

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιακή αύξηση και ποιότητα γαρίδων (*Penaeus kerathurus*) κατά τη
συντήρηση σε ψύξη »**

Γεώργιος – Θεόφιλος Κωνσταντίνου Γάτος
Κτηνίατρος Α.Π.Θ.



Yoshihiro Okada, φλούδα πορτοκαλιού

Λάρισα, 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Ιωάννης Μποζιάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινής και συντήρησης Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- **Νικόλαος Σούλτος**, Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσης- Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ., **Μέλος**.
- **Λάμπρος Κοκοκύρης**, Καθηγητής Εφαρμογών, Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, **Μέλος**.

Αφιέρωσεις

Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στα δύο «Ε» της ζωής μου. Στην κόρη μου Ελένη και στην γυναίκα μου Ειρήνη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυριότερη αιτία υποβάθμισης της ποιότητας στα φρέσκα αλιεύματα είναι η μικροβιακή αλλοίωση. Ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας που φέρουν τα αλιεύματα, από το φυσικό τους περιβάλλον και από επιμόλυνση κατά τη διάρκεια των χειρισμών μετά την αλίευση, φτάνουν σε υψηλά επίπεδα πληθυσμού $> 6 \log \text{ cfu /g}$ και τα προϊόντα μεταβολισμού τους μεταβάλλουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παράγοντας δυσάρεστες οσμές με αποτέλεσμα την μείωση της εμπορικής τους αξίας και τελικά την απόρριψη των αλιευμάτων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν τους Ειδικούς Μικροοργανισμούς Αλλοίωσης (EMA). Επιπλέον στα καρκινοειδή, εκτός της βακτηριακής αλλοίωσης, η ενζυματική αμαύρωση και οι αυτολυτικές μεταβολές συνεισφέρουν σημαντικά στη ποιοτική τους υποβάθμιση.

Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός τους εμπορικού χρόνου ζωής των εμπορικών καρκινοειδών, του αρχικού μικροβιακού φορτίου των αλιευμάτων καθώς και της αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού αλλοίωσης κατά τη συντήρησή τους υπο ψύξη. Ως προϊόν μελετήθηκε η γαρίδα *Penaeus kerathurus*. Οι γαρίδες συντηρήθηκαν στους 0 και τους 5° C σε αερόβιες συνθήκες, και ο προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με κλασικές τεχνικές. Επίσης προσδιορίστηκαν και οι πτητικές ουσίες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς όπως το Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο (TVB-N) κατά τη διάρκεια συντήρησης των γαρίδων.

Τα *Pseudomonas spp.* φαίνεται πως αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα των EAM σε όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης. Τα βακτήρια που παράγουν H₂S (κυρίως *Shewanella putrefaciens*) αποτελούσαν μικρότερο ποσοστό των EAM καθώς και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Δεν διαπιστώθηκε παρουσία των βακτηρίων της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*.

Τελικά, ο εμπορικός χρόνος ζωής ήταν μεγαλύτερος στις γαρίδες που συντηρήθηκαν σε πάγο (0°C) σε σχέση με αυτές συντηρήθηκαν σε συνθήκες απλής ψύξης (5°C), και οι ημέρες διατήρησης ήταν 5 και 2 αντίστοιχα πριν κριθούν αλλοιωμένες και συνεπώς ακατάλληλες για εμπορία. Το μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης των γαρίδων δε φαίνεται να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα καρκινοειδή που αποθηκεύονται σε παρόμοιες συνθήκες με τη διαφορά πως η αλλοίωση στις γαρίδες ξεκινά σχεδόν από την

ώρα της αλίευσής του, ενώ σε άλλα καρκινοειδή (καραβίδες, αστακοί) ξεκινά αργότερα καθώς διατηρούνται ζωντανά για μεγαλύτερο διάστημα από την ώρα της αλίευσης.

Λέξεις κλειδιά: Ειδικοί Μικροοργανισμοί Αλλοίωσης (EMA), καρκινοειδή, γαρίδες, *Penaeus kerathurus*, εμπορικός χρόνος ζωής, αλλοίωση αλιευμάτων, αλλοίωση καρκινοειδών, ενζυματική μελάνωση, χημικοί δείκτες αλλοίωσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του ΠΘ στο Βόλο . Αντικείμενο μελέτης είναι ο προσδιορισμός του εμπορικού χρόνου ζωής, της αρχικής μικροβιολογικής κατάστασης καθώς και της μεταβολής της μικροβιακού πληθυσμού σε φρέσκες γαρίδες (*Penaeus kerathurus*) διατηρημένες στους 0 βαθμούς Κελσίου και στους 5 βαθμούς Κελσίου.

