δίθυρων μαλακίων προκαλεί την απώλεια του αρχικού χρώματός τους (Ashie et al., 1996).

Ωστόσο, ο κύριος μηχανισμός αλλοίωσης είναι η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, η οποία οδηγεί στην παραγωγή δυσάρεστων οσμών (Dainty, 1996, Gram & Huss, 1996). Οι EAM και κατά συνέπεια οι μεταβολίτες που παράγονται εξαρτώνται από τις συνθήκες αποθήκευσης και τον τόπο συγκομιδής (Drosinos & Nychas, 1997, Gram & Dalgaard, 2002). Η *Shewanella putrefactions* και το *Pseudomonas spp* (Εικόνα 2.1) είναι οι EAM των ψαριών προερχόμενα από εύκρατα νερά που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gram & Huss, 1996, Koutsoumanis & Nychas, 1999, Koutsoumanis et al., 2000, Parlapani et al., 2014, 2015). Κυρίως τα υδροθειούχο-παραγωγά βακτήρια και δευτερευόντως τα *Pseudomonas spp.* αποτελούν τις κύριες πηγές αλλοίωσης της μικροβιακής χλωρίδας των δίθυρων μαλακίων που αλιεύεται στην Ισπανία, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Enterobacteriaceae βρίσκονται σε χαμηλούς πληθυσμούς, κάτω του ορίου ανίχνευσης (Anacleto et al., 2011). Αντίθετα σε δίθυρα

μαλάκια που αλιεύτηκαν στην Ελλάδα τα *Pseudomonas spp.* ήταν τα κυρίαρχα (Anacleto et al., 2011)



Εικόνα 2.1 *pseudomonas spp.*

Η φρεσκότητα των δίθυρων μαλακίων είναι το πιο σημαντικό κριτήριο κατά την αξιολόγηση της ποιότητας. Αξιολογείται χρησιμοποιώντας οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεθόδους (Goulas, et al. 2004, Manousaridis, et al. 2004 Olafsdottir, et al., 1997). Η οργανοληπτική αξιολόγηση είναι υποκειμενική και απαιτεί άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό για να είναι αξιόπιστη (Dainty, 1996).

Το ολικό βασικό πτητικό άζωτο (TVBN) και η Τριμεθυλαμίνη (TMA-N) δεν φαίνεται να είναι χημικοί δείκτες αλλοίωσης τουλάχιστον μέχρι την ημέρα που το τρόφιμο έχει απορριφθεί (Goulas et al., 2004). Το TVBN και TMA συνήθως συσχετίζονται με την μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών που προκαλούν

αλλοιώσεις στα μεσογειακά δίθυρα μαλάκια μόνο στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Manousaridis, et al., 2004, Kirana et al., 1997, Koutsoumanis & Nychas, 2000, Kirana & Louvois, 2002, Parlapani et al., 2016). Ως εκ τούτου, η χρήση αυτών των χημικών δεικτών είναι περιορισμένη, λόγω της αδυναμίας να ανιχνευθεί πριν από τις τελευταίες φάσεις της αποθήκευσης (Kirana et al., 1997, Castro et al., 2006).

Όπως και με τους ιχθύες, υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάρκεια ζωής των τροπικών οστρακόδερμων είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ειδών εύκρατων υδάτων εάν αποθηκευθούν σωστά σε πάγο, για παράδειγμα, έως και 16 ημέρες για τα τροπικά είδη σε σύγκριση με 8-10 ημέρες για εύκρατα είδη (Cann, 1976). Τα ψυχρότροφα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση φθοράς δεν υπάρχουν στα ολόφρεσκα μαλάκια από τροπικά νερά σε τόσο υψηλά επίπεδα, όπως βρίσκονται σε μαλάκια από τα πιο δροσερά ύδατα και, ως εκ τούτου, ο ρυθμός επιδείνωσης των μαλακίων από αυτούς τους οργανισμούς μειώνεται, ιδιαίτερα αν αποθηκεύονται σε πάγο ή παγωμένο νερό (Ashie et al., 1996).

2.2. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα μύδια

Ο προσδιορισμός/ταυτοποίηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα πραγματοποιείται κυρίως με φαινοτυπικές δοκιμές μετά από απομόνωση των μικροοργανισμών που απαντώνται στον ιστό του αλιεύματος σε θρεπτικά υλικά. Κατά καιρούς, διάφοροι ερευνητές μελέτησαν τη μικροβιακή σύνθεση των μυδιών είτε σε εκλεκτικά ή σε γενικής χρήσης θρεπτικά υλικά με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κάθε αποικίας (Gram et al., 1987, Jorgensen & Huss, 1989, Dalgaard, 1995, Gennari et al., 1992, Rodriguez et al., 2003, Tryfinopoulou et al., 2002, 2007).

Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε έχει βρεθεί ότι ο επικρατέστερος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε αποκελυφωμένα μύδια προερχόμενα από το Ιόνιο Πέλαγος είναι τα βακτήρια του γένους, *Pseudomonas*. Με δεύτερους επικρατέστερους μικροοργανισμούς να είναι τα υδροθειουχο-παραγωγά βακτήρια, ενώ ακολούθησαν τα βακτήρια του γένους *Brochothrix*, σε αρκετά χαμηλότερους πληθυσμούς από τους δύο πρώτους μικροοργανισμούς. Τέλος τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης (<2logcfu/g) (Manousaridis et al., 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο πείραμα υπήρχαν τρεις παρτίδες μυδιών εκ των οποίων στις δύο πρώτες τα μύδια εμπλουτίστηκαν με όζον για 90 και 60 λεπτά αντίστοιχα, ενώ η τρίτη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, στην συνέχεια και οι τρεις παρτίδες τοποθετήθηκαν σε vacuum. Σύμφωνα με τους Goulas et al. (2005), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* είναι ο επικρατέστερος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός και στα μύδια του Ιονίου πέλαγους υπό συνθήκες συντήρησης σε διάφορες συνθήκες (αερόβιες, MAP, vacuum), με τιμή της τάξης των $7 \times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$, ενώ ακολουθούν τα υδροθειούχο – παραγωγά (H₂S). Ομοίως, οι Pastoriza et al. (2004), ανέφεραν μια τιμή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας(OMX) κοντά στους 7 log cfu/g για μύδια στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Έχει βρεθεί ότι το μείγμα αερίων (CO₂ / N₂) 80/20 σε συσκευασία MAP ήταν η πιο αποτελεσματική για την αναστολή της ανάπτυξης της OMX. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην ανασταλτική επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του CO₂ (80%) επί της μικροβιακής ανάπτυξης σε συνδυασμό με την απώλεια του O₂. Η συνθήκη αυτή αναστέλλει την ανάπτυξη των αερόβιων Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως η *Pseudomonas spp.* και *Shewanella spp.* και τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης (Farber, 1991, Debevere, 1996, Gram, 1996,

Sivertsvik et al., 2002). Παρόμοιες επιδράσεις της MAP έχουν αναφερθεί για διάφορα θαλάσσια είδη. Οι Ozogul et al. (2004), ανέφεραν ότι η OMX αναπτύχθηκε πιο γρήγορα σε σαρδέλες (*Sardina pilchardus*) που ήταν αποθηκευμένες στον αέρα, από εκείνες που συντηρήθηκαν σε MAP (60% CO₂ και 40% N₂). Αναλυτικότερα στην παραπάνω εργασία, προσδιορίστηκε ο εμπορικός χρόνος ζωής και η μικροβιακή οικολογία μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: a)αερόβιες συνθήκες, b)Vacuum, c)MAP.

Στην περίπτωση της MAP, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συνταγές (M₁: 50%/50% CO₂/N₂, M₂: 80%/20%CO₂/N₂, M₃: 40%/30%/30%CO₂/N₂/O₂). Σε όλες τις συνθήκες συντήρησης εκτός της M₁, M₂ επικρατέστεροι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ήταν τα βακτήρια του γένους, *Pseudomonas*, με δεύτερους τα υδροθειουχο-παραγωγά βακτήρια, ενώ ακολούθησαν τα βακτήρια του γένους *Brochothrix*, σε αρκετά χαμηλότερους πληθυσμούς από τους δύο πρώτους μικροοργανισμούς. Τέλος τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης (<2logcfu/g) (Manousaridis et al., 2005). Όσον αφορά τις δυο περιπτώσεις της M₁, M₂ επικρατέστεροι μικροοργανισμοί ήταν και πάλι τα *Pseudomonas spp.*, με πολύ μικρή όμως διαφορά από τα δεύτερα βακτήρια (υδροθειουχο-παραγωγά) , γεγονός όμως που χαρακτηρίστηκε απρόσμενο, καθώς τα αερόβια *Pseudomonas spp.* βρέθηκαν να είναι EAM σε αναερόβιες συνθήκες (0% O₂) Τέλος, τα *Brochothrix* και τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πολύ χαμηλούς πληθυσμούς κάτω του ορίου ανίχνευσης (<2 logcfu/g). Οι μεταβολές της OMX σε κάθε τύπο συντήρησης, παρουσιάζονται στον (Πίνακα 6) . Όπως προκύπτει από τον πίνακα, η OMX φαίνεται να κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στο vacuum και σε αερόβιες συνθήκες χωρίς την παρουσία νερού (μάρτυρας 2), αφού στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής η τιμή δεν φτάνει τους 7 log, ενώ στην αρχή της συντήρησης

και μέχρι την πέμπτη ημέρα, η τιμή δεν αυξάνεται παρά μόνο 0,8 log. Η μεγαλύτερη τιμή παρατηρείται στις συνθήκες MAP M3 όπου την ημέρα απόρριψης η OMX αγγίζει τους 8,2 log, κάτι που δεν ισχύει για τις M1 και M2, αφού απόντος του οξυγόνου, η τιμή κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα με διαφορά 0,3 log και 1,2 log αντίστοιχα, στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Μεταβολές στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα για συσκευασμένα μύδια υπό ψύξη κάτω από διάφορες συνθήκες (Goulas et al., 2004).

