

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



**Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Κινητική αύξησης και παραγωγή πτητικών μεταβολιτών  
στελεχών *Pseudomonas* απομονωμένων από τσιπούρα σε  
μοντέλο υπόστρωμα στους 8°C**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΡΗΤΙΚΟΣ(1406)**

Βόλος, Ιούλιος 2016

«Κινητική αύξησης και παραγωγή πτητικών μεταβολιτών  
στελεχών *Pseudomonas* απομονωμένων από τσιπούρα σε  
μοντέλο υπόστρωμα στους 8°C»

«Growth kinetics and volatiles metabolites production of  
*Pseudomonas* strains isolated from gilt-head seabream on model  
substrate stored at 8°C»

Διμελής Εξεταστική επιτροπή:

- 1) Ιωάννης Μποζιάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής (M.Sc., Ph.D.),  
Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας  
και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**
  
- 2) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Επίκουρος Καθηγητής (MSc, PhD),  
Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας  
Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών  
Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

## Αφιέρωση

Η συγκεκριμένη διατριβή είναι αφιερωμένη στους δύο ανθρώπους που με έχουν πιστέψει και έχουν στηρίξει όσο κανείς άλλος, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου, όχι μόνο με λόγια αλλά κυρίως με έργα και πράξεις.

Στους γονείς μου,

Πέτρο Κρητικό & Ευαγγελία Αφθονιάδου-Κρητικού



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις πραγματικές μου και βαθύτατες ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία αυτή η προπτυχιακή διπλωματική εργασία. Αρχικά ευχαριστώ πολύ τον επιβλέπων καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την ανάθεση της εργασίας αλλά και για την πλήρη στήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας αλλά και μετέπειτα. Στη συνέχεια, θεωρώ τον ευατό μου ευγνώμων που γνώρισα και συνεργάστηκα με την κ. Παρλαπάνη Φαίη, που χωρίς τη βοήθεια της, τη συμβολή της, τις οδηγίες της, τη στήριξή της και κυρίως την υπομονή της δεν θα ολοκληρωνόταν έγκαιρα η συγκεκριμένη πτυχιακή διατριβή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα 2 μέλη της ερευνητικής ομάδας, τις συμφοιτήτριές μου Ιωάννα Άσκα και Αγγελική Χαρούδη, που δουλέψαμε για περισσότερους από 12 μήνες παρέα χωρίς να δημιουργηθούν οποιαδήποτε προβλήματα. Αντίθετα υπήρχε μόνο παράλληλη στήριξη και βοήθεια τους ενός στη δουλειά και τα καθήκοντα του άλλου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες, καθώς παρατηρείται μικροβιακή αύξηση και παραγωγή μεταβολιτών από τους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα. Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν α) η παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών, β) η εκτίμηση των κυριότερων κινητικών παραμέτρων και γ) η μελέτη των παραγόμενων πτητικών μεταβολικών προϊόντων, με μοντέρνες αναλυτικές μεθόδους (SPME/GC-MS), των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στείρα μοντέλα υποστρώματα ιχθυοζωμού και συντήρησή τους στους 8°C. Απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση/ταυτοποίηση των μεταβολιτών οι οποίοι παράγονται από συγκεκριμένα είδη/στελέχη του γένους *Pseudomonas* κατά τη διάρκεια της συντήρησης μοντέλου υποστρώματος που προσομοιάζει πραγματικό τρόφιμο (αλίευμα).

Στο τέλος της συντήρησης δεν παρατηρήθηκε φάση προσαρμογής (lag) κατά την αύξηση των υπό μελέτη μικροοργανισμών εκτός του *Pseudomonas fluorescens* LMG ( $0.17 \pm 0.01$ ). Το *Pseudomonas fluorescens* LMG και το *Pseudomonas fragi* strain:MA07 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές  $y_{max}$  (10.1 και 9.21 log cfu/g, αντίστοιχα) σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, ενώ το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB και *Pseudomonas migulae* strain P11 παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές  $y_{max}$  (7.31 και 7.52 log cfu/g, αντίστοιχα).

Το *Pseudomonas fragi* strain:JCM5396 ( $\mu_{\max}=1.96$ ) και το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB ( $\mu_{\max}=1.73$ ) παρουσίασαν τους μεγαλύτερους ειδικούς ρυθμούς αύξησης, ενώ το *Pseudomonas vranovensis* τον μικρότερο ( $\mu_{\max}=0.80$ ) σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους υπό μελέτη μικροοργανισμούς .

Μεγάλος αριθμός πτητικών ουσιών (αλκοόλες, αλδεϋδες, κετόνες, εστέρες, σουλφίδια, οργανικά οξέα κτλ) βρέθηκαν να σχετίζονται με τη μεταβολική δραστηριότητα συγκεκριμένων ειδών/στελεχών του γένους *Pseudomonas* κατά τη συντήρηση των ενοφθαλμισμένων μοντέλων υποστρωμάτων. Οι ουσίες αυτές είναι ακόλουθες: Acetone, Dimethyl sulfide, 2-methyl-1-Butanol, Ethyl-2methylbutyrate, 2-Heptanone, 3-octanone, Limonene, 2-Nonanone, 3,7-Dimethyl-1-octanol, Butyl butyrate, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, Nonanol, Ethyl alcohol, Ethane,1,2-diethoxy, Hexyl formate, Ethyl isovalerate, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Ethyl isobutyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, n-Valeraldehyde, 2-Methylbutyraldehyde, Ethyl acetate, 4-Methyl-3-penten-2-one, Octanol, Lauric alcohol, Isopropyl alcohol, 4-methyl-1-pentanol, 2-Hexanone, 2-Hexen-1-ol (trans), 4-Methylacetophenone,2-Decanal,(E), cis-3-Hexenylpropionate, 3-Methylbutyraldehyde, cis-3-Hexenylisovalerate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Acetaldehyde, Ethylalcohol, 4-Hexene-3-one, Ethyl propionate, 2,3-Dimethyl-4-hydroxy, Ethyl tiglate, Phenylacetic acid, 2-Pentenal.

**Λέξεις-κλειδιά:** Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), αλλοίωση, Μικροβιακή αύξηση, Πτητικοί μεταβολίτες.

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων .....	12
1.2 Ειδικοί Αλλοιογόννοι Μικροοργανισμοί (EAM).....	14
1.3 Διερεύνηση Ειδικών Αλλοιογόννων Μικροοργανισμών (EAM).....	16
1.4 Πτητικοί Μεταβολίτες .....	18
1.5 Σκοπός Της Μελέτης .....	19
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ .....	20
2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός .....	20
2.1.1 Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων .....	20
2.1.2 Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιιεργειών σε μοντέλων ιχθύος .....	21
2.2 Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας .....	22
2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων .....	22
2.4 Χημική ανάλυση .....	23
2.4.1 Προσδιορισμός πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC/MS).....	23
2.4.2 Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction) .....	23
2.4.3 Ανάλυση πτητικών ουσιών .....	23
2.4.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών .....	24
2.5. Στατιστική ανάλυση .....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	25
3.1 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης .....	25
3.2 Μικροβιακή αύξηση στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα.....	26
3.3 Χημική ανάλυση και παραγωγή πτητικών ουσιών .....	30



3.3.1 Κατηγοριοποίηση των πτητικών ουσιών.....	30
3.3.2 Ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας .....	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	52
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	55
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
7.ABSTRACT .....	67

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 2.1.** *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2014, 2015).

**Πίνακας 3.1** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε εμβολιασμένα στερεά θρεπτικά υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C. Οι τιμές (Μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση, 3 επαναλήψεις), οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Barranyi & Roberts, 1994), ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των αποικιών.

**Πίνακας 3.2** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396 και *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* MA07 σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C.

**Πίνακας 3.3** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovenssis*, *Pseudomonas fluorescens* LMG και *Pseudomonas migulae* P11 σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C

**Πίνακας 3.4** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε συγκαλλιέργειες όλων στελεχών του είδους *Pseudomonas* σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C

**Πίνακας 3.5** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) ανά κατηγορία, σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar).

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 3.1** Παρουσίαση των πληθυσμιακών μεταβολών των μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* sp. σε συνάρτηση με το χρόνο, που αντιστοιχεί σε χρονικό διάστημα πέντε (5) ημερών. Με σύμβολο παρουσιάζονται οι πραγματικές τιμές των μικροοργανισμών και με ευθεία γραμμή οι τιμές των μοντέλων του τροφίμου όπως προέκυψαν μετά από την επεξεργασία το λογισμικό του προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994)

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1** Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας αλλοίωσης των ιχθυρών

**Εικόνα 2** Σχηματική απεικόνιση μίας πανοραμικής όψης των βασικών στοιχείων μιας τυπικής μηχανής GC/MS (Gas chromatography–mass spectrometry)

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Μικροβιακή Αλλοίωση Ιχθύων

Στην επιστήμη και στην τεχνολογία τροφίμων ως **αλλοίωση τροφίμων** μπορούμε να ορίσουμε την υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Haugen, J.E.2006). Καθώς αναφερόμαστε λοιπόν σε υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων, υποβαθμισμένο μπορεί να θεωρηθεί ένα τρόφιμο που έχει υποστεί τη δράση μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (τάγγιση) (Ashie *et al.* 1996, Gram & Huss 1996).

Η **μικροβιακή αλλοίωση** αποτελεί το κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard 2002). Κύρια χαρακτηριστικά εκδήλωσης μικροβιακής αλλοίωσης στα τρόφιμα είναι κατά κύριο τρόπο οι αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (οσμή, γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill 1986). Οι κύριες προελεύσεις των μικροοργανισμών, που συμμετέχουν με ενεργό τρόπο στην αλλοίωση των τροφίμων, είναι η αρχική μικροβιακή σύνθεση και η επιμόλυνση (μείανση).

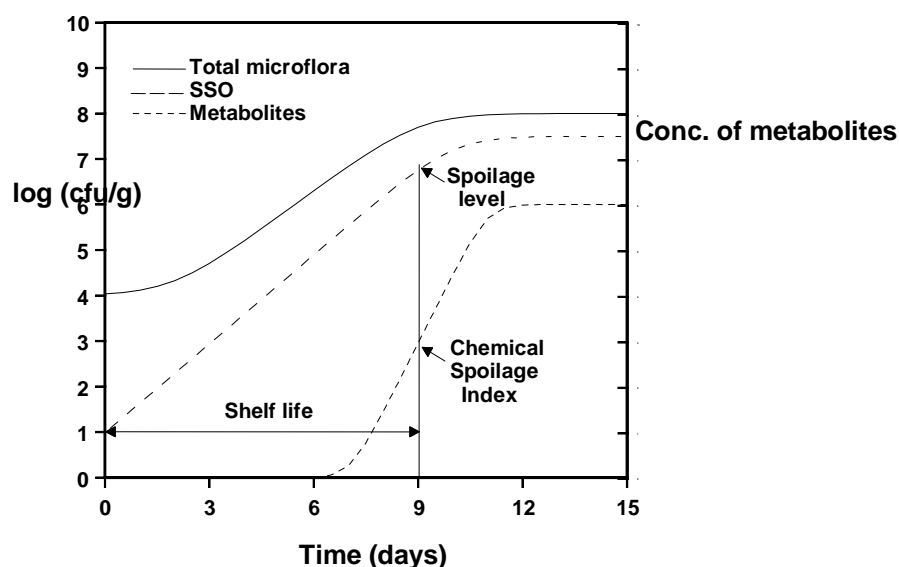
Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα Gram<sup>-</sup> βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από Gram<sup>+</sup> βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss 1996, Haugen, J.E. 2006). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της τροπικής ζώνης, αποτελείται κυρίως από Gram<sup>+</sup> 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 έχουν τη δυνατότητα επιμόλυνσης από έναν ευρύ αριθμό μικροοργανισμών που προέρχονται από παράγοντες όπως το φυσικό τους περιβάλλον, ο άνθρωπος, ο εξοπλισμός και οι επιφάνειες επεξεργασίας (Jay *et al.* 2005). Οι ιχθύες οι οποίοι προέρχονται από μολυσμένα ύδατα συνηθίζουν να 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.

Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο, ότι κατά τη διαδικασία της συντήρησης, μόνο ένα μικρό ποσοστό της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, επονομαζόμενοι και ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), παράγουν συγκεκριμένες ουσίες τους λεγόμενους 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 κομμάτι της μικροβιακής αλλοίωσης εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003).

## 1.2 Ειδικό Αλλοιογόνος Μικροοργανισμοί (EAM)

Οι Ειδικό Αλλοιογόνος Μικροοργανισμοί είναι αποδεδειγμένο ότι αποτελούν την κυριότερη αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM (SSO, Specific Spoilage Organisms) αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των  $10^7$ - $10^9$  cfu/g, οι παραγόμενες από αυτούς ουσίες, που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους (metabolites: CSI-chemical spoilage ind(ex)-ices), έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996) (Σχήμα 1).



**Εικόνα 3** Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας αλλοίωσης των ιχθυρών

Στους ιχθύες που αλιεύονται από περιοχές με εύκρατες κλιματικές συνθήκες και αποθηκεύονται σε πάγο μετά το πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής, τα γένη *Pseudomonas* και *S. putrefaciens* αποτελούν τους κυριότερους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Liston 1960, Gram *et al.* 1987, Gram *et al.* 1990). Το *S.*

*putrefaciens* αποτελεί τον κυριότερο EAM σε ιχθύες που αλιεύονται από τα ύδατα της Β. Ευρώπης και συντηρούνται σε πάγο. Ο συγκεκριμένος EAM έχει την ικανότητα να μετατρέπει το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA), γεγονός που προσδίδει στο προϊόν την έντονη μυρωδιά της ‘ψαρίλας’, σε βαθμό τέτοιο ώστε να περιέλθει η οργανοληπτική απόρριψη του ιχθύος (Gram *et al.* 1987). Έπειτα αναφορικά σε αλιεύματα που αλιεύονται στα χωρικά ύδατα της Μεσογείου, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί είναι οι ίδιοι με αυτούς που επικρατούν στα αλιεύματα της Β. Ευρώπης. Ωστόσο ως EAM έχουν χαρακτηριστεί τα *Pseudomonas* spp. διότι φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς από το *S. putrefaciens*, ενώ ταυτόχρονα τα αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων είναι οι κύριοι μεταβολίτες που προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη (Dainty, 1996). Τα *Pseudomonas* spp. επικρατούν έναντι του *S. putrefaciens* στους ιχθύες της Μεσογείου κυρίως λόγω της αδυναμίας των τελευταίων να παράγουν επαρκή ενέργεια από την αναγωγή του TMAO σε TMA.

Τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αλιεύματα που προέρχονται από τα εγχώρια Ελληνικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000; Tryfinopoulou *et al.* 2002, Parlapani *et al.* 2014, 2015). Τα είδη του γένους *Pseudomonas* που έχουν θεωρηθεί ως οι κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί του γένους αυτού σε ιχθύες τσιπούρας είναι οι: *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11 (Parlapani *et al.* 2014, 2015). Συγκεκριμένα, το *Pseudomonas fluorescens* DF41TB βρέθηκε να κυριαρχεί σε φιλέτα τσιπούρας στους

βαθμούς 0°C. Το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* LMG βρέθηκε να επικρατεί σε απεντερωμένα φιλέτα τσιπούρας στους 2°C. Έπειτα, τα στελέχη *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* JCM 5396 βρέθηκαν επικρατέστερα σε φιλέτα στους 0°C. Ενώ το στέλεχος *Pseudomonas fragi* MA07 βρέθηκε και αυτό να κυριαρχεί σε φιλέτα τσιπούρας αλλά στους 5°C. Στη συνέχεια το στέλεχος *Pseudomonas fragi/putida* JCM 5435 βρέθηκε να κυριαρχεί σε ολόκληρη τσιπούρα σε θερμοκρασία συντήρησης 15°C. Το στέλεχος *Pseudomonas vranovensis* βρέθηκε να επικρατεί σε απεντερωμένα φιλέτα τσιπούρας στους 2°C. Τέλος το τελευταίο στέλεχος το *Pseudomonas migulaei* P11 κυριάρχησε σε φιλέατ τσιπούρας στους 15°C.

### **1.3 Διερεύνηση Ειδικών Αλλοιογόνων Μικροοργανισμών (EAM)**

Ο προσδιορισμός και μετέπειτα 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 ιχθυηρών είτε σε εκλεκτικά ή σε γενικής χρήσης θρεπτικά υλικά με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κάθε αποικίας (Gram *et al.* 1987, Gennari & Tomaselli 1988, Heinsz *et al.* 1988, Jorgensen & Huss 1989, Dalgaard 1995, Gennari *et al.* 1999, Rodriguez *et al.* 2003, Tryfinopoulou *et al.* 2002, 2007). Η χρήση φαινοτυπικών δοκιμών (μορφολογικές, βιοχημικές) έχει αποδειχθεί ότι είναι ελλιπής σε καθαρές καλλιέργειες, που στοχεύουν στη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, κυρίως λόγω της χαμηλής διακριτικής τους ικανότητας. Είναι γνωστό ότι οι κλασσικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των



μικροοργανισμών παρέχουν πολλές φορές ελλιπή αποτελέσματα (Baumann *et al.* 1972, Molin & Ternstrom 1986, Christensen *et al.* 1994, Tryfinopoulou *et al.* 2002, 2007).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την εξέλιξη γρηγορότερων και πιο αξιόπιστων μεθόδων όπως είναι οι μοριακές τεχνικές. Οι μοριακές τεχνικές διακρίνονται σε μοριακές καλλιεργητικές και σε μοριακές μη καλλιεργητικές. Οι μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές αφορούν μόνο τα βακτήρια που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά. Με τις τεχνικές αυτές οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA λαμβάνοντας μόνο μία μικρή ποσότητα DNA. Η αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου είναι σήμερα η πιο κοινή προσέγγιση για την ανάλυση της μικροβιακής σύνθεσης λόγω της φυλογενετικής πληροφορίας που παρέχει το γονίδιο αυτό. Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηρίων καθώς και για τον εντοπισμό των άγνωστων βακτηρίων σε επίπεδο γένους ή είδους (Sacchi *et al.* 2002). Επομένως, η πληροφορία που λαμβάνεται είναι μακράν ακριβέστερη σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται με τις φαινοτυπικές δοκιμές.

Τα τελευταία χρόνια, μικρός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα. Όσον αφορά τα αλιεύματα της Μεσογείου (κυρίως τσιπούρα), όλοι οι μικροοργανισμοί (είδη/στελέχη) του είδους *Pseudomonas* που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.2 και έχουν θεωρηθεί ως οι κυριότεροι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί του γένους αυτού (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas*

*putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11) έχουν ταυτοποιηθεί με μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές (Parlapani et al. 2014, 2015, Parlapani & Boziaris 2016).

#### 1.4 Πτητικοί Μεταβολίτες

Οι κυριότερες κατηγορίες πτητικών ουσιών που παράγονται από τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα ιχθυρά είναι οι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, θειώδη συστατικά, αμμωνία, εστέρες και τα οργανικά οξέα (Leisner & Gram 1999). Τα *Pseudomonas* spp. ως αερόβιοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Drosinos & Board 1994) και αφού το αφομοιώσουν, συνεχίζουν σε δεύτερο στάδιο με τη διάσπαση των αμινοξέων προς  $\text{NH}_3$  και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Dainty 1996). Ως επί το πλείστον, οι δυσάρεστες οσμές που παράγονται κατά την αλλοίωση ενός τροφίμου είναι αποτέλεσμα των μεταβολιτών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των οσμών είναι αυτή της ‘αμμωνίας’ από το ΤΜΑ και την αμμωνία, του ‘πιπεριού’ από την ισταμίνη, του ‘σάπιου’ από τη καδαβερίνη, τη πουτρεσκίνη και τη τυραμίνη, του ‘θειαφιού’ από τις θειούχες πτητικές ενώσεις, της ‘βύνης’ από μικρού μοριακού βάρους αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες (Dalgaard et al. 2003). Στην περίπτωση των *Pseudomonas* spp. παρατηρείται η παραγωγή πτητικών αζωτούχων βάσεων, πτητικών οξέων, η αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων κ.α. (Miller et al. 1973a,b, Dainty et al. 1989, Drosinos & Nychas 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999)..

Ο προσδιορισμός των διάφορων πτητικών ουσιών που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης ενός αλιευτικού προϊόντος και ευθύνονται για τις διάφορες χαρακτηριστικές οσμές σε αυτό αποτελεί τη νέα τάση για μελέτη. Οι πτητικές ουσίες

έχουν αρχίσει να μελετούνται για να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης διότι μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ της πρώτης ημέρας και της ημέρας απόρριψης κατά τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων (Joffraud *et al.* 2001, Jorgensen *et al.* 2001, Chung *et al.* 2002, Duflos *et al.* 2006, Edirisinghe *et al.* 2007, Soncin *et al.* 2008, Selli & Cayhan 2009, Iglesias *et al.* 2010). Για να χαρακτηριστεί κάποια ουσία από αυτές ως χημικός δείκτης θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως α) να βρίσκεται σε μικρή ή μηδενική συγκέντρωση στο τρόφιμο όταν αυτό είναι υψηλής ποιότητας β) να αυξάνεται η συγκέντρωσή του όσο προχωρά η αλλοίωση γ) να μην επηρεάζεται η συγκέντρωσή του από τη διαδικασία επεξεργασίας δ) να είναι προϊόν μεταβολισμού του ειδικού αλλοιωγόνου οργανισμού ε) η μέθοδος προσδιορισμού να είναι ταχεία, εύκολη και ακριβής (Jay 1986).

### **1.5 Σκοπός Της Μελέτης**

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν:

- α) η παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών,
- β) η εκτίμηση των κυριότερων κινητικών παραμέτρων ( $\mu_{max}$ ,  $y_0$ ,  $y_{end}$ ,  $lag$ )
- γ) η μελέτη των παραγόμενων πτητικών μεταβολικών προϊόντων με μοντέρνες αναλυτικές μεθόδους (GC-MS SPME), των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11 καθώς επίσης και ένα δείγμα το οποίο ονομάστηκε *mix* και περιείχε στελέχη και από τους 8 προαναφερθέντες μικροοργανισμούς), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στείρα μοντέλα υποστρώματα ιχθυοζωμού αποθηκευμένα στους 8°C. Οι μικροοργανισμοί αυτοί απομονώθηκαν από ιχθύες

τσιπούρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασίες ψύξης και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA σε προηγούμενες μελέτες (Parlapani et al. 2015a, b, Parlapani & Boziaris 2016).