Η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής απαιτούσε τη βοήθεια και τη συμβολή ορισμένων ανθρώπων του οποίους εκτιμώ ιδιαίτερα και θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στα πρόσωπά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Αναπληρωτή καθηγητή κ. Ι. Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξη και το διδακτικό του έργο κατά τη διάρκεια των διαλέξεων του Π.Μ.Σ. καθώς και τον Καθηγητή κ Ν. Σούλτο και τον Επίκουρο Καθηγητή Λ. Κοκοκύρη για τις διορθώσεις τους στην μεταπτυχιακή μου εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΩΝ | 1 |
| ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΩΝ | 2 |
| ΑΛΙΕΥΣΗ ΓΑΡΙΔΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ | 3 |
| ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΑ | 6 |
| ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 8 |
| ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΩΝ | 9 |
| ΦΡΕΣΚΟΤΗΤΑ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ | 9 |
| ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ | 9 |
| <i>Αυτολυτικά φαινόμενα</i> | 9 |
| <i>Ενζυματική μελάνωση</i> | 10 |
| <i>Ειδικοί Μικροοργανισμοί Αλλοίωσης</i> | 10 |
| <i>Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα</i> | 15 |
| ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΝΩΠΩΝ ΑΛΙΕΥΜΑΤΩΝ | 16 |
| <i>Οργανοληπτική ανάλυση</i> | 16 |
| <i>Φυσικές και μηχανικές μέθοδοι</i> | 20 |
| <i>Μικροβιολογικές μέθοδοι</i> | 21 |
| <i>Χημικές μέθοδοι</i> | 22 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 23 |
| ΓΕΝΙΚΑ | 23 |
| ΠΡΟΜΗΘΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΑΡΙΔΩΝ | 23 |
| ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ | 24 |
| <i>Οργανοληπτική ανάλυση</i> | 24 |
| <i>Μέτρηση pH</i> | 25 |
| <i>Μικροβιολογικές αναλύσεις</i> | 25 |
| <i>Χημική Ανάλυση</i> | 31 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 32 |
| ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΑΠΟΡΡΙΨΗΣ | 32 |
| ΜΕΤΡΗΣΗ PH | 32 |
| ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ | 33 |
| ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ | 36 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 37 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 42 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 43 |
| ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 43 |
| ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 47 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 49 |
| ABSTRACT | 51 |

Κατάλογος πινάκων.

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1. Θερμοκρασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών. (προσαρμογή από Λαφτσίδα, 2015) .. | 14 |
| Πίνακας 2. Κατηγορίες φρεσκότητας γαρίδας σύμφωνα με την κλίμακα Torry (προσαρμογή από Archer, 2010)..... | 17 |
| Πίνακας 3. Κριτήρια φρεσκότητας γαρίδας. (Προσαρμογή από Καν.(ΕΕ) 2406/96) | 18 |
| Πίνακας 4. Συστατικά TSA. | 28 |
| Πίνακας 5. Συστατικά Iron Agar | 28 |
| Πίνακας 6. Συστατικά MRS Agar..... | 29 |
| Πίνακας 7. Συστατικά CFC Agar..... | 30 |
| Πίνακας 8. Συστατικά VRBGA. | 30 |
| Πίνακας 9. Κατηγορία ποιότητας των γαρίδων ανά ημέρα και θερμοκρασία συντήρησης: Εξαιρετικό (E), A, Απορριπτόμενο (Απορ.)..... | 32 |
| Πίνακας 10. Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, σε TSA, την ημέρα 0 και τις αντίστοιχες ημέρες απόρριψης στους 0 και τους 5° C. Οι τιμές είναι σε log cfu /g (± τυπική απόκλιση)..... | 34 |
| Πίνακας 11. Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. n = 2 x 2 = 4 επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση) κατά τη συντήρηση των γαρίδων στους 0 και 5° C. (*: ημέρα απόρριψης) | 36 |

Κατάλογος σχημάτων.