Storage time (days)	Packaging atmosphere					
	Vacuum (VP)	50/50 CO ₂ /N ₂ (M1)	80/20 CO ₂ /N ₂ (M2)	40/30/30 CO ₂ /N ₂ /O ₂ (M3)	Air/water (control 1)	Air without water (control 2)
1	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2
3	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1
5	5.2 ± 0.3	5.5 ± 0.3	4.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.8 ± 0.4	5.2 ± 0.3
8	6.5 ± 0.3	7.2 ± 0.4	6.5 ± 0.3	7.5 ± 0.3	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.3
11	6.8 ± 0.2	7.8 ± 0.5	6.9 ± 0.4	8.1 ± 0.5	7.5 ± 0.3	7.6 ± 0.4
15	7.0 ± 0.3	7.9 ± 0.4	7.0 ± 0.3	8.6 ± 0.4	8.0 ± 0.4	7.9 ± 0.3

Οι διαφορές της τιμής της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, σχετίζεται κυρίως με την απόδοση και την προσαρμοστικότητα κυρίως των *Pseudomonas spp.*, στις μεταβολές των συνθηκών που σχετίζονται με την παρουσία ή μη του οξυγόνου. Ως αερόβιοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αυξηθούν σε αναερόβιες συνθήκες, με αποτέλεσμα να επεκτείνεται ο εμπορικός χρόνος ζωής του τροφίμου. Σε τέτοιες συνθήκες, EAM χαρακτηρίζονται με ελάχιστη διαφορά τα *Pseudomonas spp.* με δεύτερα υδροθειουχο- παραγωγά βακτήρια ενώ ακολουθούν τα οξυγαλακτικά, σύμφωνα πάντα με την παρούσα έρευνα.

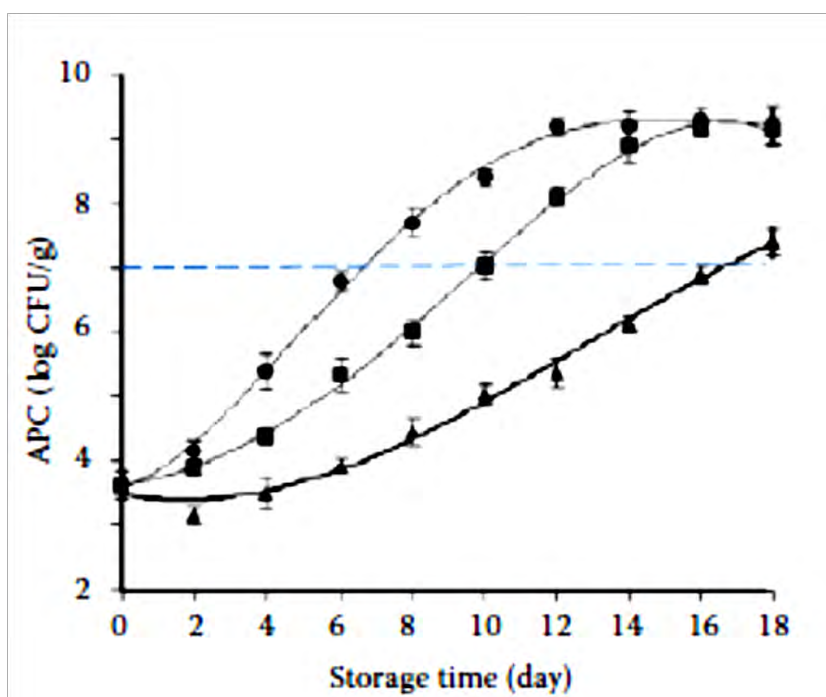
Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* σχετίζονται με την παραγωγή TVB-N ως πρωτεολυτικά ψυχρότροφα που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες στα θαλασσινά, παράγοντας πτητικές ενώσεις αμμωνιακής φύσεως, που προκύπτουν από την απαμίνωση των αμινοξέων και άλλων πρωτεϊνικών ενώσεων (Dainty, 1996).

2.3. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα στρείδια

Τα στρείδια είναι σε μεγαλύτερη αφθονία από τα δίθυρα μαλάκια για συγκομιδή στον κόσμο και είναι επίσης υψηλής τιμής. Όπως τα φρέσκα θαλασσινά, έτσι και τα στρείδια είναι πιο ευπαθή από τα άλλα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες τρόφιμα και έχουν σύντομη διάρκεια ζωής, η οποία προκαλεί σημαντικά πρακτικά προβλήματα για τη διανομή τους. Στα θαλασσινά προϊόντα, οι αλλαγές στη γεύση, την οσμή, την υφή και το χρώμα αντικατοπτρίζουν το επίπεδο της φρεσκότητας ή αποσύνθεσης, που προκαλείται κυρίως από την μικροβιακή δραστηριότητα (Gram & Huss, 1996).

Η μικροχλωρίδα των μαλακίων ποικίλλει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από εκείνη των ψαριών. Η μικροχλωρίδα είναι στενά συνδεδεμένη με διάφορους παράγοντες όπως η αλατότητα, η περιβαλλοντικές συνθήκες, το μικροβιακό φορτίο στο νερό, η θερμοκρασία του νερού, οι διατροφικές συνήθειες, οι μέθοδοι σύλληψης και οι τρόποι συντήρησης. Μετά τη σύλληψη ή τη συγκομιδή τους, η χλωρίδα θα αλλάξει ανάλογα με τις μεθόδους χειρισμού ή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται. Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι συνδέονται με το βαθμό χειρισμού που υποβάλλεται το προϊόν, ιδιαίτερα αφού έχει μαγειρευτεί (Wan Norhana et al., 2010).

Οι αλλαγές στους πληθυσμούς βρισκόμενοι σε τρυβλία υπό αερόβιες συνθήκες (APC) των στρειδιών κατά την αποθήκευσή τους στους 10 °C, 5 °C και 0 °C φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) (Cao et al., 2009).



Διάγραμμα 1 Αλλαγές στους πληθυσμούς βρισκόμενους σε τρυβλία υπό αερόβιες συνθήκες (APC) των στρειδιών κατά την αποθήκευσή τους στους 10 °C, 5 °C και 0 °C (Cao, et al., 2009).

Αν και οι αρχικές τιμές μικροβίων στα δίθυρα μαλάκια ποικίλουν ανάλογα με πολλούς παράγοντες, οι τιμές είναι γενικά μεταξύ 10^2 έως 10^5 cfu/g. Η αρχική αλλαγή στους πληθυσμούς βρισκόμενοι σε τρυβλία υπό αερόβιες συνθήκες (APC) στα φρέσκα στρείδια βρέθηκε να είναι $3,2 \times 10^3$ cfu/g, η οποία κυμαίνονταν στα επίπεδα που βρέθηκαν σε προηγούμενες μελέτες για τα νωπά υδρόβια προϊόντα. Ταχεία αύξηση παρατηρήθηκε στις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 10 °C και 5 °C, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν φάσεις υστέρησης. Οι Kim et al. (2002) πρότειναν ένα συνολικό αριθμό 10^7 cfu/g ως αποδεκτό όριο ποιότητας των στρειδιών. Τα δείγματα

που αποθηκεύθηκαν στους 10 °C και 5 °C έφτασαν περίπου αυτές τις τιμές κατά την ημέρα 6 και την ημέρα 10, αντίστοιχα. Στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 0 °C, παρατηρήθηκε μία μείωση στην αύξηση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια των πρώτων 4 ημερών αποθήκευσης και μια φάση υστέρησης περίπου 6. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 0 °C, οι τιμές στα δείγματα ήταν πάντοτε χαμηλότερες από εκείνες στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 10 °C και 5 °C και ξεπέρασε το επίπεδο των 10⁷ cfu/g την ημέρα 18.

Κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί φαίνεται να είναι οι *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens* και οι *Moraxella/Acinetobacter* και σε μικρότερο βαθμό οι *Aeromonas* και οι *Psychrobacter* (Ashie et al., 1996, Gram & Huss, 1996).

Η μικροχλωρίδα των φρέσκων στρειδιών φάνηκε να είναι περίπλοκη με 85 στελέχη να έχουν αναγνωριστεί και να έχουν ταξινομηθεί σε 13 γένη. Από τα 85 στελέχη που απομονώθηκαν το 23% (14 στελέχη) και 20% (12 στελέχη) αντιστοιχούσε σε *Pseudomonas* και *Vibrionaceae*, αντίστοιχα. Οι *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, οξυγαλακτικά, και οι *Bacillus* ανιχνεύθηκαν επίσης αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Από αυτά που βρέθηκαν, τα Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Vibrionaceae* ήταν κυρίαρχα. (Πίνακας 8)(Cao et al., 2009)

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας από φρέσκων στρειδιών του Ειρηνικού (Cao et al., 2009).