## **2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός**

#### **2.1.1 Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων**

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν στερεά μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας (Fish Juice Agar -FJA). Τα μοντέλα υποστρώματα προετοιμάστηκαν μετά από τροποποίηση της μεθόδου κατά Dalgaard (1995). Η διαδικασία ήταν η εξής: 250 g ιχθύος τσιπούρας κόβονταν σε πολύ μικρά κομμάτια, προστίθενταν σε 250 ml απιονισμένου νερού και ομογενοποιούνταν για 2 min σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν διήθηση του ιχθυοζωμού μέσω διάτρητου υφάσματος (τούλι) σε κωνική φιάλη και ακολουθούσε βρασμός για 5 min. Ο ιχθυοζωμός παρέμενε ανέπαφος έως ότου να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθούσε φιλτράρισμα με ηθμό Whatman No.1. Έπειτα, προστίθονταν 0.10 M ρυθμιστικού διαλύματος (0.056 M H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> και 0.044 M HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και ρύθμιση του pH στο 6.5 με NaOH/HCl. Ακολουθούσε βρασμός στους 100°C για 30 min. Τέλος, προστίθονταν αποστειρωμένο εναιώρημα άγαρ 3.0% στον ιχθυοζωμό σε αναλογία 1/1 έτσι ώστε η συγκέντρωση του άγαρ στο τελικό υλικό να είναι 1.5% και κατόπιν το περιεχόμενο μοιράζονταν (ανά 20ml περίπου) σε τριβλία.

### 2.1.2 Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιέργειών σε μοντέλων ιχθύος

Οι ανανεωμένες καλλιέργειες ταυτοποιημένων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας είχαν εμβολιαστεί με τους ακόλουθους μικροοργανισμούς: *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11. Όλοι οι προηγούμενοι μικροοργανισμοί του γένους *Pseudomonas* spp., χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό των μοντέλων υποστρωμάτων. Ο αρχικός πληθυσμός κάθε εμβολίου ήταν περίπου  $5 \cdot 10^3$  cfu/g. Οι ενοφθαλμισμοί πραγματοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες και σε συγκαλλιέργειες (όλοι μαζί). Τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα αποθηκεύθηκαν στους 8°C για 5 ημέρες.

**Πίνακας 2.1** *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2014, 2015).

Φυλότυπος	Κοντινότερος συγγενής	GenBank number	Προέλευση
SBF-B5-d0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB	JN642252	φίλετο 0°C
SBW-B8-dsp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG	GU198122	απεντερωμένα 2°C
SBF-B18-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435	AB685646	φίλετο 0°C
SBF-B19-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396	AB685609	φίλετο 0°C
SBF-A12-dsp	<i>Pseudomonas fragi</i> MA07	AB609073	φίλετο 5°C
SB-d16-13	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435	AB685646	ολόκληρο 15°C

GSB-b10	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	HQ202851	απεντερωμένα 2°C
SBF-B32-dsp	<i>Pseudomonas migulae</i> P11	AY972167	φιλέτο 15°C

## 2.2 Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας

Ένα (1) g δείγματος μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν (n=3) που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85% NaCl) και ακολουθούσε ανάδευση για 2 min σε συσκευή τύπου vortex. Οι πληθυσμοί όλων των μικροοργανισμών απαριθμήθηκαν μετά από επίστρωση (0.1 ml) σε TSA (Tryptone Soy Agar, LAB M, Lancashire, UK) και επώαση στους 25oC για 48-72 ώρες.

## 2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Οι κινητικές παράμετροι των πληθυσμών υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi. Οι παράμετροι αυτές ήταν: η φάση προσαρμογής (**lag time**), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ), ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός ( $y_0$ ) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός ( $y_{max}$ ). Η προσαρμογή των δεδομένων που απαριθμήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία στο μοντέλο του Baranyi έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994).

## **2.4 Χημική ανάλυση**

### **2.4.1 Προσδιορισμός πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)**

Για να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη διεργασία είχαμε συλλέξει σε ειδικούς πλαστικούς περιέκτες τύπου falcon, τριπλά δείγματα των πέντε(5) gr με το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο είχε ήδη εμβολιαστεί και το είχαμε αποθηκεύσει σε καταψύκτη με θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ .

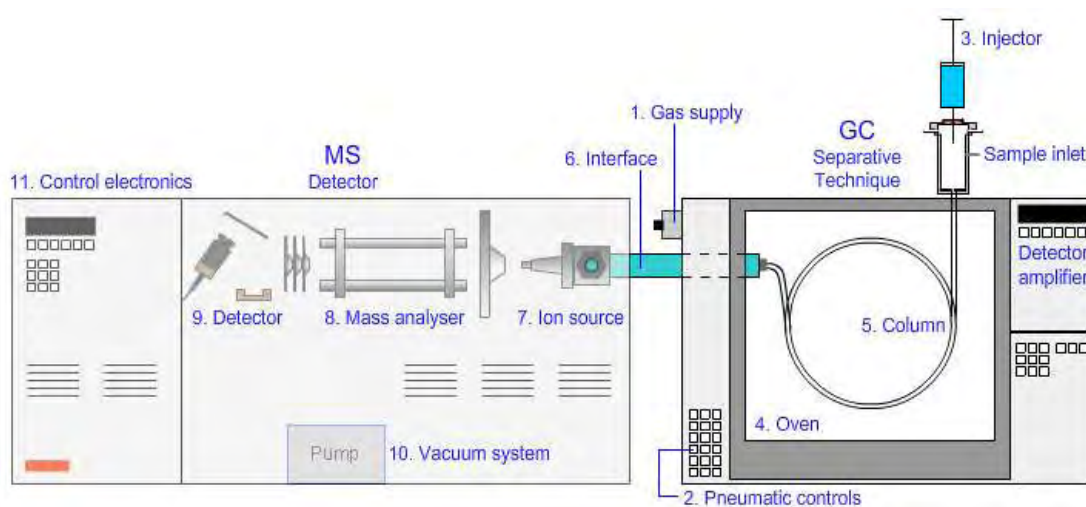
### **2.4.2 Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction)**

Η απομόνωση των πτητικών ουσιών, σε δείγματα που είχαν ληφθεί κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SPME. Στα μοντέλα, 2,5 g από το κάθε δείγμα μεταφέρονταν σε ειδικό φιαλίδιο το οποίο παρέμενε για 15 min στους  $40^{\circ}\text{C}$ . Κατόπιν, τοποθετούνταν η ίνα (SPME Fiber Assembly, 50/30 um DVB / Carboxen TM / PDMS Stableflex TM , for Manual Holder, gray) στον υπερκείμενο του υγρού χώρο για επιπλέον 30 λεπτά, υπό τις ίδιες συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Το μήκος της ίνας στον υπερκείμενο χώρο διατηρούνταν σταθερό. Η εκρόφιση των πτητικών από την ίνα πραγματοποιήθηκε στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σε θερμοκρασία  $250^{\circ}\text{C}$ , σε λειτουργία splitless.

### **2.4.3 Ανάλυση πτητικών ουσιών**

Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συσκευή GC/MS ήταν της εταιρίας *FISONS Instruments* (GC 8000series, Model: 8060, MS: MD-800). Η στήλη διαχωρισμού ήταν CP-Wax 52CB (60m X 0,32mm, DF=0,25μm) της *CHROMPACK*.

Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το ακόλουθο: 40°C για 5 min, άνοδος στους 150°C (4°C /min) και άνοδος στους 250°C (30°C /min). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της πηγής ιόντων ήταν 250 και 200°C, αντίστοιχα. Το φέρον αέριο ήταν Ήλιο με ροή 2 mL/min. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν *electron impact*, με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος μαζών 29-400 m/z. Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιούνταν για 40,833 min.



**Εικόνα 4** Σχηματική απεικόνιση μίας πανοραμικής όψης των βασικών στοιχείων μιας τυπικής μηχανής GC/MS (Gas chromatography–mass spectrometry)

#### 2.4.4 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών

Η ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της βάσης δεδομένων NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Amdis software (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). Η ημι-ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα ολικής σάρωσης (full scan). Τα τερπενικά



παράγωγα, οι υδρογονάνθρακες και οι πολυκυκλικές ενώσεις δεν ελήφθησαν υπόψη, ως παράγωγα της στήλης ή άλλου τύπου προέλευσης.

## **2.5. Στατιστική ανάλυση**

Για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των μικροβιακών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα υπολογιστικά φύλλα Excel και το λογισμικό του προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994) ανάλογα την περίπτωση, με επίπεδο σημαντικότητας  $p$  0.05.

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης**

Από το σύνολο των δειγμάτων τα οποία εξετάσαμε την πρώτη ημέρα (d 0) και τα αξιολογήσαμε οργανοληπτικά ως άριστα. Στους 8°C, τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες και συντηρήθηκαν σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 8°C για διάστημα 6 ημερών (d 5) συμπεριλαμβανομένου και της πρώτης ημέρας (d 0). Στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού, τα εμβολιασμένα τριβλία γινόταν καθημερινή παρατήρηση και καταμέτρηση των αποικιών και παράλληλα πάρθηκαν ανά δύο ημέρες και δείγματα για χημική ανάλυση τα οποία αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη στους -20 °C. Κάτω από αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία 8 °C τα δείγματα παρουσίασαν μία συνεχή αύξηση των πληθυσμών τους, όπως θα παρουσιαστεί στο πίνακα 1. Μετά το πέρας της πέμπτης ημέρας αναφοράς (d 5) τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως 'υποβαθμισμένα', σε σημείο ώστε να αποβληθούν.

### 3.2 Μικροβιακή αύξηση στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 3.2 δεν παρατηρήθηκε φάση προσαρμογής (lag) κατά την αύξηση των υπό μελέτη μικροοργανισμών εκτός του *Pseudomonas fluorescens* LMG (0.17±0.01). Το *Pseudomonas fluorescens* LMG και το *Pseudomonas fragi* strain:MA07 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές  $y_{max}$  (10.1 και 9.21 log cfu/g, αντίστοιχα) σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, ενώ το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB και *Pseudomonas migulae* strain P11 παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές  $y_{max}$  (7.31 και 7.52 log cfu/g, αντίστοιχα).

Το *Pseudomonas fragi* strain:JCM5396 ( $\mu_{max}$ =1.96) και το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB ( $\mu_{max}$ =1.73) παρουσίασαν τους μεγαλύτερους ειδικούς ρυθμούς αύξησης, ενώ το *Pseudomonas vranovensis* τον μικρότερο ( $\mu_{max}$ =0.80) σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους υπό μελέτη μικροοργανισμούς (Πίν. 3.1).

**Πίνακας 3.1** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε εμβολιασμένα στερεά θρεπτικά υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C. Οι τιμές (Μέσοι όροι ±τυπική απόκλιση, 3 επαναλήψεις), οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Barranyi & Roberts, 1994), ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των αποικιών.