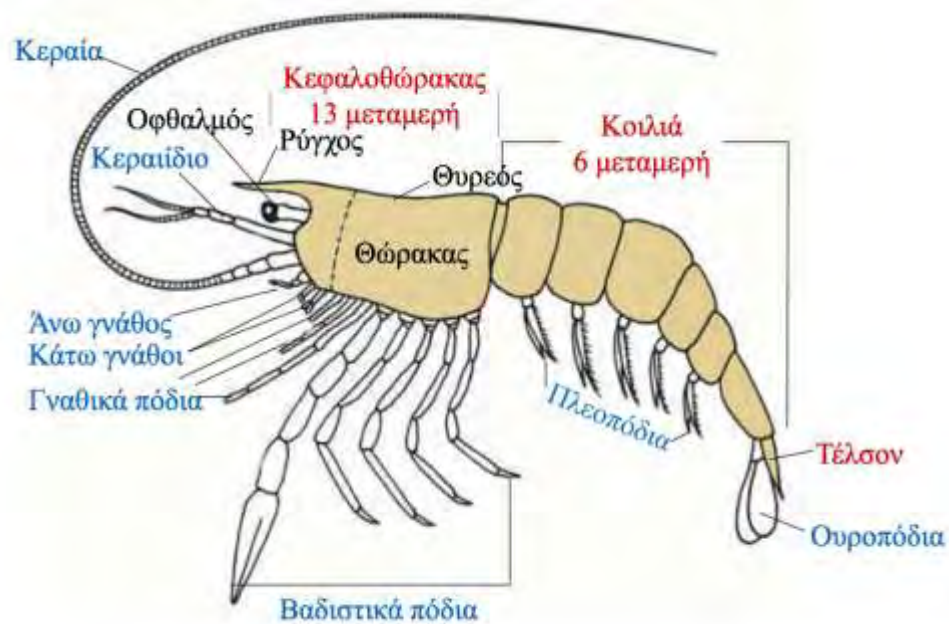
| | |
|---|----|
| Σχήμα 1. Παγκόσμια αλιευμένη παραγωγή Καρκινοειδών και γαρίδων (FAO)..... | 3 |
| Σχήμα 2. Παραγωγή της <i>P. kerathurus</i> στην Ελλάδα (τόννοι). (FAO)..... | 6 |
| Σχήμα 3 . Μεταβολή του pH της σάρκας της γαρίδας κατά τη συντήρηση στους 0 και 5° C | 33 |
| Σχήμα 4. Πληθυσμιακές μεταβολές των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες στους 0° C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπαρές σφάλματος αναπαριστούν την τυπική απόκλιση. | 35 |
| Σχήμα 5. Πληθυσμιακές μεταβολές των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες στους 5° C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπαρές σφάλματος αναπαριστούν την τυπική απόκλιση. | 36 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιγραφή μορφολογία καρκινοειδών

Τα καρκινοειδή (*Crustacea*) είναι υδρόβια αρθρόποδα με βραγχιακή αναπνοή (με εξαίρεση ορισμένα είδη της τάξης των Ισόποδων καθώς και ορισμένα μικρά καρκινοειδή π.χ. κοπήποδα, στα οποία η αναπνοή είναι δερμική). Τα πρώτα καρκινοειδή εμφανίστηκαν στην αρχή του Παλαιοζωικού αιώνα (Κάμβριο, 545-550 εκατομμύρια χρόνια πριν). Σήμερα είναι γνωστά περίπου 52.000 είδη καρκινοειδών (Land, 1996· Monod & Laubier 1996). Τα είδη που υπάρχουν σήμερα είναι αποτέλεσμα πολλών εκατομμυρίων ετών εξέλιξης, άφθονος χρόνος για πειραματισμό σε μορφές και λειτουργίες. Έτσι η μορφολογική διαφοροποίηση είναι μεγαλύτερη στα καρκινοειδή σε σχέση με άλλα υποφύλα των αρθρόποδων (Martin W.J., 2001).

Η συμμετοχή τους στη σύνθεση του πλαγκτού και του νηκτού είναι έντονη ενώ παράλληλα συνιστούν ένα μεγάλο ποσοστό των βενθικών οργανισμών. Η ευρεία εξάπλωση των καρκινοειδών στο νερό και ο σημαντικός οικολογικός τους ρόλος για την ισορροπία των υδάτινων οικοσυστημάτων (συμμετοχή σε τροφικές αλυσίδες, τροφικά πλέγματα) είναι χαρακτηριστικά ανάλογα με αυτά των εντόμων για τα χερσαία οικοσυστήματα. Σημαντική είναι επίσης και η άμεση οικονομική τους αξία για τον άνθρωπο. Τα περισσότερα καρκινοειδή ζουν ελεύθερα, πολλά όμως είναι προσκολλημένα και αρκετά ζουν ως παράσιτα ή ξενιστές παρασίτων. Στην πλειοψηφία τους τα καρκινοειδή είναι γονοχωριστικά είδη, εκτός κάποια που είναι ερμαφρόδιτα ή εμφανίζουν υπολειμματικό ερμαφροδιτισμό. Το σώμα των καρκινοειδών παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία και εξωτερικά εμφανίζει μεταμέρεια, χαρακτηριστικά που εκδηλώνονται με την έκφυση από το σώμα εξαρτημάτων (π.χ. ποδιών, κεραιών κ.ά.) σε ζεύγη και την ύπαρξη ενός σκληρού περιβλήματος (όστρακο) που διαιρείται σε τμήματα (μεταμερίδια). Χαρακτηριστική είναι για όλα τα καρκινοειδή η διχλωτή κατασκευή των εξαρτημάτων (εξαρτήματα με σχήμα Y). Στο σώμα των περισσότερων καρκινοειδών διακρίνονται η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλιά. Σε αρκετά όμως καρκινοειδή, όπως η караβίδα κ.ά., η κεφαλή και ο θώρακας σχηματίζουν έναν ενιαίο κεφαλοθώρακα (Εικόνα 1).