Bacteria groups	Raw oysters (%)	Spoiled Pacific oysters (%) ^a		
		10°C	5°C	0°C
<i>Pseudomonas</i>	22	42	60	66
<i>Vibrionaceae</i>	20	18	22	18
<i>Shewanella</i>	5	–	–	–
<i>Alcaligenes</i>	6	2	–	–
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	11	1	–
<i>Moraxella</i>	7	6	7	7
<i>Acinetobacter</i>	2	–	–	–
<i>Flavobacterium</i>	8	8	3	5
Total Gram-negative	75	87	93	96
<i>Corynebacterium</i>	3	–	–	–
<i>Staphylococcus</i>	3	–	–	–
<i>Micrococcus</i>	7	5	2	2
Lactic acid bacteria	6	4	1	–
<i>Bacillus</i>	2	2	–	1
Total Gram-positive	21	11	3	3
Unidentified	4	2	4	1
Total	100	100	100	100

Στην συγκεκριμένη έρευνα συλλέχθηκαν στρείδια του είδους *Crassostrea gigas* εμπορικού μεγέθους εκτρεφόμενα από την Κίτρινη Θάλασσα (Κίνα) μεταφέρθηκαν στον πάγο μέχρι το εργαστήριο. Όλα τα στρείδια εμβαπτίστηκαν σε κρύο νερό (5°C) με 3,5% θαλασσινό αλάτι για 30 λεπτά. Αφού καθαρίστηκαν τα στρείδια αποφλοιώθηκαν και τυλίχθηκαν ξεχωριστά σε πλαστικές σακούλες. Όλα τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 διαφορετικές ομάδες οι οποίες αποθηκεύτηκαν στους 0°C, 5 °C, 10 °C, αντίστοιχα η κάθε ομάδα. Τα δείγματα εξετάζονταν ανά 48 ώρες, όπου λαμβάνονταν έξι τυχαία δείγματα από κάθε ομάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το ποσοστό των Gram -αρνητικών βακτηρίων ήταν σημαντικά υψηλότερο στα στρείδια υπό ψύξη απ' ότι των φρέσκων στρειδιών, με τους *Pseudomonas* να ανέρχονται στο ύψος του 42 % (10 °C), 60 % (5 °C) , και 66 % (0 °C) , αντίστοιχα. Τα *Pseudomonas* και *Shewanella* φάνηκαν να είναι οι πλέον κυρίαρχοι μικροοργανισμοί κατά τη

διάρκεια της αποθήκευσης στο πάγο. Στο τέλος της διάρκειας ζωής, δεν ανιχνεύθηκαν *Shewanella spp.*. Ο λόγος μπορεί να είναι ότι τα *Shewanella spp.* συνιστούσαν χαμηλό αρχικό ποσοστό (5%) και ανεστάλησαν από τα *Pseudomonas spp.* υδροθειούχο-παραγωγά βακτήρια, κυρίως *Shewanella putrefaciens* και *Pseudomonas spp.*, είναι δύο ισχυρά ανταγωνιστικοί ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Koutsoumanis et al., 1999). Οι Gram και Melchiorson (1996) ανέφεραν ότι *Pseudomonas spp.* θα μπορούσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη των υδροθειούχο-παραγωγών βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένων *Shewanella putrefaciens*) λόγω της ικανότητας του πρώτου να παράγει σιδεροφόρα.

3. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ

3.1 Γενικά

Η πρόληψη των ασθενειών και η προστασία των περιοχών καλλιέργειας δίθυρων μαλακίων είναι ευθύνη των παραγωγών, των αντιπροσωπειών τροφίμων, και του κοινού. Τα κύρια μέτρα ελέγχου περιλαμβάνουν:

- Εκπαίδευση του κοινού σχετικά με το που και πότε μπορεί να συλλέξει δίθυρα μαλάκια ,καθώς και σχετικά με τους κινδύνους που σχετίζονται με την κατανάλωση ακατέργαστων δίθυρων μαλακίων.
- Παροχή δυνατότητας σε παραγωγούς και αντιπροσώπους να ελέγχουν το ύδωρ και τα δίθυρα μαλάκια σε διαπιστευμένα εργαστήρια.
- Προστασία των υδάτων από τη μόλυνση.
- Εκπόνηση και επιβολή κανονισμών εμπορίας δίθυρων μαλακίων.
- Γρήγορη, συντονισμένη απάντηση και δημόσια επιφυλακή σε περιπτώσεις έκτακτων αναγκών.

Το πολύ καλό μαγείρεμα των μολυσμένων δίθυρων μαλακίων μπορεί να μειώσει τον αριθμό των μικροοργανισμών. Εντούτοις, μερικά βακτήρια παράγουν τοξίνες που δεν καταστρέφονται με το μαγείρεμα. Λόγω αυτού του κινδύνου, είναι σημαντικό να καταναλώνονται μόνο δίθυρα μαλάκια που συγκομίζονται από καθαρές θαλάσσιες περιοχές.

Τα δίθυρα μαλάκια που διατίθενται στο εμπόριο είναι αρκετά δύσκολο να χαρακτηριστούν ασφαλή με βεβαιότητα, καθώς οι αρχές ελέγχου δεν είναι εύκολο να διαπιστώσουν πάντα με σιγουριά κατά πόσο αυτά έχουν διατηρηθεί σε χαμηλές

θερμοκρασίες από τη συγκομιδή έως την πώληση. Επιπλέον, ο μέγιστος χρόνος από τη συγκομιδή έως την πώληση των φρέσκων δίθυρων μαλακίων από τα οποία έχει αφαιρεθεί το κέλυφος τίθεται από τις βιομηχανίες επεξεργασίας και, σε μερικές περιπτώσεις, η επεξεργασία τους είναι αρκετά μακροχρόνια για να μπορεί να εγλυθηθεί την ασφάλεια. Το καλύτερο μέτρο πρόληψης είναι να καταναλώνονται τα δίθυρα μαλάκια μαγειρεμένα και όχι ακατέργαστα, ειδικά το καλοκαίρι (Savage, 1995).

Τα δίθυρα μαλάκια είναι δυνατό να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία.

Η αύξηση ή όχι των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Gram et al., 2002, Skandamis & Nychas, 2002).

Ορισμένα παθογόνα βακτήρια όπως τα *C. Botulinum* type E, παθογόνα στελέχη *Vibrio spp.* και *Aeromonas spp.* απαντώνται φυσικώς στα υδάτινα οικοσυστήματα και άλλα όπως τα *Clostridium botulinum* type A, B και *L. monocytogenes* απαντώνται γενικότερα στο περιβάλλον (Huss et al., 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να βρεθούν και στους ιχθύες συνήθως σε χαμηλούς πληθυσμούς. Ορισμένα άλλα βακτήρια όπως τα *Salmonella spp.* και διάφορα άλλα εντερικά παθογόνα όπως τα *Shigella spp.*, παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli*, κ.ά. είναι δυνατόν να βρεθούν στα υδάτινα οικοσυστήματα και περαιτέρω στους ιχθύες από κόπρανα ανθρώπων και ζώων (Feldhusen, 2000).

3.2 *Escherichia coli* (**E. coli**)

Η κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη κολοβακτηρίδιο. Έχει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών, της οποίας αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος. Αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας και γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά και ενζυμολογίας (<http> 2).

Αποτελεί το πιο κοινό αερόβιο μικροοργανισμό του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων και αποβάλλεται σε μεγάλους αριθμούς στα κόπρανα. Αν και είναι απαραίτητο στοιχείο της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου (όπου παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της βιταμίνης K), είναι μικρόβιο παθογόνο που προκαλεί μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων. Είναι το συχνότερα απομονωμένο μικρόβιο από τις καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων (Gross , 1999).

Τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές περιπτώσεις διάρροιας σε όλες τις ηλικιακές ομάδες με την παραγωγή μιας ισχυρής ενδοτοξίνης. Η θεραπεία αυτών των λοιμώξεων με αντιβιοτικά μπορεί να προκαλέσει έντονη αντίδραση με επακόλουθο θάνατο σε ασθενείς, καθώς το μεγαλύτερο ποσό της ισχυρής βακτηριακής ενδοτοξίνης απελευθερώνεται μετά το θάνατο του κυττάρου (Αρσένη, 1996).

Η *E. coli* είναι Gram αρνητικό, αερόβιο, ασπορογόνο βακτήριο, μήκους 1 – 1.5 έως 3 μm . Είναι περίτριχο, κινούμενο, αλλά υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Τόσο τα κινούμενα όσο και τα ακίνητα στελέχη παράγουν προσκολλητικά ινίδια. Επιπλέον πολλά στελέχη παράγουν συζευκτικά ινίδια. Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο, που στα μη κινούμενα στελέχη είναι παχύτερο σαν μια πραγματική κάψα.