Μικροοργανισμοί	Αρχικός Πληθυσμός ( $y_0$ ) (log CFU/g±τυπ.απ.)	Τελικός Πληθυσμός ( $y_{max}$ ) (log CFU/g±τυπ.απ.)	Lag±τυπ.απ. (d)	$\mu_{max}$ ± τυπ.απ. (d <sup>-1</sup> )
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain DF41TB	2.04±0.30 (2.01±0.14)	7.31±0.40 (7.39±0.19)	-	1.73±0.37
<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5396	3.54±0.38 (3.49±0.12)	8.64±0.13 (8.72±0.10)	-	1.96±0.24
<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5435	3.90±0.31 (3.97±0.22)	8.69±0.23 (8.59±0.20)	-	1.68±0.27

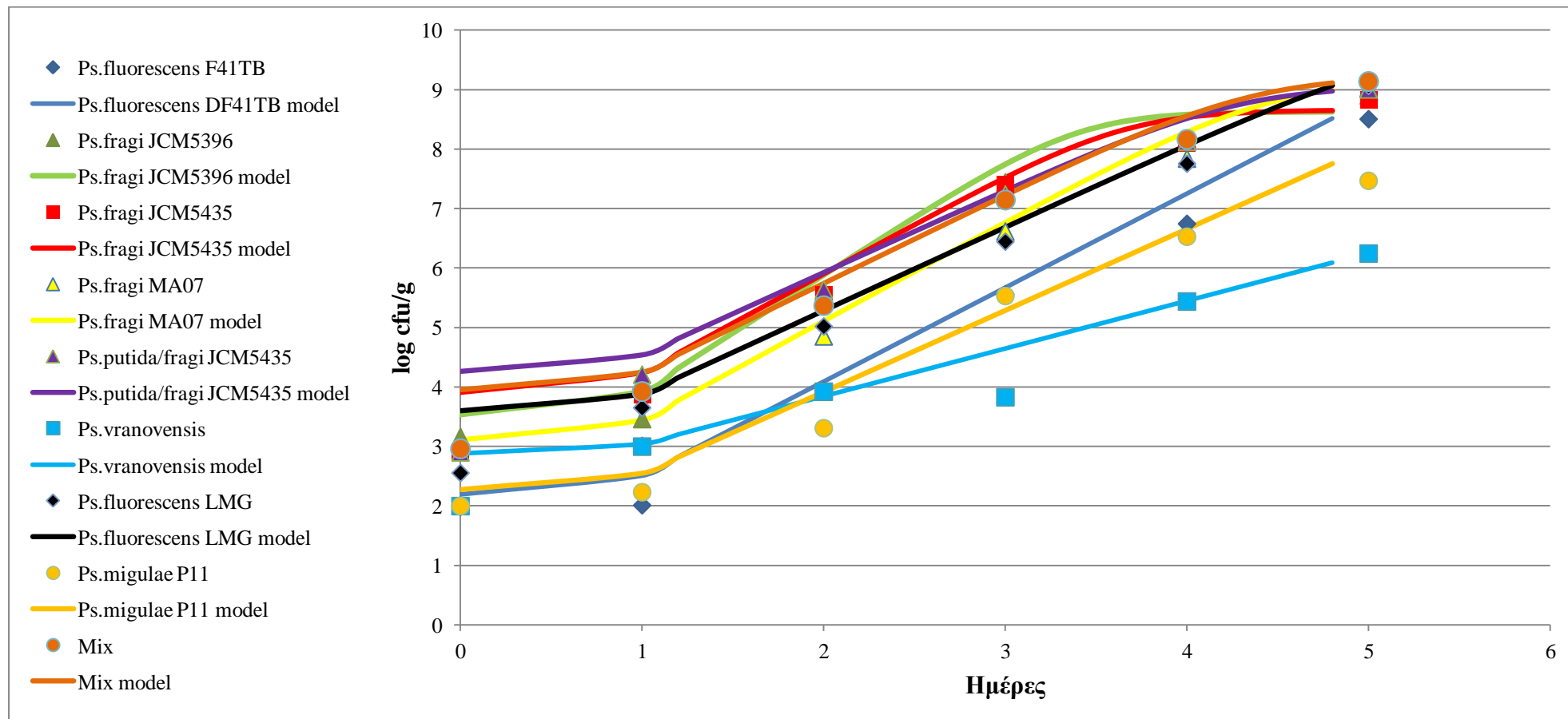
<i>Pseudomonas fragi</i> strain:MA07	3.11±0.07 (3.01±0.10)	9.21±0.01 (9.11±0.01)	-	1.66±0.05
<i>Pseudomonas putida/fragi</i> strain: JCM 5435	4.26±0.01 (4.19±0.01)	9.06±0.10 (9.01±0.09)	-	1.39±0.02
<i>Pseudomonas vranovensis</i>	2.89±0.21 (2.90±0.20)	8.74±0.24 (8.49±0.13)	-	0.80±0.02
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG	3.68±0.20 (3.71±0.14)	10.10±0.31 (10.02±0.24)	0.17±0.01	1.40±0.03
<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11	2.21±0.26 (2.18±0.11)	7.52±0.01 (7.66±0.02)	-	1.66±0.35
Mix	4.06±0.04 (4.11±0.07)	9.28±0.01 (9.01±0.01)	-	1.38±0.07

$\mu_{max}$ : μέγιστος ρυθμός αύξησης, lag phase: φάση προσαρμογής

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές των ειδών/στελεχών του γένους *Pseudomonas* σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες στους 8°C.

Πιο συγκεκριμένα, τα σημεία υποδεικνύουν τις τιμές που έφτασαν οι πληθυσμοί των στελεχών *Pseudomonas* και που φαίνεται ότι και εκεί τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* LMG και *Pseudomonas fragi* MA07 φτάνουν στα υψηλότερα επίπεδα πληθυσμών με τιμές 10.02 και 9.11 log cfu/g αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ο 3<sup>ος</sup> κατά σειρά μεγαλύτερος πληθυσμός που σημειώθηκε ήταν του στελέχους *Pseudomonas putida/fragi* 5396 στα επίπεδα των 8.72 log cfu/g. Σε χαμηλότερα επίπεδα έφτασαν τα στελέχη *Pseudomonas fragi* 5435 και *Pseudomonas vranovensis* με τιμές που έφτασαν στα επίπεδα 8.59 και 8.49 log cfu/g, αντίστοιχα. Τέλος, το *Pseudomonas migulae* P11 και το *Pseudomonas fluorescens* DF41TB παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές πληθυσμών που έφτασαν στα επίπεδα 7.6 και 7.39 log cfu/g, αντίστοιχα.

**Διάγραμμα 3.1** Παρουσίαση των πληθυσμιακών μεταβολών των μικροοργανισμών του γένους *Pseudomonas* sp. σε συνάρτηση με το χρόνο, που αντιστοιχεί σε χρονικό διάστημα πέντε (5) ημερών. Με σύμβολο παρουσιάζονται οι πραγματικές τιμές των μικροοργανισμών και με ευθεία γραμμή οι τιμές των μοντέλων του τροφίμου όπως προέκυψαν μετά από την επεξεργασία το λογισμικό του προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994)



Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που αποτελούσαν την τελική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων τσιπούρας που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 8 °C, ήταν τα *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, και *Pseudomonas fragi* JCM 5435. Καθώς επίσης και η συγκαλλιέργεια έφτασε στα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, φάνηκε ότι παρόλο που όλα τα είδη ανήκουν στο ίδιο γένος του *Pseudomonas*, σε ορισμένα από αυτά ευνοήθηκε περισσότερο η αύξησή τους.

### **3.3 Χημική ανάλυση και παραγωγή πτητικών ουσιών**

#### **3.3.1 Κατηγοριοποίηση των πτητικών ουσιών**

Οι πτητικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα ιχθύος τσιπούρας παρουσίασαν ποικίλες μεταβολές (αύξηση, μείωση, αυξομείωση, εμφάνιση και εξαφάνιση ουσιών) κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι ουσίες που παρήχθησαν στους μάρτυρες και στις μονοκαλλιέργειες των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών παρουσιάζονται στους πίνακες 3.2-3.4.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ουσίες που παρήχθησαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα (Πιν. 3.2 - 3.4) σε σχέση με τα μοντέλα μάρτυρες (Πιν. 3.5) προσδιορίστηκε ποιες από αυτές φαίνεται να είναι μικροβιακοί μεταβολίτες και από ποιους μικροοργανισμούς παράγονται. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τα μοντέλα μάρτυρες προσδιορίστηκαν πτητικές ουσίες που παρήχθησαν από μηχανισμούς διαφορετικούς.

**Πίνακας 3.2** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396 και *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fragi* MA07 σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C.

Πτητικές Ουσίες	Air (Εμβαδόν X 10 <sup>-6</sup> )											
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF41TB			<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5396			<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5435			<i>Pseudomonas fragi</i> MA07		
Αλκοόλες(Alcohols)	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Isoamyl alcohol	0,02	0,13	-	-	0,03	0,125	-	0,14	0,24	0,10	0,22	0,17
Isopropyl alcohol	5,63	-	-	1,96	0,84	-	0,48	0,65	-	6,6	9,1	-
Heptyl alcohol	-	0,01	0,05	-	-	0,04	-	0,009	-	-	0,03	0,01
Lauric alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
Nonanol	-	0,13	0,70	-	0,18	0,75	-	0,2	0,38	-	0,15	0,35
Ethyl alcohol	6,42	1,86	6,43	15,19	9,61	2,51	9,22	9,55	8,43	9,34	13,93	10,7
2-Ethyl-1-hexanol	-	-	-	0,27	5,45	9,57	0,83	6,33	7,67	0,50	9,53	3,83
1-octen-3-ol	0,04	0,26	0,12	-	-	0,04	-	0,26	-	-	0,09	0,10
2-methyl-1-butanol	0,07	0,06	-	-	-	-	-	-	0,01	0,10	-	0,06
3-methyl-1-butanol	0,18	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-pentanol,4-methyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,06
Cis-6-Nonen-1-ol	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	0,29	0,01	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	0,01	0,02	-	0,06	0,10	0,04	0,04	0,05	0,18	0,07	-	0,02
1-Decanol	0,01	-	-	-	-	1,59	-	0,10	-	-	0,93	2,10
1-Hexanol	0,01	0,03	-	-	-	0,03	-	0,01	0,04	-	-	-
Octanol	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	0,12	0,03	0,06
1-octanol	0,10	1,46	0,65	-	0,43	0,44	-	0,92	-	-	1,55	0,6
1-Penten-3-ol	0,19	0,32	0,11	0,07	0,02	-	0,15	-	-	0,06	0,05	-
Amyl alcohol	0,004	0,006	-	-	-	-	0,02	0,01	0,01	-	-	-
2-Hexen-1-ol (trans)	0,02	-	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Αλδεϋδες(Aldehydes)</b>												
Nonanal	3,13	4,49	1,34	2,18	4,31	0,33	1,96	9,16	4,65	3,66	4,47	7,46

Hexenal	0,93	-	0,31	-	-	-	-	1,92	-	1,77	-	-
n-Decanal	0,44	0,70	0,27	0,45	0,62	0,06	0,34	1,77	0,10	0,76	0,95	1,58
Isobutyraldehyde	0,01	-	-	0,08	-	-	0,06	-	-	0,41	0,29	-
Hexanal	0,56	0,74	0,37	0,46	0,12	-	0,11	-	-	-	0,02	-
Heptanal	0,44	0,43	1,9	0,10	0,26	-	0,70	-	-	0,42	0,14	-
Octanal	0,27	0,28	0,29	0,16	0,16	-	0,15	0,16	-	0,44	0,78	-
n-Valeraldehyde	0,01	0,01	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methylbutyraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,01	-
3-Methylbutyraldehyde	-	0,03	0,05	1,14	-	-	0,48	0,03	-	0,11	0,05	-
Lauric aldehyde	-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-
2-Decanal, (E)	0,04	0,7	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,03	-
2-Decenal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	0,28	0,31	-	-	-
2-Pentanal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,03
trans-2-Nonenal	-	0,01	0,02	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-
trans-2-Octenal	-	-	-	-	0,56	-	-	0,19	-	-	-	-
<b>Κετόνες (Ketones)</b>												
Acetone	2,24	3,25	5,54	5,42	3,84	7,08	0,67	2,56	12,10	4,74	5,00	18,01
2-Pentanone	1,42	3,25	0,86	-	0,06	0,09	0,03	-	-	0,01	0,10	0,05
2-Heptanone	-	-	-	-	-	0,11	-	-	-	0,03	-	0,31
2-Octanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Octanone	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	0,01
2-Nonanone	0,07	-	0,09	-	-	0,275	-	-	1,06	-	0,09	0,26
2-Hexanone	0,09	-	0,10	0,07	-	-	-	-	-	0,06	-	-
2-undecanone	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-
3-Pentanone	-	-	-	0,61	-	0,04	-	-	0,24	-	-	0,26
Acetophenone	-	-	-	0,06	-	0,05	-	-	-	0,15	-	0,11
3-Octen-2-one	-	-	-	-	-	0,02	-	-	0,30	0,04	-	0,62
4-Methylacetophenone	0,61	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,24	0,16	0,11	0,26	0,32	0,10	0,51	0,28