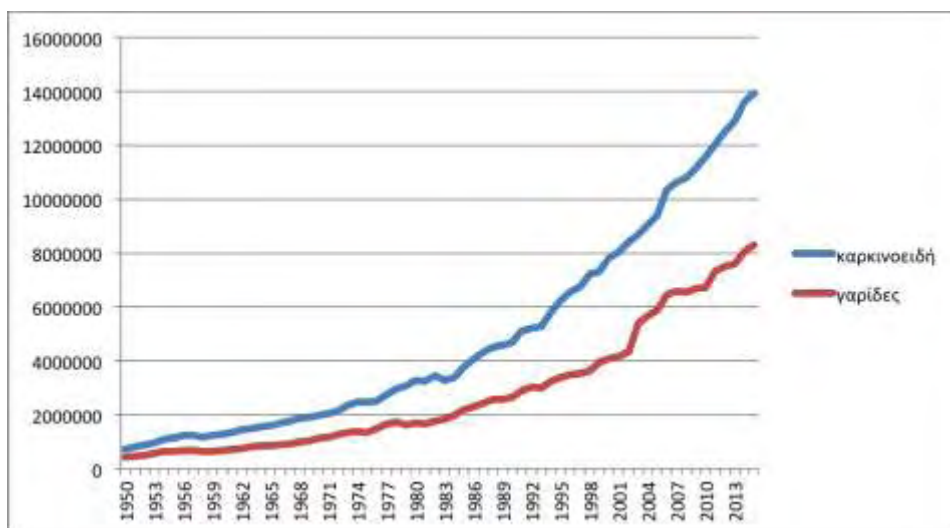
Εικόνα 1. Εξωτερική Ανατομία Μαλακόστρακων Καρκινοειδών (Hickman et al. 2002)

Οικονομική Σημασία των Καρκινοειδών

Τα καρκινοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή και συνεπώς έχουν σημαντική θέση στην παγκόσμια αλιεία. Είναι μια πηγή πλούσια σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, λόγω της μεγάλης τους περιεκτικότητας στα απαραίτητα αμινοξέα με αξιόλογες ποσότητες ανόργανων στοιχείων και ορισμένων βιταμινών. Περιέχουν μικρό ποσοστό σε λίπη και υδατάνθρακες, έχουν χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο και αποτελούν ιδανική πηγή πρωτεϊνών για τους καταναλωτές που αναζητούν λίγες θερμίδες και λιπαρά στη διατροφή τους. Είναι πηγή πλούσια σε Ω-3 λιπαρά οξέα, βιταμίνες, όπως η νιασίνη και η Β-12, και στοιχεία όπως ο φώσφορος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και ασβέστιο.

Επίσης, τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας επεξεργασίας των καρκινοειδών αξιοποιούνται και μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή για παραγωγή χιτίνης, χιτοζάνης, καροτενοειδών, (Shahidi F.,1991) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων χάρη στην αντιμικροβιακή τους δράση, ως γαλακτωματοποιητές, εδωδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες ή και φυσικά συντηρητικά τροφίμων (Boziaris I., 2014) αλλά και στην ιατρική και τη γεωργία.

Το 2015 η αλιευμένη παραγωγή των καρκινοειδών άγγιξε τους 14 εκατομμύρια τόννους, περίπου το 7% των βιολογικών πόρων των ωκεανών σε παγκόσμια κλίμακα. Στη συγκεκριμένη εργασία θα μελετηθεί μόνο η γαρίδα. Η ονομασία περιγράφει διάφορα είδη της τάξης των δεκάποδων σε παγκόσμια κλίμακα. Περίπου το 60% των γαρίδων που καταναλώνονται παγκόσμια είναι αλιευμένο και το υπόλοιπο είναι εκτρεφόμενο. Η εκτρεφόμενες γαρίδες προέρχονται από 50 περίπου χώρες ανά τον κόσμο, κυρίως αναπτυσσόμενες (Kanduri-Eckhardt, 2002). Οι γαρίδες αποτελούν το 60% της παγκόσμιας αλιευμένης παραγωγής των καρκινοειδών, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει καβούρια, αστακούς, караβίδες και πλαγκτικά καρκινοειδή.