Αναπτύσσεται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη σαν μοναδικό οργανικό συστατικό. Ο άγριος τύπος της *E. coli* δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις ανάπτυξης και μπορεί μεταβολικά να μετατρέψει τη γλυκόζη σε όλα τα μακρομοριακά συστατικά που συνθέτουν το κύτταρο. Το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες αναπτύσσεται δια μέσου ζύμωσης, παράγοντας χαρακτηριστικά οξέα και αέριο σαν τελικά προϊόντα. Εντούτοις, μπορεί επίσης να αναπτυχθεί και δια μέσου αναερόβιας αναπνοής, καθώς είναι βακτήριο ικανό να χρησιμοποιήσει νιτρικά, νιτρώδη ή φουμαρικά σαν τελικούς δέκτες ηλεκτρονίων για τις οδούς μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνοής. Αυτή η διπλή της ικανότητα προσαρμόζει την *E. coli* στην ανάπτυξή της τόσο εντερικά (αναερόβια) όσο και εξωεντερικά (αερόβια ή αναερόβια) (Parveen et al., 2001).



Εικόνα 3.2. Βακτήριο *E. coli*.

Η *E. coli* μπορεί να ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικά σήματα όπως χημικά, pH, θερμοκρασία, οσμωμοριακότητα κ.τ.λ. μέσω μεγάλης ποικιλίας οδών. Διαθέτει σύνθετους μηχανισμούς ρύθμισης του μεταβολισμού, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιεί τα χημικά συστατικά που κάθε φορά υπάρχουν στο περιβάλλον του

συνθέτοντας τα απαραίτητα ένζυμα κάθε φορά. Δεν παράγει ένζυμα για τη διάσπαση των πηγών άνθρακα παρά μόνο εάν αυτά είναι απαραίτητα και δεν παράγει ένζυμα για τη σύνθεση μεταβολιτών αν αυτοί είναι διαθέσιμοι σαν θρεπτικά συστατικά στο περιβάλλον.

Αποτελεί τον επικρατέστερο δυνητικά παθογόνο μικροοργανισμό στο ανθρώπινο έντερο. Εντούτοις αποτελεί πολύ μικρή αναλογία στο συνολικό περιεχόμενο βακτηρίων. Η αναλογία των αναερόβιων ειδών *Bacteroides* και της *E. coli* είναι στον εντερικό σωλήνα είναι 20:1. Παρόλα αυτά, η κανονική παρουσία της *E. coli* στο ανθρώπινο έντερο και στα κόπρανα έχει οδηγήσει στο να θεωρείται σαν ένας δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης και ρύπανσης του νερού ([http 4](#)).

Υπάρχουν περισσότεροι από 700 αντιγονικοί τύποι (ορότυποι) της *E. coli* που αναγνωρίζονται με βάση τα αντιγόνα O, H και K. Η εύρεση του ορότυπου είναι σημαντική για τον καθορισμό των παθογόνων στελεχών.

Η *E. coli* μέσω των περιττωμάτων ανθρώπων και ζώων μπορεί να βρεθεί στο θαλασσινό νερό, από όπου συσσωρεύεται στα δίθυρα μαλάκια με τη διαδικασία του φιλτραρίσματος. Κατά συνέπεια, το βακτήριο ανιχνεύεται σε δίθυρα μαλάκια που αναπτύσσονται σε περιβάλλον με κοπρανώδη μόλυνση.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (Ε.Ε. 492/1991), οι περιοχές καλλιέργειας δίθυρων μαλακίων κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα στα οποία ανιχνεύεται η *E. coli* με τη μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων :

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Ταξινόμηση των περιοχών καλλιέργειας δίθυρων μαλακίων (Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Ε.Ε 492/1991)).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΟΣΤΡΑΚΟΕΙΔΩΝ		
<i>Κατηγορία</i>	<i>Most Probable Number (MPN/100g σάρκας οστρακοειδών)</i>	<i>Χαρακτηρισμός της περιοχής</i>
Κατηγορία Α	20 - 220	Χαμηλή μόλυνση – Τα οστρακοειδή μπορούν απευθείας να καταναλωθούν από τον άνθρωπο
Κατηγορία Β	230 - 4600	Μεσαία μόλυνση – Τα οστρακοειδή πρέπει να υποστούν εξυγίανση προτού καταναλωθούν από τον άνθρωπο
Κατηγορία C	4600 - >18000	Υψηλή μόλυνση – Τα οστρακοειδή πρέπει να υποστούν εξυγίανση για τουλάχιστον 2 μήνες προτού καταναλωθούν από τον άνθρωπο

Αναλυτικότερη ταξινόμηση των δίθυρων μαλακίων:

Κατηγορία Α : Τα δίθυρα μαλάκια αυτής της κατηγορίας πρέπει να έχουν <230 *E. coli* ανά 100g σάρκας και περιεχόμενου υγρού σύμφωνα με τη μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων. Επίσης θα πρέπει να απουσιάζει η Σαλμονέλα σε 25g σάρκας. Επιπλέον, θα πρέπει να μην ανιχνεύονται διαρροϊκές τοξίνες δίθυρων μαλακίων, ενώ οι παραλυτικές τοξίνες δίθυρων μαλακίων δεν θα πρέπει να ξεπερνούν το 80μg ανά 100g σάρκας. Τα δίθυρα μαλάκια αυτής της κατηγορίας μπορούν να διοχετευτούν απευθείας στην αγορά, χωρίς να απαιτείται διαδικασία εξυγίανσης.

Κατηγορία Β : Η *E. coli* δεν πρέπει να ξεπερνά στο 90% των δειγμάτων τα 4600 ανά 100g σάρκας και περιεχόμενου υγρού σύμφωνα με τη μέθοδο των πολλαπλών

σωλήνων. Τα δίθυρα μαλάκια αυτής της κατηγορίας πρέπει να εξυγιανθούν προτού τη διοχέτευσή τους στην αγορά, είτε με καθαρισμό είτε με μετεγκατάσταση.

Κατηγορία C : Η *E. coli* φτάνει μέχρι τα 46.000 ανά 100g σάρκας και περιεχόμενου υγρού σύμφωνα με τη μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων. Τα δίθυρα μαλάκια αυτής της κατηγορίας, πριν από τη διοχέτευσή τους στην αγορά πρέπει να εξυγιανθούν είτε με μετεγκατάσταση τουλάχιστον 2 μηνών συνδυασμένη ή όχι με καθαρισμό, είτε με εντατικό καθαρισμό (Jackson and Ogburn, 1996).

3.3. Vibrios

Τα *vibrios* είναι Gram - αρνητικά με σχήμα ράβδου κατά κύριο λόγο, υπάρχουν φυσικά στο θαλάσσιο νερό (εκβολές ποταμών , οι παράκτιες περιοχές), κυρίως σε υφάλμυρο ή αλμυρό νερό. Οι ασθένειες που προκαλούνται από τα *vibrios* είναι κυρίως εντερικής φύσης, που κυμαίνονται από επιδημία χολέρας έως σποραδικές περιπτώσεις διάρροιας.

3.3.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Τα *V. parahaemolyticus* προκαλούν γαστρεντερίτιδα που διαρκεί 24 με 48 ώρες με κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία, πονοκέφαλο και πυρετό. Είναι ένα κοινό θαλάσσιο βακτήριο, διαδεδομένο σε μολυσμένα και μη ύδατα. Το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης συμβαίνει τους πιο ζεστούς μήνες. Σποραδικές περιπτώσεις είναι συχνές κατά μήκος της ακτής των Ηνωμένων Πολιτειών, και πολύ κοινές στην Ιαπωνία, όπου τα κρούσματα συμβαίνουν τακτικά. Αυτό το βακτήριο είναι παρών σε όλα τα κύρια στάδια επεξεργασίας των δίθυρων μαλακίων, από τη συγκομιδή έως το τελικό προϊόν (δηλ shellstock και συσκευασία δίθυρων μαλακίων σε βάζα) (Kaysner et al., 1992). Το *V. parahaemolyticus* πολλαπλασιάζεται γρήγορα σε θερμοκρασίες

άνω των 20 °C. Το βακτήριο αυτό θα πρέπει να βρίσκεται σε μεγάλο αριθμό για να φτάσει δυνητικά σε μολυσματικά επίπεδα > 10⁵ αποικιών και σχηματίσουν μονάδες ανά g (Kaysner et al., 1992). Ωστόσο, υπάρχει μια πρόσφατη έκθεση η οποία παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα του βακτηρίου να προκαλούν πιθανόν ασθένειες. Μεταξύ του Μαΐου και του Σεπτεμβρίου του 1997, υπήρχαν πάνω από 250 περιπτώσεις ασθενειών στη δυτική ακτή της Βόρειας Αμερικής που εκτείνεται από την Καλιφόρνια για να Καναδά. Η πλειονότητα των ασθενειών που σχετίζονταν με την κατανάλωση ωμών ή μερικώς μαγειρεμένων στρειδιών και μυδιών. Σε μία από τις 250 περιπτώσεις που αναφέρθηκαν εμπλέκονται προϊόντα χωρίς κέλυφος με χαμηλά επίπεδα, περίπου 23 cfu/g, του *V. parahaemolyticus*. Τα προϊόντα που συμμετείχαν ήταν από τον ίδιο επεξεργαστή, πολλά και λιανικής πώλησης. Οι ασθένειες που προκαλούνται συνήθως από το συγκεκριμένο βακτήριο είναι αποτέλεσμα κατανάλωσης ωμών ή μερικώς μαγειρεμένων δίθυρων μαλακίων (Rippey, 1994). Η ικανότητα του βακτηρίου να προκαλεί γαστρεντερίτιδα είναι υψηλώς συσχετισμένη με την παραγωγή θερμο-σταθερής αιμολυσίνης, αν και έχουν συσχετιστεί επίσης μη-αιμολυτικά στελέχη με την ασθένεια (Hlady, 1997). Ευτυχώς, μόνο ένα μικρό ποσοστό των στελεχών στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι δυνητικά παθογόνοι. Η συχνότητα εμφάνισης του *V. parahaemolyticus* από δίθυρα μαλάκια είναι χαμηλή, και οι εκτιμήσεις βασίζονται από μια μελέτη που δείχνουν λιγότερο από 0,5 περιπτώσεις/100.000 πληθυσμού/έτος (Hoge et al., 1989). Ο έλεγχος ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* στα δίθυρα μαλάκια εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η ανεπαρκής ψύξη θα επιταχύνει την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus*, και επομένως θα αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης κρουσμάτων από ασθένειες που σχετίζονται με το συγκεκριμένο βακτήριο (Kaysner et al., 1992). Είναι ευαίσθητα στο κρύο, και μπορούν να καταστούν ταχέως ανενεργά σε χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης.