one												
Acetophenone	0,04	0,28	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Methyl-2,3-hexanedione	0,15	-	0,03	0,14	-	0,04	-	-	0,10	-	-	-
4-Methyl-2-pentanone	0,07	0,06	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,06
4-Methyl-3-penten-2-one	0,06	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hexene-3-one	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,02
<b>Εστέρες (Esters)</b>												
n-Butyl acetate	0,10	0,45	0,60	-	0,14	0,14	-	-	-	0,09	-	0,12
Ethyl acetate	-	-	0,76	0,74	0,71	0,81	-	-	-	-	-	-
Ethyl isobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	1,21	4,01
Methyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyl butyrate	-	-	-	0,01	0,12	0,07		0,08	-	-	-	-
Isobutyl isobutyrate	0,02	0,01	0,06	-	-	-	0,005	0,03	0,05	0,01	0,02	0,01
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	0,65
Hexyl formate	-	0,14	0,3	0,04	-	0,04	0,05	-	-	0,09	-	0,03
Ethyl butyrate	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	0,15
Ethyl octanoate	-	-	-	-	-	0,01	0,01	0,07	-	-	-	0,27
Ethyl isovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17
Ethyl proprionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78
Ethyl tiglate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,20
cis-3-Hexenylpropionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-
<b>Λοιπές ουσίες (Other substances)</b>												
Ethane,1,2-diethoxy	0,02	0,03	-	-	-	-	-	-	-	0,91	-	-
2,3-Dimethyl-4-hydroxy	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,06	-	-	0,07
Limonene	0,33	0,35	0,21	0,28	0,42	0,34	0,46	0,27	0,53	0,50	0,30	0,24
Disulfide,dimethyl	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-

**Πίνακας 3.3** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) σε μονοκαλλιέργειες των *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas fluorescens* LMG και *Pseudomonas migulae* P11 σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C

Πτητικές Ουσίες	Area(Εμβαδόν X 10 <sup>-6</sup> )											
	<i>Pseudomonas putida/fragi</i> JCM 5435			<i>Pseudomonas Vranovensis</i>			<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG			<i>Pseudomonas migulae</i> P11		
Αλκοόλες(Alcohols)	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Isoamyl alcohol	0,03	-	0,30	0,04	0,11	0,20	-	0,09	0,22	-	0,08	0,23
Isopropyl alcohol	1,28	-	-	3,55	-	-	4,01	-	-	0,09	-	0,66
Heptyl alcohol	-	-	0,02	0,09	-	-	-	0,01	-	-	0,04	-
Lauric alcohol	-	-	0,03	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-
Nonanol	0,02	-	0,09	0,03	0,04	-	-	0,10	-	-	0,07	0,11
Ethyl alcohol	10,17	9,39	15,03	11,13	7,05	2,21	12,44	5,56	7,31	0,1	2,73	14,36
2-Ethyl-1-hexanol	-	-	-	0,48	4,07	1,48	0,59	7,62	2,65	0,46	8,10	7,74
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-	0,06	-
2-methyl-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-
3-methyl-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-pentanol,4-methyl	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
Cis-6-Nonen-1-ol	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	0,02	-	0,01	-	0,02	0,17	0,01	0,008	0,31	-	0,02	0,16
1-Decanol	-	-	0,11	-	-	0,13	-	0,09	0,04	-	0,01	-
1-Hexanol	-	-	0,10	-	0,02	0,02	-	0,04	-	-	0,07	0,07
Octanol	-	-	-	-	-	-	-	0,43	-	-	-	-
1-octanol	-	0,01	-	-	0,04	-	-	-	0,03	-	0,78	0,42
1-Penten-3-ol	0,02	-	0,11	0,03	0,09	-	0,16	0,11	0,09	-	-	-
4-Penten-2-ol	2,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amyl alcohol	-	-	0,01	-	-	-	-	0,01	-	-	0,01	-
2-Hexen-1-ol (trans)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>Αλδεϋδεις(Aldehydes)</b>												
Nonanal	3,28	3,92	5,01	2,79	0,93	0,22	4,64	1,98	1,33	1,47	5,30	1,57
Hexenal	-	-	-	0,48	0,49	-	-	1,27	2,46	-	-	0,07
n-Decanal	0,66	0,23	1,11	0,40	0,20	0,01	0,76	0,35	0,37	0,27	0,77	0,30
Isobutyraldehyde	-	-	-	-	--	-	-	-	-	-	-	-
Hexanal	0,28	0,01	3,16	-	-	-	3,03	-	-	0,12	4,33	-
Heptanal	0,31	-	0,13	0,21	0,37	-	0,56	0,18	-	0,06	0,78	-
Octanal	-	-	10,05	0,06	0,11	-	-	0,35	-	-	1,69	-
n-Valeraldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
2-Methylbutyraldehyde	0,009	-	-	-	-	-	0,02	-	-	0,02	-	-
3-Methylbutyraldehyde	0,01	-	0,02	0,02	-	-	0,25	0,31	-	0,04	-	0,007
Lauric aldehyde	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-
Acetaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
2-Decanal, (E)	-	-	0,37	-	-	-	0,05	-	-	-	0,73	-
2-Decenal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-
2-Pentanal, (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentenal	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-
trans-2-Nonenal	-	-	0,10	-	-	-	0,17	-	-	-	0,37	-
trans-2-Octenal	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-
<b>Κετόνες (Ketones)</b>												
Acetone	0,55	10,31	10,63	0,82	4,32	2,01	2,21	5,61	1,73	0,99	1,58	3,07
2-Pentanone	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Heptanone	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-
2-Octanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Octanone	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-	-	-	-
2-Nonanone	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-
2-Hexanone	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-
2-undecanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Pentanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,56	-
Acetophenone	0,03	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	0,01	-

3-Octen-2-one	0,01	-	0,78	0,003	-	0,30	-	-	0,26	-	-	0,25
4-Methylacetophenone	0,02	-	-	-	0,02	-	0,05	-	-	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	0,07	-	0,23	0,05	0,14	0,20	0,17	0,35	0,43	0,06	0,11	0,24
Acetophenone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Methyl-2,3-hexanedione	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Methyl-2-pentanone	-	-	-	0,04	-	-	0,05	-	-	-	-	-
4-Methyl-3-penten-2-one	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hexene-3-one	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Εστέρες (Esters)</b>												
n-Butyl acetate	-	-	0,02	-	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-
Ethyl acetate	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	0,71
Ethyl isobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyl butyrate	0,01	-	0,01	-	-	0,01	-	-	-	-	0,03	-
Isobutyl isobutyrate	-	-	-	-	0,02	0,05	0,01	0,08	-	0,008	-	0,08
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
Hexyl formate	-	0,07	0,09	-	0,12	-	0,05	-	-	-	0,06	-
Ethyl butyrate	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-
Ethyl octanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl isovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
Ethyl tiglate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl myristate	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-
cis-3-Hexenylpropionate	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-3-Hexenylisovalerate	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

cis-3-Hexenylbutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
<b>Οργανικά οξέα (Organic acids)</b>												
Ethane,1,2-diethoxy	-	0,17	-	-	-	-	-	1,65	-	-	0,42	-
2,3-Dimethyl-4-hydroxy	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-
2-Propanol, 1-butoxy-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-
<b>Λοιπές ουσίες (Other substances)</b>												
Limonene	0,39	0,04	0,62	0,41	0,29	-	0,61	0,31	0,17	0,02	0,33	0,13
Disulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	0,08
Disulfide,dimethyl	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
Phenylacetic acid	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetic acid	-	-	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-

**Πίνακας 3.4** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν  $\times 10^{-6}$  της κάθε κορυφής) σε συγκαλλιέργειες όλων στελεχών του είδους *Pseudomonas* σε μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους που διήρκεσε 4 ημέρες, υπό αερόβιες συνθήκες στους 8°C

Πτητικές Ουσίες	Εμβαδόν $\times 10^{-6}$		
	Mix (Συγκαλλιέργεια)		
Αλκοόλες (Alcohols)	0	2	4
Isoamyl alcohol	-	-	0,05
Isopropyl alcohol	0,43	-	-
Heptyl alcohol	-	-	-
Lauric alcohol	-	-	-
Nonanol	-	-	0,05
Ethyl alcohol	0,41	0,78	2,02
2-Ethyl-1-hexanol	0,13	7,98	9,57
1-octen-3-ol	-	0,02	-
2-methyl-1-butanol	-	-	-
3-methyl-1-butanol	-	-	-
1-pentanol,4-methyl	-	-	-
Cis-6-Nonen-1-ol		-	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	0,01	-	0,04
Nonanol	-	0,03	0,08
1-Decanol	-	-	-
1-Hexanol	-	0,04	0,07
Octanol	-	-	-
1-octanol	-	0,06	0,04
1-Penten-3-ol	-	-	-

4-Penten-2-ol	-	-	-
Amyl alcohol	-	-	-
2-Hexen-1-ol (trans)	-	-	-
<b>Αλδεΐδες (Aldehydes)</b>	-	-	-
Nonanal	2,53	0,29	0,28
Hexenal	0,27	-	-
n-Decanal	0,39	0,17	0,19
Isobutyraldehyde	-	0,02	-
Hexanal	-	0,25	-
Heptanal	0,08	0,01	-
Octanal	-	0,09	-
n-Valeraldehyde	-	-	-
2-Methylbutyraldehyde	-	-	-
3-Methylbutyraldehyde	-	-	-
Lauric aldehyde	-	-	-
Acetaldehyde	-	-	-
2-Decanal, (E)	-	-	-
2-Decenal, (E)	-	-	-
2-Pentanal, (E)	-	-	-
2-Pentenal	-	-	-
trans-2-Nonenal	-	-	-
trans-2-Octenal	-	-	-
<b>Κετόνες (Ketones)</b>			
Acetone	1,36	0,61	4,42
2-Pentanone	-	-	-
2-Heptanone	-	-	0,15

2-Octanone	-	-	-
3-Octanone	-	-	-
2-Nonanone	-	-	0,29
2-Hexanone	0,10	-	-
2-undecanone	-	-	-
3-Pentanone	-	-	-
Acetophenone	-	-	-
3-Octen-2-one	-	-	0,21
4-Methylacetophenone	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	-	0,05	0,08
Acetophenone	-	-	-
5-Methyl-2,3-hexanedione	-	0,005	-
3,4-Hexanedione	-	-	0,03
4-Methyl-3-penten-2-one	-	-	-
4-Hexene-3-one	-	-	-
<b>Εστέρες (Esters)</b>			
n-Butyl acetate	0,02	0,03	-
Ethyl acetate	-	-	-
Ethyl isobutyrate	-	-	-
Methyl acetate	-	-	-
Butyl butyrate	-	-	-
Isobutyl isobutyrate	-	-	0,01
Ethyl-2methylbutyrate	-	-	



Hexyl formate	-	-	-
Ethyl butyrate	-	-	-
Ethyl octanoate	-	-	-
Ethyl isovalerate	-	-	-
Ethyl propionate	-	-	-
Ethyl tiglate	-	-	-
Ethyl myristate	-	-	-
cis-3-Hexenylpropionate	-	-	-
cis-3-Hexenylisovalerate	-	-	-
cis-3-Hexenylbutyrate	0,01	-	0,01
<b>Οργανικά οξέα (Organics acids)</b>			
Ethane,1,2-diethoxy	-	0,09	-
2,3-Dimethyl-4-hydroxy	-	-	-
2-Propanol, 1-butoxy-	-	-	-
<b>Λοιπές ουσίες (Other substances)</b>			
Limonene	0,23	0,10	0,09
Disulfide	-	-	-
Disulfide,dimethyl	-	-	-
Phenylacetic acid	-	-	-
Acetic acid	-	-	-

**Πίνακας 3.5** Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup> της κάθε κορυφής) ανά κατηγορία, σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar).

<b>Air (εμβαδόν X 10<sup>-6</sup>)</b>
<b>Πτητικές ουσίες</b>
<b>Αλκοόλες (Alcohols)</b>
Butylalcohol
1-penten-3-ol
Isoamyl alcohol
Amyl alcohol
1-Hexanol
Cis-6-nonen-1-ol
1-octanol
2-ethyl-1-hexanol
Heptyl alcohol
1-butoxy-2-propanol
1-octen-3-ol
Nonanol
1-decanol
<b>Κετόνες (Ketones)</b>
2-pentanone
6-methyl-5-hepten-2-one
4-methyl-2-pentanone
Acetophenone
2-octanone
<b>Αλδεΐδες (Aldehydes)</b>
Hexenal
Heptanal
Trans-2-nonenal
Trans-2-heptenal
Trans-2-octenal

Octanal
Nonanal
2-decenal (E)
n-decanal
<b>Εστέρες (Esters)</b>
Isobutyl isobutyrate
<b>Αλκάνια (Alkanes)</b>
n-decane
n-undecane
n-dodecane
n-nonane
1-dodecene
n-tetradecane
Pentadecane
n-eicosane
1-undecene
n-hexadecane
n-octadecane
n-tetracosane

Στους παραπάνω πίνακες (3.2, 3.3, 3.4) παρουσιάζονται το σύνολο των 97 πτητικών ουσιών που παράχθηκαν από τα ενοφθαλμισμένα δείγματά μας. Οι ουσίες, κατηγοριοποιήθηκαν σε αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, οργανικά οξέα και λοιπές ουσίες. Πιο αναλυτικά για κάθε στέλεχος *Pseudomonas* sp. που ερευνήσαμε παρήχθησαν οι ακόλουθες πτητικές ουσίες ανά κατηγορία.

Για τον *Pseudomonas fluorescens* DF41TB παρήχθησαν:

- 17 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $6.43 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 11 αλδεΐδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $3.13 \cdot 10^6$  την ημέρα ενοφθαλμισμού των τριβλίων (Day 0),

- 12 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $5.54 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 4 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Ethyl acetate με εμβαδό  $0,76 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 1 οργανικό οξύ,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.35 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης

Για τον *Pseudomonas fragi* JCM 5396 παρήχθησαν:

- 13 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $9.57 \cdot 10^6$  την ημέρα ενοφθαλμισμού (Day 0),
- 9 αλδεΐδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $4.31 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα,
- 10 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $7.08 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 6 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Ethyl acetate με εμβαδό  $0,81 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.42 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης

Για τον *Pseudomonas fragi* JCM 5435 πήραμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 15 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $9.55 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 11 αλδεΐδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $9.16 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,

- 8 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $12.10 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 4 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Ethyl acetate με εμβαδό  $0,76 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 1 οργανικό οξύ,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.51 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης

Για τον *Pseudomonas fragi* MA07 πήραμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 16 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $13.93 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 12 αλδεΐδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $7.47 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 12 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $18.01 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 11 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Ethyl isobutyrate με εμβαδό  $1.21 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 2 οργανικά οξέα, με κυριότερο το Ethane,1,2-diethoxy με εμβαδό  $0.91 \cdot 10^6$ , την Day 0 του πειράματος,

Για τον *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 πήραμε τα ακόλουθα στοιχεία:

- 13 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $15.03 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 11 αλδεύδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $5.01 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 6 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $10.63 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 7 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Ethyl acetate με εμβαδό  $1.21 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 2 άλλες ουσίες, η μία εκ των οποίων ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.69 \cdot 10^6$ , τη Day 4 του πειράματος

Για τον *Pseudomonas vranovensis* πήραμε τα ακόλουθα στοιχεία:

- 12 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $12.44 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 6 αλδεύδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $2.79 \cdot 10^6$  τη Day 0 του πειράματος,
- 8 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $4.32 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 5 εστέρες, με κυριότερη την ουσία Hexyl formate με εμβαδό  $0.12 \cdot 10^6$ , τη Day 0 του πειράματος,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.41 \cdot 10^6$ , τη Day 0 του πειράματος

Για τον *Pseudomonas fluorescens* LMG παρήχθησαν:

- 17 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $12.44 \cdot 10^6$  την ημέρα ενοφθαλμισμού των τριβλίων (Day 0),

- 12 αλδεύδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $4.64 \cdot 10^6$  την ημέρα ενοφθαλμισμού των τριβλίων (Day 0),
- 6 κετόνες, με κυριότερη την ουσία Acetone με εμβαδό  $33.07 \cdot 10^6$ , την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 2 εστέρες, χωρίς κάποιος να έφτασε σε σημαντικά επίπεδα,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene, με εμβαδό  $0.61 \cdot 10^6$ , την Day 0 του πειράματος

Για τον *Pseudomonas migulae* πήραμε τα ακόλουθα στοιχεία:

- 12 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία Ethyl alcohol με εμβαδό  $14.36 \cdot 10^6$  την 4<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 14 αλδεύδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $5.31 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 5 κετόνες,
- 5 εστέρες, με κυριότερη την ουσία 3-Pentanone με εμβαδό  $3.56 \cdot 10^6$ , την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 1 οργανικό οξύ, που ήταν το Ethane,1,2-diethoxy με εμβαδό  $0.49 \cdot 10^6$ , τη Day 0 του πειράματος,
- 2 άλλες ουσίες

Τέλος στις συγκαλλιέργειες (Mix) συλλέξαμε τα ακόλουθα στοιχεία:

- 10 αλκοόλες με κυριότερη την ουσία 2-Ethyl-1-Hexanol με εμβαδό  $7.98 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 7 αλδεύδες με κυριότερη την ουσία Nonanal με εμβαδό  $2.53 \cdot 10^6$  την 1<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,
- 7 κετόνες, με σημαντικότερη αυτή της Acetone με εμβαδό  $4.42 \cdot 10^6$  την 2<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης,

- 3 εστέρες,
- 1 λοιπή ουσία, που ήταν η Limonene με εμβαδό  $0.23 \cdot 10^6$ , τη τη Day 0 του πειράματος.

### 3.3.2 Ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας

Ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας θεωρήθηκαν οι ουσίες που βρέθηκαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα και όχι στα μοντέλα μάρτυρες (Parlapani, F.F et al,2015b).

1) οι πτητικοί μεταβολίτες που παράχθηκαν **στους μάρτυρες** ήταν : Butylalcohol, 1-penten-3-ol, Isoamyl alcohol, Amyl alcohol, 1-Hexanol, Cis-6-nonen-1-ol, 1-octanol, 2-ethyl-1-hexanol, Heptyl alcohol, 1-butoxy-2-propanol, 1-octen-3-ol, nonanol, 1-decanol, 2-pentanone, 6-methyl-5-hepten-2-one, 4-methyl-2-pentanone, Acetophenone, 2-octanone, Hexenal, Heptanal, Trans-2-nonenal, Trans-2-heptenal, Trans-2-octenal, Octanal, Nonanal, 2-decenal (E), n-decanal, Isobutyl isobutyrate, n-decane, n-undecane, n-dodecane, n-nonane, 1-dodecene, n-tetradecane, pentadecane, n-eicosane, 1-undecene, n-hexadecane, n-octadecane, n-tetracosane (Πίν. 3.5).

2) Οι ουσίες που βρέθηκαν **στα ενοφθαλμισμένα στερεά υποστρώματα και όχι στους μάρτυρες**, άρα χαρακτηρίζονται και ως ουσίες μικροβιακής δραστηριότητας είναι οι 49 ακόλουθες: Acetone, Dimethyl sulfide, 2-methyl-1-Butanol, Ethyl-2methylbutyrate, 2-Heptanone, 3-octanone, Limonene, 2-Nonanone, 3,7-Dimethyl-1-octanol, Butyl butyrate, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, Nonanol, Ethyl alcohol, Ethane,1,2-diethoxy, Hexyl formate, Ethyl isovelerate, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Ethyl isobutyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, n-Valeraldehyde, 2-Methylbutyraldehyde, Ethyl acetate, 4-Methyl-3-penten-2-one, Octanol, Lauric alcohol, Isopropyl alcohol, 4-methyl-1-pentanol, 2-Hexanone, 2-Hexen-1-ol (trans), 4-Methylacetophenone, 2-Decanal, (E), cis-3-



Hexenylpropionate, 3-Methylbutyraldehyde, cis-3-Hexenylisovalerate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Acetaldehyde, Ethylalcohol, 4-Hexene-3-one, Ethyl propionate, 2,3-Dimethyl-4-hydroxy, Ethyl tiglate, Phenylacetic acid, 2-Pentenal.

Πιο αναλυτικά, η **Acetone**, **Limonene**, **3,7-Dimethyl-1-octanol**, **Nonanol**, **Ethyl alcohol**, **Isopropyl alcohol**, βρέθηκαν σε όλα στελέχη *Pseudomonas* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια (Mix). Η ουσία **Dimethyl sulfide** βρέθηκε σε κάποια στελέχη *Pseudomonas* τα οποία ήταν τα *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fluorescens* LMG. Η **2-methyl-1-Butanol** βρέθηκε σε κάποια στελέχη *Pseudomonas* τα οποία ήταν *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07 και *Pseudomonas migulae* P11. Η **Ethyl-2-methylbutyrate** εντοπίστηκε σε μόλις 2 από τα στελέχη τα οποία ήταν το *Pseudomonas fragi* MA07 και το *Pseudomonas vranovensis*. Η κετόνη **2-Heptanone** βρέθηκε στο στέλεχος *Pseudomonas vranovensis* καθώς επίσης και στην συγκαλλιέργεια (Mix).

Στη συνέχεια, η κετόνη **3-octanone** εντοπίστηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07 και *Pseudomonas fluorescens* LMG. Η ουσία Ο μεταβολίτης **2-Nonanone** βρέθηκε σε κάποια στελέχη *Pseudomonas* τα οποία ήταν τα *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas vranovensis*, καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix).

Ο εστέρας **Butyl butyrate** εντοπίστηκε στα στελέχη, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas migulae* P11. Η ουσία **3-Pentanone** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas*

*fragi MA07* και *Pseudomonas migulae P11*. Η κετόνη **3-octen-2-one** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi JCM 5396*, *Pseudomonas fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas Vranovensis*, *Pseudomonas fluorescens LMG*, *Pseudomonas migulae P11* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια (Mix).

Η **Ethane,1,2-diethoxy** εντοπίστηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fluorescens LMG*, *Pseudomonas migulae P11* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix). Η ουσία **Hexyl formate** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi JCM 5396*, *Pseudomonas fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas Vranovensis*, *Pseudomonas fluorescens LMG*, *Pseudomonas migulae P11* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix). Οι εστέρες **Ethyl isovalerate** και **Ethyl isobutyrate** εντοπίστηκαν μόνο στο στέλεχος *Pseudomonas fragi MA07*.