3.3.2. *Vibrio vulnificus*

Τα συμπτώματα του *V. vulnificus* είναι πυρετός, ρίγη, ναυτία εντός 24 - 48 ωρών από την έναρξη. Έχει αναφερθεί να προκαλεί θάνατο μέσα σε 36 ώρες από την έναρξη. Είναι μία από τις πιο σοβαρές τροφιμογενείς μολυσματικές ασθένειες, με ένα ποσοστό θνησιμότητας από 50% για τα άτομα με σηψαιμία. Υγιή άτομα είναι ευαίσθητα σε γαστρεντερίτιδα. Άτομα υψηλού κινδύνου, είναι όσοι πάσχουν από ηπατική νόσο, διαβήτη, κίρρωση, λευχαιμία, ή βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στην πρωτοβάθμια σηψαιμία. Τα άτομα αυτά συνιστάται να μην τρώνε ωμά δίθυρα μαλάκια. Τα στρείδια είναι τα πιο επικίνδυνα τρόφιμα που σχετίζονται με *V. vulnificus*. Το βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο στα ύδατα των εκβολών ποταμών ιδιαίτερα στα ζεστά νερά >20 °C. Κατά κύριο λόγο, ο οργανισμός έχει βρεθεί στον Κόλπο του Μεξικού. Ωστόσο, ο οργανισμός έχει βρεθεί επίσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από τις εκβολές της Ουάσιγκτον και του Όρεγκον (Kaysner et al., 1992). Το βακτήριο είναι ένα είδος των εκβολών ποταμών που προκαλεί λοιμώξεις τραυμάτων, γαστρεντερίτιδα, ή πρωτογενή σηψαιμία. Όλες οι απομονώσεις θεωρούνται παθογόνες. Η εμφάνιση του *V. vulnificus* που προκαλεί σηψαιμία και θάνατο έχει συσχετισθεί με την κατανάλωση στρειδιών (Hoge et al., 1989). Και πάλι, όπως και με το *V. parahaemolyticus* το εκτιμώμενο ετήσιο ποσοστό επίπτωσης είναι πολύ χαμηλό, της τάξης των 0,4 έως 0,8 υπόθεση/100.000 πληθυσμού/έτος (Hug et al., 1979). Ο έλεγχος του *V. vulnificus* γίνεται με ταχεία ψύξη κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών του έτους. Οι κίνδυνοι από αυτό το βακτήριο μπορούν να ελεγχθούν από ενδεδειγμένη μαγείρεμα των δίθυρων μαλακίων, και την πρόληψη διασταυρούμενης μόλυνσης όταν το προϊόν έχει ψηθεί.

3.3.3. *V. Cholerae non-01*

Η ασθένεια που προκαλείται από *V. Cholerae non-01* είναι γενικά μια ήπια μορφής γαστρεντερίτιδας χαμηλότερης επικινδυνότητας από αυτή που προκαλείται από *V. cholerae*. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι διάρροια, κοιλιακοί πόνοι, πυρετός, ναυτία, και έμετος. Μέτα από 48 ώρες αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα τα οποία μπορεί να διαρκέσουν 6-7 ημέρες. Ο οργανισμός προσκολλάται στο έντερο και απελευθερώνει μια τοξίνη η οποία είναι υπεύθυνη για τα δυσανεξία που προκαλείται. Το *V. Cholerae non-01* προκαλεί σηψαιμία κυρίως σε άτομα τα οποία το ανοσοποιητικό τους σύστημα βρίσκεται σε καταστολή. Το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτά τα άτομα να υπερβαίνει το 50% (Hug et al., 1979). *V. Cholerae non-01* απαντάται πολύ συχνά στο περιβάλλον εκβολών ποταμών. Στις 23 από τις 24 μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εκβολές ποταμών βρέθηκαν άτομα του είδους . Πρόληψη για το συγκεκριμένο βακτήριο είναι το καλό μαγείρεμα πριν την κατανάλωση και η συγκομιδή των στρειδιών να πραγματοποιείται τους κρύους μήνες όπου ο πληθυσμός των *Vibrio* είναι σε μικρότερος από ότι τους θερμούς μήνες (Kaysner et al., 1992).

3.3.4. *Vibrio cholerae 01 and 0139*

Τα συμπτώματα της επιδημίας χολέρας κυμαίνονται από ήπια διάρροια έως οξεία διάρροια. Η ασθένεια μπορεί να περιλαμβάνει κοιλιακές κράμπες, ναυτία, έμετο, αφυδάτωση και σοκ. Ο θάνατος μπορεί να συμβεί μετά από σοβαρή απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών. Η έναρξη της νόσου είναι 6 ώρες έως 5 ημέρες. Το ορότυπο Ogawa βιότυπο El Tor και 0139 είναι υπεύθυνοι για επιδημίες στη Νότια Αμερική, και τη νότια Ασία, συμπεριλαμβανομένης της Ινδίας και του Μπαγκλαντές,

αντίστοιχα. Η κακή υγιεινή και οι μολυσμένες παροχές νερού ενισχύουν την εξάπλωση της νόσου, ενώ οι εξαιρετικές εγκαταστάσεις υγιεινής στις ανεπτυγμένες χώρες είναι υπεύθυνες για την εγγύς εξάλειψη της επιδημίας της χολέρας. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, το *V. cholerae* 01 μεταδίδεται από κοπρανώδους μόλυνσης τρόφιμα ή νερό. Υπάρχουν στοιχεία εδραίωσης των στελεχών του *V. cholerae* 01 στην ακτή του Κόλπου των ΗΠΑ, και η μετάδοση της ασθένειας προκαλείται από την κατανάλωση ωμών, ημιμαγειρεμένων δίθυρων μαλακίων, ή από διασταυρούμενη μόλυνση (Morris et al., 1985). Η παρουσία αυτών των στελεχών φαίνεται να είναι σε χαμηλούς αριθμούς και μη-μολυσματική. Ο έλεγχος του *V. cholerae* 01 στα δίθυρα μαλάκια, ιδίως στα στρείδια, είναι η ίδια όπως συζητήθηκε προηγουμένως για τα στελέχη non-01. Επιπλέον, οι μεταποιητές πρέπει να γνωρίζουν την προέλευση των προϊόντων, π.χ. αν ένα εισαγόμενο προϊόν από μια χώρα βιώνει μια επιδημία (Hoge et al., 1989).

3.3.5. Other Vibrios spp.

Υπάρχουν πολλά άλλα *Vibrio spp.* που συνδέονται με δίθυρα μαλάκια και ευθύνονται για κρούσματα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των *V. fluvialis*, *V. mimicus*, και *V. hollisae* (Rippey, 1994). Η συχνότητα των λοιμώξεων αυτών των οργανισμών δεν είναι διαφορετική από τα άλλα *Vibrios*. Ωστόσο, η σοβαρότητα αυτών των παθογόνων είναι χαμηλότερη από αυτή των *V. cholerae* 01, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*. Σε γενικές γραμμές, αυτοί οι οργανισμοί προκαλούν γαστρεντερίτιδα που διαρκεί 24 - 48 ώρες με κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία, πονοκέφαλο και πυρετό. Είναι κοινά θαλάσσια βακτήρια, διαδεδομένα σε μολυσμένα και μη ύδατα. Οι ασθένειες που προκαλούνται από αυτούς τους παθογόνους έχουν μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης κατά τους ζεστούς μήνες του

έτους. Ο έλεγχος της μόλυνσης από τους συγκεκριμένους οργανισμούς δεν διαφέρει από τις άλλες περιπτώσεις των *Vibrios*.

3.4. *Campylobacter jejuni*

Το *C. jejuni* απαιτεί μειωμένα επίπεδα οξυγόνου (3 - το 5%) και 2-10% διοξείδιο του άνθρακα για βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Θεωρείται ένας εύθραυστος και ευαίσθητος οργανισμός σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως οξυγόνο, ξήρανση, χαμηλό pH, αλατότητα, οξύτητα και τη θερμότητα. Προκαλεί διάρροια, κοιλιακό πόνο, πυρετό, και ναυτία. Η έναρξη της ασθένειας είναι από 3 έως 5 ημέρες μετά από την κατάποση μολυσμένων τροφίμων, και η ασθένεια διαρκεί 7-10 εργάσιμες μέρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Κρούσματα ασθενειών από δίθυρα μαλάκια που σχετίζονται με βακτήρια του γένους *Vibrio spp.* (Abyeta et al., 1992).