Η αλδεΰδη **Isobutyraldehyde** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi JCM 5396*, *Pseudomonas fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fragi MA07* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix). Η ουσία **Lauric aldehyde** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi JCM 5435*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435* και *Pseudomonas migulae P11*. Η ουσία **n-Butyl acetate** εντοπίστηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi JCM 5396*, *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas Vranovensis*, *Pseudomonas fluorescens LMG*, *Pseudomonas migulae P11* καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix). Οι ουσίες **n-Valeraldehyde** και **4-Methyl-3-penten-2-one** βρέθηκαν μόνο στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB* και *Pseudomonas fragi JCM 5396*. Ο πτητικός μεταβολίτης **2-Ethyl acetate**

βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi JCM 5396*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435* και *Pseudomonas migulae P11*. Η αλκοόλη **Octanol** βρέθηκε να παράγεται στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas fragi MA07* και *Pseudomonas fluorescens LMG*. Οι δύο εστέρες **cis-3-Henexyl propionate** και **cis-3-Hexenyl isovalerate** βρέθηκαν μόνο στα στελέχη *Pseudomonas fragi MA07* & *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*.

Η ουσία **3-Methylbutyraldehyde** (3-methyl-1-butanal) ανιχνεύθηκε σε όλες τις μονοκαλλιέργειες με τα στελέχη *Pseudomonas* εκτός από τις συγκαλλιέργειες (Mix). Επίσης, 2 εστέρες, οι ουσίες **Ethyl propionate** και **Ethyl tiglate** βρέθηκαν μόνο σε 2 στελέχη που ήταν ο *Pseudomonas fragi MA07* και ο *Pseudomonas migulae P11*. Η ουσία **Phenylacetic acid** βρέθηκε μονάχα στο στέλεχος *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*. Ο πτητικός μεταβολίτης **2,3-Dimethyl-4-hydroxy** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fluorescens LMG* και *Pseudomonas migulae P11*.

Η ουσία **Ethyl octanoate** βρέθηκε σε μόλις 2 στελέχη που ήταν ο *Pseudomonas fragi JCM 5435* και ο *Pseudomonas fragi MA07*. Η πτητική ουσία **4-Methylacetophenone** βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens DF41TB*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas vranovensis* και *Pseudomonas fluorescens LMG*. Οι αλδεύδες **2-Pentenal(E)** και **2-Decanal(E)** βρέθηκαν μόνο στα στελέχη *Pseudomonas fragi JCM 543* και *Pseudomonas fluorescens LMG*. Η ουσία **Lauric alcohol** παράχθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435* και *Pseudomonas fluorescens LMG*. Η ουσία **2-Methylbutyraldehyde** (2-methyl-1-butanal) βρέθηκε στα στελέχη *Pseudomonas fragi MA07*, *Pseudomonas putida/fragi JCM 5435*, *Pseudomonas fluorescens LMG* και *Pseudomonas migulae P11*. Δύο άλλες ουσίες, η **2-Hexanone** και η **4-methyl-1-**

**pentanol** βρέθηκαν στα στελέχη *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fluorescens* LMG όπως επίσης και στη συγκαλλιέργεια(Mix). Τέλος η τελευταία πτητική ουσία με μικροβιακή δραστηριότητα ήταν η **2-Hexen-1-ol(trans)**, η οποία βρέθηκε μόνο στο στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* DF41TB.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο και αποδεδειγμένο ότι τα στελέχη του είδους *Pseudomonas* spp. αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους ιχθύες που συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές αιτίες μικροβιακής αλλοίωσης στην τσιπούρα (Alasalvaret al., 2005, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou et al. 2002, Parlapani et al. 2015a, b).

Στη θερμοκρασία συντήρησης των 8°C, τα στελέχη *Pseudomonas* φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς γρηγορότερα σε σχέση με χαμηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης (Παρλαπάνη, 2013). Συγκεκριμένα, μετά το πέρας των 4<sup>ov</sup> ημερών συντήρησης τα στελέχη *Pseudomonas* έφταναν στο επίπεδο πληθυσμού το οποίο στο πραγματικό τρόφιμο αντιστοιχεί στο επίπεδο αλλοίωσης 7-9 log cfu/g (Koutsoumanis & Nychas 2000, Parlapani et al. 2014, 2015).

Η μελέτη των πτητικών ουσιών ‘φανέρωσε’ ότι πολλές από τις ουσίες που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων είναι πράγματι μικροβιακής προέλευσης και συγκεκριμένα πολλές από αυτές παράγονται από διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, το οποίο έχει αναμφισβήτητα τεκμηριωθεί ως Ειδικός Αλλοιωγόνος Μικροοργανισμός στα αλιευτικά προϊόντα.

Στην παρούσα μελέτη, η Ethyl acetate βρέθηκε να παράγεται από το στέλεχος *Pseudomonas fragi* strain JCM 5396. Στο παρελθόν, η συγκεκριμένη ουσία έχει

βρεθεί να συνδέεται με τη δράση στελεχών *Pseudomonas fragi* σε εμβολιασμένο στείρο υπόστρωμα γαρίδας, αποθηκευμένο στους 5°C (Chinivasagam et al., 1998).

Η ουσία Acetone βρέθηκε σε όλα τα ενοφθαλμισμένα μοντέλα (μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες). Η συγκεκριμένη πτητική ουσία έχει βρεθεί να παράγεται σε στείρο θρεπτικό υπόστρωμα γαρίδας αποθηκευμένο στους 4°C εξαιτίας της δράσης των στελεχών *Pseudoalteromonas* spp (Broekaert et al. 2013). Επιπρόσθετα, η ουσία αυτή βρέθηκε να σχετίζεται με τη μεταβολική δραστηριότητα των στελεχών *Pseudomonas fragi* σε στείρο υπόστρωμα σκορπομάνας (σαλούβαρδου) αποθηκευμένο στους 5°C, 15°C, 25°C (Miller et al., 1973b).

Άλλος ένας πτητικός μεταβολίτης μικροβιακής δραστηριότητας είναι η Acetaldehyde. Η συγκεκριμένη ουσία ανιχνεύθηκε μόνο σε ενοφθαλμισμένα τριβλία του στελέχους *Pseudomonas migulae* P11. Σε παλαιότερες αναφορές η συγκεκριμένη πτητική ουσία έχει βρεθεί να συνδέεται με τη δράση των στελεχών *Psychrobacter* spp, σε στείρα υποστρώματα γαρίδας σε συνθήκες κατάψυξης (Broekaert et al. 2013). Ο μεταβολίτης Dimethyl sulphide βρέθηκε στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα με στελέχη *Pseudomonas fragi* JCM 5435 και *Pseudomonas fluorescens* LMG. Η συγκεκριμένη πτητική ουσία έχει βρεθεί στο παρελθόν να έχει άμεση συσχέτιση με τη μεταβολική δραστηριότητα των στελεχών *Pseudomonas fragi* σε στείρο υπόστρωμα σκορπομάνας (σαλούβαρδου) αποθηκευμένο στους 5°C, 15°C, 25°C (Miller et al., 1973b). Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη ουσία έχει βρεθεί να σχετίζεται και με τη μικροβιακή δράση των στελεχών των *Shewanella putrefaciens*, σε στείρα υποστρώματα εκχυλίσματος γαρίδας κάτω από συνθήκες συντήρησης τους 5°C (Chinivasagam et al., 1998).

Η πτητική ουσία 2-Pentanone παράχθηκε στις μονοκαλλιέργειες από τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396,

*Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07 και *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435. Η ουσία αυτή βρέθηκε να σχετίζεται με τη μικροβιακή δραστηριότητα των στελεχών *Pseudoalteromonas spp.* σε στειρό υπόστρωμα γαρίδας σε συνθήκες κατάψυξης (Broekaert et al. 2013). Στη συνέχεια, άλλη μία πτητική ουσία μικροβιακής προέλευσης είναι η Isobutyraldehyde, η οποία βρέθηκε να έχει παραχθεί στα ενοφθαλμισμένα στερεά υποστρώματα των στελεχών *Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* MA07 καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια. Σε ήδη υπάρχουσες επιστημονικές αναφορές, η συγκεκριμένη ουσία έχει βρεθεί να παράγεται από τη δράση των *Photobacterium phosphoreum*, σε αποστειρωμένο μοντέλο υπόστρωμα σολωμού υπό θερμοκρασίες ψύξης (Macé et al. 2013a).

Η 2-Heptanone βρέθηκε να παράγεται στα στερεά υποστρώματα που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος *Pseudomonas vranovensis* αλλά και στην συγκαλλιέργεια. Η ίδια ουσία είχε παραχθεί σε φιλέτα τσιπούρας στους 0°C όπου τα *Pseudomonas* αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό (Parlapani et al., 2014). Επιπλέον, η συγκεκριμένη ουσία έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών σε ιχθύες όπως ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*), το σκουμπρί (*Scomber scombrus*) και ο τόνος του Ατλαντικού (*Merlangius merlangus*) (Duflos et al., 2006). Η ουσία αυτή έχει επιπλέον αναφερθεί να παράγεται σε αποστειρωμένα φιλέτο κρύοκαπνισμένου σολωμού, σε θερμοκρασία συντήρησης τους 6 °C υπό συνθήκες κενού (Joffraud et al. 2001).

Άλλες πτητικές ουσίες όπως η Ethyl isovalerate βρέθηκε να παράγεται στις μονοκαλλιέργειες από το στέλεχος *Pseudomonas fragi* MA07. Σε παλαιότερη έρευνα, η συγκεκριμένη ουσία είχε βρεθεί σε απεντερωμένο λαβράκι που είχε συντηρηθεί στους 2°C (Parlapani et al., 2015a, 2015c). Η 2-Hexanone βρέθηκε να παράγεται από

το στέλεχος *Pseudomonas fragi* strain JCM 5435, το *Pseudomonas fluorescens* LMG στις μονοκαλλιέργειες καθώς επίσης και στη συγκαλλιέργεια. Παλαιότερα, η ουσία αυτή βρέθηκε σε αποστειρωμένα φίλετα κρύοκαπνισμένου σολωμού, σε θερμοκρασία συντήρησης τους 6 °C υπό συνθήκες κενού (Joffraud et al. 2001). Επίσης, η πτητική ουσία στην οποία αναφερόμαστε είχε βρεθεί και σε ενοφθαλμισμένα υποστρώματα βρασμένων και αποφλοιωμένων γαρίδων σε συνθήκες συντήρησης 5 °C(Laurson et al., 2006).

Η ανίχνευση/προσδιορισμός των πτητικών ουσιών που παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas* τα οποία έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από αλλοιωμένα αλιευτικά προϊόντα (ως κυρίαρχοι) και η παρουσία αυτών των μεταβολιτών σε διάφορους ιχθύες τη στιγμή της οργανοληπτικής τους απόρριψης (όπως προκύπτει από την παραπάνω αναφερόμενη βιβλιογραφία) φανερώνει το δυναμικό και την ικανότητα που πιθανόν διαθέτουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί να προκαλέσουν αλλοίωση στο πραγματικό τρόφιμο/αλίευμα.

## **5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1)Τα συμπεράσματα που προέκυψαν για τη κινητική αύξησης από τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν

→Η αποθήκευση των ενοφθαλμισμένων μοντέλων στους 8°C έχει ως αποτέλεσμα την απευθείας αύξηση (εκθετική φάση) των μικροοργανισμών χωρίς να παρατηρηθεί φάση προσαρμογής (lag) εκτός της περίπτωσης του *Pseudomonas fluorescens* LMG.

→Το *Pseudomonas fluorescens* LMG και το *Pseudomonas fragi* strain:MA07 παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές  $y_{max}$

→Το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB και *Pseudomonas migulae* strain P11 παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές  $y_{max}$ .

→Το *Pseudomonas fragi* strain:JCM5396 και το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB παρουσίασαν τους μεγαλύτερους ειδικούς ρυθμούς αύξησης,

→Το *Pseudomonas vranovensis* τον μικρότερο ειδικό ρυθμό αύξησης σχέση με όλους τους υπόλοιπους υπό μελέτη μικροοργανισμούς

2)Η μελέτη των πτητικών ουσιών ‘φανέρωσε’ ότι πολλές από τις ουσίες που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων είναι πράγματι μικροβιακής προέλευσης και συγκεκριμένα πολλές από αυτές παράγονται από διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, το οποίο έχει αναμφισβήτητα τεκμηριωθεί ως Ειδικός αλλοιωγόνος μικροοργανισμός στα αλιευτικά προϊόντα.

→Οι ουσίες που βρέθηκαν να σχετίζονται μόνο με τη μικροβιακή δραστηριότητα (μεταβολίτες): Acetone, Dimethyl sulfide, 2-methyl-1-Butanol, Ethyl-2methylbutyrate, 2-Heptanone, 3-octanone, Limonene, 2-Nonanone, 3,7-Dimethyl-1-octanol, Butyl butyrate, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, Nonanol, Ethyl alcohol, Ethane,1,2-diethoxy, Hexyl formate, Ethyl isovelerate, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Ethyl isobutyrate, Methyl acetate, n-Butyl acetate, n-Valeraldehyde, 2-Methylbutyraldehyde, Ethyl acetate, 4-Methyl-3-penten-2-one, Octanol, Lauric alcohol, Isopropyl alcohol, 4-methyl-1-pentanol, 2-Hexanone, 2-Hexen-1-ol (trans), 4-Methylacetophenone,2-Decanal,(E), cis-3-Hexenylpropionate, 3-Methylbutyraldehyde, cis-3-Hexenylisovalerate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Acetaldehyde, Ethylalcohol, 4-Hexene-3-one, Ethyl propionate, 2,3-Dimethyl-4-hydroxy, Ethyl tiglate, Phenylacetic acid, 2-Pentenal.

→Η ανίχνευση/προσδιορισμός των πτητικών ουσιών που παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas* τα οποία έχουν απομονωθεί στο



παρελθόν από αλλοιωμένα αλιευτικά προϊόντα (ως κυρίαρχοι) και η παρουσία αυτών των μεταβολιτών σε διάφορους ιχθύες τη στιγμή της οργανοληπτικής τους απόρριψης φανερώνει το δυναμικό και την ικανότητα που πιθανόν διαθέτουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί να προκαλέσουν αλλοίωση στο πραγματικό τρόφιμο/αλίευμα.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alasalvar, C., Taylor, K.D.A. & Shahidi, F. (2005). Comparison of Volatiles of Cultured and Wild Sea Bream (*Sparus aurata*) during Storage in Ice by Dynamic Headspace Analysis/Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2616-2622

Baumann P., L. Baumann M. Mandel, R. Allen (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 110:402–429

Blickstad E., Molin G. (1984) Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T and two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology*, 57: 213-220

Boziaris, I.S., Kordila, A. & Neofitou, C. (2011). Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 887-895.

Boziaris, I.S., Stamatiou, A.P. & Nychas, G.-J.E. (2013). Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1184-1190.

Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F. & Vlaemynck, G. (2011). Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*, 28, 1162-1169

Broekaert, K., Nosedá, B., Heyndrickx, M., Vlaemynck, G. & Devlieghere, F. (2013). Volatile compounds associated with *Psychrobacter* spp. and *Pseudoalteromonas* spp., the dominant microbiota of brown shrimp (*Crangon crangon*) during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 487-493.

Chinivasagam, H.N., Bremner, H.A., Wood, A.F., & Nottingham, S.M. (1998). Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 45–55.

Christensen, H., Boye M., Poulsen L. K., Rasmussen O. F. (1994) Analysis of fluorescent pseudomonads based on 23S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2196–2199.

Chung, S.W.C. & Chan, B.T.P. (2002). Trimethylamine oxide, dimethylamine, trimethylamine and formaldehyde levels in main traded fish species in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2, 44–51.

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. (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. (1995a) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 319-333.

Dalgaard P. (1995b) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life of packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 305-318.

Drosinos, E. H. & Nychas, G.-J.E. (1997). Production of acetate and lactate in relation to glucose content during modified atmosphere storage of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) at 0.10C. *Food Research International*, 30, 711-717.

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, 323-330.

Drosinos, E.H., Lambropoulou, K., Mitre, E. & Nychas, G-J.E. (1997). Attributes of fresh gilt Seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at 0±1°C. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 569-575.

Duflos, G., Coin, V.M., Cornu, M., Antinelli, J.F., & Malle, P. (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/ gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 600–611.

Duflos, G., Theraulaz, L., Giordano, G., Mejean, V. & Malle P. (2010). Quantitative PCR Method for Evaluating Freshness of Whiting (*Merlangius merlangus*) and Plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Protection*, 73, 1344–1347.

Edirisinghe R. K.B., Graham A. J., Taylor S.J. (2007) Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction

and GC–MS and their relationship to fish quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1139–1147.

Gennari, M., and F. Dragotto (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.

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

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.

Gram, L., Trolle, G. & Huss, H. H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria on fish stored at high (20°C) and low (0°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

Haugen, J.E. (2006). The use of chemical sensor array technology, the electronic nose, for detection of boar taint. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48 (Suppl 1): S15.

Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774.

Iglesias J., Gallardo M.J., Medina I. (2010) Determination of carbonyl compounds in fish species samples with solid phase microextraction with on-fibre derivatization. *Food Chemistry*, 123: 771–778.

Jay J.M. (1996) Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43: S59-S66.

Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C. & Berdague, J.L. (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-181.

Jørgensen, B.R. & Huss, H.H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 51–62.

Koutsoumanis, K. & Nychas, G-J. E. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 698-706.

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.

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.P., Taoukis, P.S., Drosinos, E.H & Nychas, G.-J.E. (2000). Applicability of an Arrhenius Model for the Combined Effect of Temperature and CO<sub>2</sub> Packaging on the Spoilage Microflora of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3528–3534.

Kyranas 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.

Laursen, B.G., Leisner, J.J. & Dalgaard, P. (2006). Carnobacterium Species: Effect of Metabolic Activity and Interaction with *Brochothrix thermosphacta* on Sensory Characteristics of Modified Atmosphere Packed Shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3604-3611.

Leisner J.J., Gram L. (2000) Spoilage of fish. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D. (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego: Academic Press, pp. 813–820.

Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: Connell, J.J. and staff of Torry Research Station. (eds.), *Advances in fish science and technology*, pp 138-157, Fishing News Books, Farnham, Surrey, England

Lougovois V. P., Kyranas E. R., Kyranas V.R. (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36: 551–560.

Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Dousset, X. & Joffraud J.-J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiology*, 30, 164-172

Macé, S., Joffraud, J.-J., Cardinal, M., Malcheva, M., Cornet, J., Lalanne, V., Chevalier, F., Sérot, T., Pilet, M.-F. & Dousset, X. (2013a). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 227–238.

Miller, III, A., Scanlan, R.A., Lee, J.S., Libbey, L.M. (1973b). Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology*, 25, 952-955.

Molin G., Ternstrom A. (1986) Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 257–274.

Morita R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167.

Nychas, G.-J.E., Arkoudelos J.S. (1991) The influence of *Brochothrix thermosphacta* on the quality of minced meat. *Agricultural Research*, 15: 103-115

Olofsson T. C., Ahrne S., Molin G. (2007) The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1364-5072.

Parlapani F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E. & Boziaris, I.S. (2015a). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *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. (2015b). 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*, 95, 2386-2394

Shewan, J.M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Advances in Food Science*, 1, 167-193.



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, K.Ar. & 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 20°C. *Food Control*, 55, 257-265.

Rasolofo E.A., St-Gelais D., LaPointe G., Roy D. (2010) Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 108–118.

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, 2764-2771.

Schirmer B.C., Heir E., Langsrud S. (2009) Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 2106–2116

Soncin S., Chiesa M. L., Panseri S., Biondi P., Cantoni C. (2008) Determination of volatile compounds of precooked prawn (*Penaeus vannamei*) and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice as possible spoilage markers using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 436–442.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K. and Nychas G.-J.E. (1999a). Modelling of spoilage microflora of boque (*Boops boops*) as a basis for chilled distribution monitoring with

time-temperature indicators. In: Bourgeois C.M., Roberts T.A (Eds.) Predictive Microbiology Applied to Chilled Food Preservation (Proceedings of the International Symposium, Quimper, France. June 16-18, 1997). Refrigeration Science and Technology Proceedings, Series, International Institute of Refrigeration (IIR), Paris, France, pp. 316-325

Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G-J.E. (1999b) Use of Time Temperature Integrators and Predictive Modelling for Shelf Life Control of Chilled Fish under Dynamic Storage Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 53: 21-31.

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.

Ward D.R., Bai N.J. (1988) Factors affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technology*, 42: 85 – 93.

## 7.ABSTRACT

Microbial spoilage is the main quality degradation mechanism to fresh fish, as observed microbial growth and metabolite production by the Specific Spoilage Organisms (SSOs), which are responsible for the characteristic odors in food. The purpose of this Undergraduate thesis was to monitor changes in population, the assessment of the main kinetic parameters and the study of volatile metabolic products at 0°C with modern analytical methods (SPME / GC-MS), the main spoilage microorganisms of the genus *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* DF41TB, *Pseudomonas fluorescens* LMG, *Pseudomonas fragi* JCM 5435, *Pseudomonas fragi* JCM 5396, *Pseudomonas fragi* MA07, *Pseudomonas putida / fragi* JCM 5435, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae* P11).

At the end of storage, *Pseudomonas fluorescens* LMG found at higher population level (10.10 log cfu / g) than the rest microorganisms tested. *Pseudomonas fragi* MA07 and *Pseudomonas putida/fragi* JCM 5435 were found at final population levels of 9.21 and 9.06 log cfu / g respectively. The specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of *Pseudomonas fragi* JCM 5396 was the highest ( $\mu_{max}=1.96$ ) of all the other species / strains of *Pseudomonas*, whereas *Pseudomonas vranovensis*( $\mu_{max}=0.80$ ) showed the lowest.

The volatile compounds were detected in sea bream (*Sparus aurata*) models, showed various changes during storage. Volatiles are related with microbial activity found to be the following: Acetone, Dimethyl sulfide, 2-methyl-1-Butanol, Ethyl-2methylbutyrate, 2-Heptanone, 3-octanone, Limonene, 2-Nonanone, 3,7-Dimethyl-1-octanol, Butyl butyrate, 3-Pentanone, 5-Methyl-2,3-hexanedione, 3-Octen-2-one, Nonanol, Ethyl alcohol, Ethane,1,2-diethoxy, Hexyl formate, Ethyl isovelerate, Isobutyraldehyde, Lauric aldehyde, 2-Pentenal, Ethyl isobutyrate, Methyl acetate, n-

Butyl acetate, n-Valeraldehyde, 2-Methylbutyraldehyde, Ethyl acetate, 4-Methyl-3-penten-2-one, Octanol, Lauric alcohol, Isopropyl alcohol, 4-methyl-1-pentanol, 2-Hexanone, 2-Hexen-1-ol (trans), 4-Methylacetophenone, 2-Decanal, (E), cis-3-Hexenylpropionate, 3-Methylbutyraldehyde, cis-3-Hexenylisovalerate, Ethyl octanoate, Ethyl myristate, Acetaldehyde, Ethyl alcohol, 4-Hexene-3-one, Ethyl propionate, 2,3-Dimethyl-4-hydroxy, Ethyl tiglate, Phenylacetic acid, 2-Pentenal.