Species	No. of Incidents	No. of Cases
Hard clams	4	4
Oysters	279	362
Soft Clams	0	0
Mussels	1	1
Scallops	0	0

Περιλαμβάνει *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* 01 και μη 01, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, και *V. Hollisae*.

Η μολυσματική δόση ποικίλλει ανάλογα με την ευαισθησία του ξενιστή και τη μολυσματικότητα του στελέχους. Μελέτες που αφορούν την διατροφή του ανθρώπου δείχνουν ότι περίπου 400 έως 500 κύτταρα/γραμμάριο του *Campylobacter* μπορεί να

προκαλέσει ασθένειες (Black et al., 1988). Τα βακτήρια του γένους *Campylobacter spp.* έχουν απομονωθεί από κογχυλοαποθεμάτα σε όλο τον κόσμο και έχουν ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικός παράγοντας σε ασθένειες από την κατανάλωση ωμών στρείδια και μυδιών (Griffin et al., 1980). Σε μία περίπτωση, η μόλυνση συνέβη μεταξύ πυροσβεστών που βρίσκονταν σε συμπόσιο. Δεκαέξι από τους είκοσι οχτώ συμμετέχοντες αρρώστησαν με καμπυλοβακτηρίωση μετά τη λήψη των φρέσκων μυδιών. Παρά το γεγονός ότι, η συχνότητα εμφάνισης της λοίμωξης εξαιτίας του *Campylobacter* είναι χαμηλή από την κατανάλωση των μαλακίων, το *Campylobacter* φαίνεται να επιβιώνει και στα στρείδια κατά την αποθήκευση. Σε μία έρευνα που υλοποιήθηκε το *C. jejuni* εμφανίστηκε να επιζεί για πάνω από 20 ημέρες σε στρείδια χωρίς κέλυφος αγοράς που αποθηκεύθηκαν στους 4 °C, ενώ στους 10 °C το *Campylobacter* επιβίωσε μόνο για 5 ημέρες (Abeyta et al., 1992). Αυτό το εύρημα είναι σημαντικό διότι δείχνει πως το *C. jejuni* δεν πολλαπλασιάζεται σε shellstock σε θερμοκρασίες ψυγείου. Ωστόσο, επιβιώνει καλά εις ψύξην θερμοκρασίες. Πρόσφατα, τα βακτήρια *C. jejuni* ανακτήθηκαν, από στρείδια shellstock του Ειρηνικού σε ποσοστά κυττάρων που κυμαίνονταν από 0.4 ως 114 αγορασμένα από ένα κατάστημα λιανικής πώλησης τροφίμων (Griffin et al., 1980). Τα καμπυλοβακτηρίδια δεν επιβιώνουν καλά στο περιβάλλον λόγω της έλλειψης αντοχής του οργανισμού σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, ο οργανισμός εμβολιάζεται συνεχώς στο περιβάλλον από τα υδρόβια πτηνά και τις αγροτικές απορροές και έτσι τελικά μολύνουν τα δίθυρα μαλάκια που αναπτύσσονται στα συγκεκριμένα νερά. Για να μειωθεί ο κίνδυνος των δίθυρων μαλακίων που μεταδίδουν καμπυλοβακτηρίωση, χρειάζεται έλεγχος του *C. jejuni* που αρχίζει από την συγκομιδή των shellstock από εγκεκριμένα νερά, και την άμεση σωστή ψύξη

τους. Θα πρέπει επίσης, να λαμβάνεται σωστή φροντίδα αν το τελικό προϊόν πρόκειται να συσκευαστεί υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP).

3.5. Άλλοι οργανισμοί που προκαλούν ανησυχία

Ομάδα *Aeromonas hydrophila* και *Plesiomonas shigelloides*

Η ομάδα των *A. hydrophila* και τα *P shigelloides* είναι πανταχού παρόντα στο θαλάσσιο περιβάλλον. Έχουν εμπλακεί σε περιορισμένες περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας που οφείλεται σε δίθυρα μαλάκια, αν και ο ρόλος τους ως παθογόνοι είναι εξαιρετικά αμφιλεγόμενος και περιστασιακός. Η εποχικότητα των *Aeromonas* και *Plesiomonas* είναι παρόμοια με τα *Vibrios*, όμως απομονώνεται πιο συχνά κατά τη διάρκεια των θερμότερων μηνών του έτους. Επιβιώνουν καλά σε shellstock ή χωρίς κέλυφος στρείδια που αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες ψύξης (Kaper et al., 1981). Σε μια μελέτη, μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης χωρίς κέλυφος στρειδιών σε ένα μεταποιητή ψύξης δίθυρων μαλακίων διατηρημένους στους 5 °C τα *Aeromonas* κυμαίνονταν σε πληθυσμούς από 500.000 έως 3.600.000/ γραμμάριο (Kaysner et al., 1992). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από άλλους ερευνητές της απόφυση της ομάδας *A. hydrophila* που αποθηκεύονταν σε θερμοκρασίες ψύξης. Ο έλεγχος αυτών των οργανισμών σε προϊόντα δίθυρων μαλακίων είναι περιορισμένος. Καταστρέφεται εύκολα με ήπιες θερμοκρασίες μαγειρέματος. Προσοχή θα πρέπει να ασκείται από πρόσωπα με αιματολογικές κακοήθειες (Hood et al., 1984), διότι αυτά τα άτομα διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο όταν καταναλώνουν ωμά ή μερικώς μαγειρεμένα δίθυρα μαλάκια που περιέχουν αυτά τα βακτηρίδια.

3.6. Δημοσιευμένα Μικροβιολογικά Κριτήρια

Τα δημοσιευμένα μικροβιολογικά κριτήρια παρακάτω περιλαμβάνονται ως οδηγός, και όπου υποδεικνύεται προορίζονται να χρησιμοποιηθούν για επίσημους σκοπούς ελέγχου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Μικροβιολογικά κριτήρια σε οστρακώδη για επίσημους ελεγκτικούς σκοπούς (Abeyta 2009).

Διάγνωση	Αποδεκτά όρια σε οστρακώδη
Συνολική περιεκτικότητα μικροοργανισμών	<500.000 cfu /g
<i>Escherichia coli</i>	<230/ 100 g ²
Εντεροτοξigenής <i>Escherichia coli</i>	<1000 ανά γραμμάριο, αρνητικό για θερμο- ασταθή τοξίνη (labile toxin- LT) ή θερμο-σταθερή εντεροτοξίνη (stable toxin -ST)
<i>Salmonella</i>	Αρνητική παρουσία
<i>Vibrio cholera</i>	Αρνητική παρουσία τοξίνης παράγοντας 01 ή μη 01 οργανισμούς
<i>Parahaemolyticus</i>	<10000 Πιθανότερος Αριθμός (Most Probable Number- MPN) ανά γραμμάριο
<i>Staphylococcus aureus</i>	Αρνητικό για σταφυλοκοκκική εντεροξίνη ή όταν η βιώσιμη MPN μέτρηση είναι <10000
<i>Campylobacter jejuni</i>	Αρνητική παρουσία
<i>Vibrio vulnificus</i>	Υπό αναφορά

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε μία ανασκόπηση τόσο των αλλοιογόνων όσο και των παθογόνων μικροοργανισμών στα δίθυρα μαλάκια.

Όσο αναφορά τους μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη των οποίων οδηγεί στην αλλοίωση των δίθυρων μαλακίων, οι επικρατέστεροι είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* και τα υδροθειούχο – παραγωγά (H_2S) βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου και του *Shewanella putrefaciens*), με τα οξυγαλακτικά και τα Enterobacteriaceae να βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης, ενώ τα *Brochothrix* κυμαίνονται σε χαμηλά ποσοστά. Έχει αναφερθεί ότι ακόμα και σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες, EAM είναι τα *Pseudomonas spp.*, κάτι το οποίο σύμφωνα με την πληθώρα των βιβλιογραφικών αναφορών δεν μπορεί να υφίσταται, λόγω της ανάγκης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών για κατανάλωση οξυγόνου. Βέβαια, η περίπτωση των δίθυρων μαλακίων χρήζει περαιτέρω έρευνας για την διερεύνηση του μικροβιακού τους πληθυσμού, καθώς οι περισσότερες εργασίες αναφέρουν προσδιορισμό μικροβιακής οικολογίας με την χρήση συμβατικών μέσων. Όπως έχει αποδειχθεί, η OMX που εμφανίζεται σ ένα τρυβλίο, αντιπροσωπεύει μόλις το 1% του ολικού πληθυσμού. Για τον λόγο αυτό, η επιστήμη έχει στραφεί σε πιο σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης όπως είναι οι μοριακές και οι NGS (Next Generation Sequencing). Το σίγουρο είναι πως με την αξιοποίηση των εργαλείων αυτών θα υπάρχει μία πιο ξεκάθαρη εικόνα για το μικροβιακό φορτίο των δίθυρων μαλακίων, όπως συμβαίνει με τους ιχθύες και άλλα αλιεύματα.

Όσο αναφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθυρα μαλάκια, το ποσοστό των κρουσμάτων διαφέρει σημαντικά σε όλο τον κόσμο, από περίπου 10% έως 30% του συνόλου των τροφιμογενών επιδημικών εκρήξεων, και φαίνεται να είναι

υψηλότερο στην νοτιο-ανατολική Ασία, αν και λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την Αφρική. Οι διαφορές αναμφίβολα σχετίζονται με παραλλαγές στην αναλογία της διατροφής, τον τρόπο με τον οποίο μαγειρεύτηκαν, την θερμοκρασία του φυσικού τους περιβάλλοντος και το τοπικό επίπεδο της δημόσιας υγείας. Το διεθνές εμπόριο είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας καθώς, ένα σημαντικό ποσοστό των μολύνσεων *Vibrio* στην Ευρώπη οφείλονται σε άτομα που έχουν μολυνθεί στο εξωτερικό. Η παγκόσμια κλιματική αλλαγή μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση σε ορισμένους τύπους παθογόνων των δίθυρων μαλακίων. Ωστόσο, για ορισμένα είδη οι νέες τεχνολογίες επεξεργασίας σε συμφωνία με την ορθή υγιεινή πρακτική, προσφέρουν τη δυνατότητα για την παροχή ασφαλέστερων προϊόντων, εφ' όσον το αποτέλεσμα είναι αποδεκτό από τους καταναλωτές.

Οι συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης, ταυτοποίησης και απαρίθμησης, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για ορισμένα παθογόνα βακτήρια σε δίθυρα μαλάκια αλλά λιγότερο επιτυχώς για άλλα, όπως τα *vibriosis*, όπου δεν επιτευχθεί επαρκώς η διάκριση των παθογόνων από τα μη παθογόνα. Νεότερες μοριακές μέθοδοι έχουν τη δυνατότητα να ξεπερασουν ορισμένα από τα μειονεκτήματα και να συμβάλουν έτσι στην ασφάλεστη κατάσταση των προϊόντων. Από αυτή την άποψη, οι μοριακές μέθοδοι που έχουν ερευνηθεί στο πλαίσιο του έργου SEAFOOD plus συμβάλλουν στη δημιουργία καλύτερων πρότυπων μεθόδων υπό την αιγίδα του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Έντυπη

- Abeyta, C.Jr., Kaysner, C.A. (1991). Incidence and survival of thermophilic campylobacters from shellfish growing water: media evaluation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 4, S41.
- Ahmed, F.E. (1991). *Seafood Safety*. National Academy Press, Washington, D.C. 432p.
- Anagnostopoulos, D. (2015).
- Andrews, L.S., Key, A.M., Martin, R.L., Grodner, R., Park, D.L. (2002). Chlorinedioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. *FoodMicrobiology*, 19, 261–267.
- Ashie, I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. (1996). Spoilage and self-life extension of fresh fish and shelfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1–2): 87–121.
- Baggi, F., Demarta, A., Peduzzi, P. (2001). Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res. Microbiol.*, 152: 743-751.
- Bailey, C., Jentoft, S., Sinclair, P., (1996). In *Aquacultural development: social dimensions of an emerging industry*, Westview Press, Boulder, Colorado.
- Black R.E., Levine M.D., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Disease*, 157, 472-9.

- Blackstone, G.M., Nordstrom, J.N., Vickery, M.C.L., Bowen, M.D., Meyer, R.F., De Paola, A., (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 53: 149–155.
- Byrd-Bredbenner, C., Wardlaw, G. M. (2009). *Wardlaw's perspectives in nutrition*. McGraw-Hill.
- Cann, D.C. (1976). Bacteriology of shellfish with reference to international trade, in *Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*. [ed.] Ministry of Overseas Development. Tropical Products Institute, 377-94.
- Cao, R., Xue, Ch.-H., Liu, Q., Xue, Y. (2009). Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech J. Food Sci.*, 27: 102–108.
- Castro, P., Padron, J.C.P., Cansino, M.J.C., Velazquez, E.S. & De Larriva, R.M. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17, 245–248.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiol.* 21, 157–165.
- Colwell, R.R., Liston, J. (1962). Bacterial flora on seven species of fish collected at Rongelap and Eninetok Atols. *Pacific Science*, 16: 264-270.
- Dainty, R.H. (1971). The control and evaluation of spoilage. *Journal of Food Technology*, 6: 209.
- Dainty, R.H. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 19-33.

- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 319-333.
- Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 19, 283–294.
- Dalgaard, P., Jørgensen, L.V. (2003). Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 105-115.
- Davies, A.R. (1995). Fate of food-borne pathogens on MAP meat and fish. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36: 407-410.
- Davies, A.R. (1997). Modified-atmosphere packaging of fish and fish products. In *Fish Processing Technology* (2nd edn) ed. Hall, G.M. pp. 200–223. London, UK: Blackie Academic and Professional.
- De Mesquita, M.M.F., Evison, L.M., West, P.A. (1991). Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 70:495-501.
- Debevere, J., Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology* 31, 221–229.
- Desenclos, J.-C.A., Klontz, K.C., Wilder, M.H., Nainan, O.V., Margolis, H.S, Gunn, R.A. (1991). A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *Am. J. Public Health*, 81:1268-1272.

- Disney, J.G., Cameron, J.D., Hoffmann, A., Jones, N.R. (1969). Quality assessment in Tilapia species. In: Fish Inspection and Quality Control, 71-72. Fishing News (ed.) Kreuzer, RBooks, Ltd. London, England.
- Dong, F. M. (2001). The nutritional value of shellfish.
- Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E. (1996). Brochothrix thermosphacta, a dominant microorganism in mediterranean fresh fish (Sparus aurata) stored under modified atmosphere. Italian Journal of Food Science, 4, 323–329.
- Ellender, R.D., J.B. Mapp, B.L. Middlebrooks, Cook, D.W, Cake, E.W., (1980). Natural enterovirus and fecal coliform contamination of Gulf-Cost oysters. *J. Food Prot.*, 43:105-110.
- Farber, J.M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-A review. Journal of Food protection 54, 58–70.
- Felhusen, F. (2000). Review: The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes and Infection, 2, 1651–1660.
- Fernandes, R. (Ed.) Microbiology handbook: Fish and seafood. Abeyta, C., Jr. (2009). Molluscan Shellfish. Royal Society of Chemistry.
- Gennari, M., Dragotto, F. (1992). A study of the incidence of different fluorescent Pseudomonas species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. J. Appl. Bacteriol. 72:281–288.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M. (1978). Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. J. Food Prot., 41:743-754.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M., Labelle, R.L., Cech, I., Bodgan, G.F. (1979). Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. Am. J. Public Health, 69(11):1116-1119.

- Gibson, G.R. (2009). Food Science and Technology, Functional Foods Volume 5 pp. 51-61.
- Gill, C.D., Molin, G. (1991). Modified atmospheres and vacuum packaging. In: Russell N.S., Gould G.W. (eds.) Food preservatives. Blackie and Son Limited, Glasgow, London, pp. 172-199.
- Gillespie, N.C., Macrae, C. (1975). The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. Journal of Applied Bacteriology, 39: 91-100.
- Goulas, A.E., Kontominas, M.G. (2004) Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry (in press).
- Gram, L., Melchiorson, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* spp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. Journal of Applied Bacteriology, **80**: 589–595.
- Gram, L., Oundo, J.O., Bon J. (1989). Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) in relation to temperature and initial bacterial load. Tropical Science, 29: 221-236.
- Gram, L., Trolle, G., Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. International Journal of Food Microbiology, 4: 65-72.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). International Journal of Food Microbiology, 10: 303-316.
- Gram, L., Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology 13, 262–266.
- Gram, L., Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 33, 121–137.

- Griffin, M.R., Dalley, E., Fitzpatrick, M., Austin, S.H. (1980). *Campylobacter gastroenteritis associated with raw clams*. *Journal of the Medical Society of New Jersey*, 80, 607-9.
- Gross, C.A. (1999). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington. 1382-1399.
- Halliday, M.L., Kang, L.Y., Zhou, T.K., Hu, M.D., Pan, Q.C., Fu, T.Y., Huang, Y.S., Hu, S.L. (1991). *An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China*. *J. Infect. Dis.*, 164:852-859.
- Hastings, R.W., Heinle, D.R. (1995). *The effects of aquaculture in estuarine environments*. *Estuaries*, 18/1A:197p.
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.H. (1984). *A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage*. *J. Appl. Bacteriol.*, 56:439-447.
- Havelaar, A.H., Furuse, K., Hogeboom, W.M. (1986). *Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces*. *J. Appl. Bacteriol.*, 60:255-262.
- Hedeem, R.A. (1986). *The Oyster*. Tidewater Publishers, Centreville, MD.
- Hlady, W.G. (1997). *Vibrio infections associated with raw oyster consumption in Florida*. *Journal of Food Protection*, 60, 353-7.
- Hood, M.A., Baker, R.M., Singelton, F.L. (1984). *Effects of processing and storing oyster meats on concentrations of indicator bacteria, vibrios and Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 47, 598-601.
- Huis in't Veld, J.H.J. (1996). *Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview*. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1-18.
- Huss, H.H. (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO, Rome, 195.
- IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology. (1991). *Bacteriophages as model viruses in water quality control*. *Water Res.*, 25:529-545.

- Jackson, K., Ogburn, D. (1996). Review of Depuration. FRDC Project No. 96/355.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005). Modern Food Microbiology (seventh edition) pp. 39-54.
- Jofre, J. (1992). Bivalve molluscs as vectors of human enteric viruses. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10:223-228.
- Jofre, J., Bosch, A., Lucena, P., Girones, R., Tartera, C. (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Water Sci. Technol.*, 18:167-173.
- Jorgensen, B.R., Huss, H.H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 51–62.
- Jorgensen, L.V, Huss, H.H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42:127-31.
- Kaper, J., Seidler, R.J., Lockman, H., Colwell, R.R. (1981). *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *Journal of Applied Bacteriology*, 50, 359-77.
- Kaysner, C.A., Stott, R.F., Abeyta, C.Jr., Trost, P.A., Colburn, K.G., Wekell, M.M. (1992). Establishment of critical control points in west coast oyster processing plants. *American Society for Microbiology*, P-1, 324.
- King, I., Childs, M.T., Dorsett, C., Ostrander, J.G., & Monsen, E.R. (1990). Shellfish: proximate composition, minerals, fatty acids, and sterols. *Journal of the American Dietetic Association*, 90(5), 677-685.
- Koromilas, S., (2015).

- Koutsoubas, D., Galinou-Mitsoudi, S., Katsanevakis, S., Leontarakis, P., Metaxatos, A., & Zenetos, A. (2007). Bivalve and gastropod molluscs of commercial interest for human consumption in the Hellenic Seas. State of the Hellenic Fisheries. Athens: HCMR Publications. p, 7084.
- Koutsoumanis, K., Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S., Nychas, G.J.E. (2002). Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality *International Journal of Food Microbiology*, 73: 375– 382.
- Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., Nychas, G.-J.E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15C. *Journal of Food Protection* 62, 398– 402.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf-life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 171-184.
- Kyrana, V.R., Lougovois, V.P. (2002) Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3): 319– 328.
- Kyrana, V.R. and Lougovois, V.P. (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 319–328.
- Lanelongue, M., Finne, G., Hanna, M.O., Nickelson, R., Vanderzani, C. (1982). Microbiological and Chemical changes during storage of Swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ –Enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*, 45: 1197-1203.

- Lees, D.N. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.*, 59:81-116.
- Lima dos Santos, C.A.M. (1981). The storage of tropical fish in ice - A review. *Tropical Science*, 23 (2) : 97-127.
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In Connell J.J. (ed) *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books, Ltd, Farnham, Surrey, UK 138-157.
- Loosanoff, V.L., Harry, D. (1963). Rearing of bivalve Mollusks, in *Marine Biology*. Vol.1, Academic Press, Inc. Ltd. Pp.1-136, London
- Lopez-Caballero, M.E., Goncalves, A., Nunes, M.L. (2002). Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology* 214, 192–197.
- Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D., Forcadell, M., Jofre, J. (1994). Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2272-2277.
- Manousaridis, G., Nerantzaki, A., Paleologos, E.K., Tsiotsias, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2005). Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food microbiology*, 22(1), 1-9.
- Meddcoff, J.D. (1961). Oyster farming in the maritimes. *Fish. Res. Bd. Of Canada, Biol. Sta., St. Andrews, N.B.*
- Melnick, J.L., Gerba, C.P. (1980). The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit. Rev. Environ. Control.*, 10:65.
- Mol, S., Erkan, N., Ücok, D., Tosun, S.Y. (2007). Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods*, 18: 120–128.

- Morris, J.G.Jr., Black, R.E. (1985). Cholera and other vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine*, 312, 343-50.
- Müller, O., Krawinkel, M. (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal*, 173(3), 279-286.
- Noble, R.T., Fuhrman, J.A. (2001). Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: Low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia*, 460:175–184.
- Nosedá, B., Tariqul Islam Md., Eriksson, M., Heyndrickx, M., De Reu, K., Van Langenhove, H., Devlieghere, F. (2012). Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology*, 30: 408-419.
- Ozogul, F., Polat, A., Ozogul, Y. (2004). The effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 85, 49–57.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20: 411–420.
- Parlapani, F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G-J.E, Boziaris, I.S. (2015b). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 20C. *Food Microbiology* 50, 44-53.
- Parlapani, F.F., Boziaris, I.S. (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea

bream stored at various temperatures. LWT - Food Science and Technology, 66, 553–559.

- Parlapani, F.F., Kormas, K.Ar., Boziaris, I.S. (2015a). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. 'Journal of the Science of Food and Agriculture' DOI 10.1002/jsfa.6957.
- Parlapani, F.F., Malouchos, A., Haroutounian, S.A., Boziaris, I.S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. International Journal of Food Microbiology 189, 153–163.
- Parlapani, F.F., Meziti, A., Kormas, Ar.K., Boziaris, I.S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. Food Microbiology 33, 85-89.
- Parlapani, F.F., Verdos, G.I., Haroutounian, S.A., Boziaris I.S. (2015c). The dynamics of *Pseudomonas* and volatile profile during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C. Food Control 55, 257-265.
- Parveen, S., Hodge N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R., Tamplin, M.L. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*: Water Res., 35, no. 2: 379-386.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J.J., Cabo M.L. (1998). Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). Food Chemistry, 61: 23-28.

- Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J.R., Cabo, M.L. (1996a). Effect of modified atmosphere packaging on shelf- life of iced fresh hake slices. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 71: 541-547.
- Pastoriza, L., Bernardez, M., Sampedro, G., Gabo, M.L., Herrera, J.J.R. (2004). Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated. *European Food Research and Technology* 218, 415–419.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3376-3382.
- Randell, K., Hattula, T., Skytta, E., Siverstvik, M., Bergslien, H., Ahvenainen, R. (1999). Quality of filleted salmon in various retail packages. *Journal of Food Quality* 22, 483–497.
- Reilly, P.J.A. (1992). Salmonella and Vibrio cholerae in brackishwater cultured tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 293-301.
- Richards, G.P. (1988). Microbial Purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J. Food Prot.*, 51:218-251.
- Richards, P.D., Fletcher, G.C., Buisson, D.H., Fredericksen, S. (1983). Virus depuration of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand. *N. Z. J. Sci.*, 26:9-13.
- Rippey, R., Scott, Q. (1994). *Applied and Environmental Microbiology* 68:1165-1172.
- Rodriguez, O., Barros-Velazquez, J., Ojea, A., Pineiro, C., Aubourg, S.P. (2003). Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 68 (5), 2764-2771.

- Savage, R.A. (1995). Hazard analysis critical control point: a review. *Food Rev. Int.*, 11: 575-595.
- Scherer, R., Augusti, P.R., Bochi, V. C., Steffens, C., Martins Fries, L. L., Daniel, A.P., Kubota, E.H., Neto, J.R., Emanuelli, T. (2006). Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry*, 99: 136–142.
- Shewan, J.M. (1977). The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. *Proceedings of the Conference on “Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish”*. pp. 51-66.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 107–127.
- Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 35– 45.
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aqua-cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 1373–1379.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Nychas, G.- J. E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. Associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 65-72.

- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Vancanneyt, M., Hoste, B., Swings, J., Nychas, G.-J.E. (2007). Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 711-721.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.-J.E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 901-909.
- Vaughn, J.M., Metcalf, T.G. (1974). Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. *Water Res.*, 8:613-616.
- Vaughn, J.M., Landry, E.F., Thomas, M.Z., Vicale, T.J., Penello, W.F. (1979). Survey of human enterovirus occurrence in fresh and marine surface waters on Long Island. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:290-296.
- Vaughn, J.M., Landry, E.F., Thomas, M.Z., Vicale, T.J., Penello, W.F. (1980). Isolation of naturally occurring enteroviruses from a variety of shellfish species residing in Long Island and New Jersey marine embayments. *J. Food. Prot.*, 43:95-98.
- Vold, L., Holck, A., Wasteson, Y., Nissen, H. (2000). High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 219-225.
- Wan Norhana M.N., Poole, S.E, Deeth, H.C., Dykes, G.A. (2010). Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review, *Food Control* 21, 343–361
- Wanke, C.A., Guerrant, R.L. (1990). Viral hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 19:435-438.

- Ward, D.R., Bai, N.J. (1988). Factors affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technology*, 42: 85 – 93.
- Ward, D.R., Hackney, C.R. (1991). *Microbiology of Marine Food Products*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Wood, E.J.F. (1953). Heterotrophic bacteria in marine environments in eastern Australia. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, 4: 160-200.
- Yamocki, S., Ariyaman, H., Kusakabe, T., Sano, M., Nabeshima, Y., Mutsunami, K., Karasawa, T. (1994). Effects of Mussels, *Mytilus Galloprovincialis*, to the Eutrophication of the Coastal Environment of Osaka Bay. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, Suppl.* 1:9-11.
- Αρσένη, Α. (1996). Κλινική Μικροβιολογία & Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. ΖΗΤΑ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ. 4η Έκδοση.
- Κοτζεκίδου-Ρουκά, Π. (2000). Μικροβιολογία Τροφίμων. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

5.2 Ηλεκτρονική

- Μεταξάτου, Α. Αλιευτικά θέματα, www.paseges.gr (http 1)
- <http://vm.cfsan.fda.gov/mow/intro.html>. (http 2)
- http://www.vdh.state.va.us/dwse/sh_classification.htm. (http 3)
- <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureecoli>. (http 4)
- <http://www.ocean.udel.edu/mas/masnotes/rawshellfish.html>. (http 5)
- <http://ext.msstate.edu/pubs/pub1814.htm>. (http 6)
- www.shellfishquality.ca/indicators.htm. (http 7)