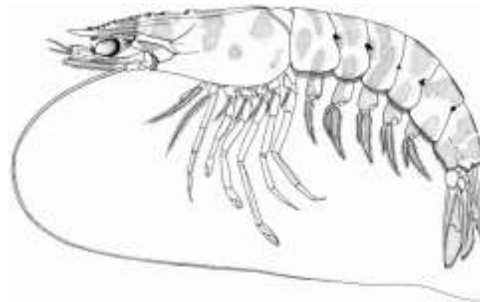


Σχήμα 1. Παγκόσμια αλιευμένη παραγωγή Καρκινοειδών και γαρίδων (FAO)

Αλίευση γαρίδας στην Ελλάδα

Στο Αιγαίο υπάρχουν 80 περίπου είδη γαρίδας (ΚΟΥΚΟΥΡΑΣ et al., 1992), από τα οποία μόνο δύο είναι αυτά που αλιεύονται σε σημαντικές ποσότητες ώστε να διατίθενται στην Ελληνική αγορά. Είναι τα είδη *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) και *Penaeus kerathurus* (Forsskal, 1775). Η αλίευσή τους γίνεται με παραδοσιακές μηχανότρατες. Άλλα είδη πιθανόν μεν να υπάρχουν σε σημαντικά αποθέματα, αλλά να μην είναι εκμεταλλεύσιμα κυρίως λόγω του ανεπαρκούς εξοπλισμού των τρατών για αλίευση σε μεγάλα βάθη και της ελλιπούς γνώσης των ενδιαιτημάτων και των μετακινήσεων αυτών των ειδών (Κούκουρας et al, 1997).

Το είδος *Parapeneaus longirostris* (Lucas, 1846), (deep-water rose shrimp) γάμπαρη (ΦΕΚ Β 1035 / 2003), γαριδάκι, κόκκινη γαρίδα ή ροζ γαρίδα των βαθιών νερών, (εικόνα 1) απαντάται στον Δυτικό Ατλαντικό από τις Η.Π.Α μέχρι τη Γαλλική Γουιάνα, στον Ανατολικό Ατλαντικό από την Πορτογαλία μέχρι την Ανγκόλα και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο. Στην εικ. 2 φαίνεται η κατανομή στην περιοχή της Ελλάδας. Ζει σε ιλυώδη και αμμοίλυδη πυθμένα συνήθως σε βάθη μεταξύ 70 και 400 μέτρων, ενώ απαντάται από 20 έως 700 μέτρα. Το αρσενικό είναι συνήθως 8-14 εκ. και το θηλυκό 12-16 εκ, ενώ μπορούν να φτάσουν μέχρι τα 16 εκ. και 19 εκ αντίστοιχα. (FAO, Κούκουρας et al., 1997).

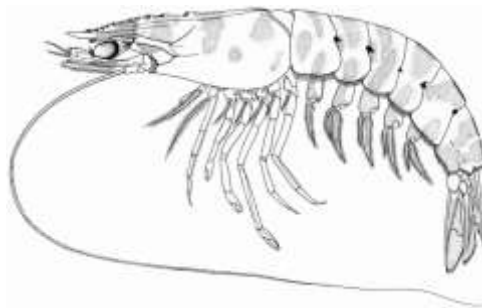


Εικόνα 2. *Parapeneaus Longirostris* (FAO)



Εικόνα 3. Διανομή της γαρίδας *P. longirostris* στον Ελλαδικό χώρο. (FAO)

Το είδος *Penaeus kerathurus* (Forsskal, 1775), (caramote prawn) Γαρίδα (ΦΕΚ Β 1035 / 2003), μαύρη γαρίδα (εικ. 3), απαντάται στον Ανατολικό Ατλαντικό από τις νότιες ακτές της Αγγλίας μέχρι την Ανγκόλα και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο. Στην εικόνα 4 φαίνεται η κατανομή στην περιοχή της Ελλάδας. Ζει σε αμμοϊλυώδες υπόστρωμα σε θαλάσσια οικοσυστήματα και σε εκβολές ποταμών, σε βάθη από 5 έως 40μ, ενώ μπορεί να φτάσει και το βάθος των 90 μ. Το μήκος κυμαίνεται από 13-17 εκ. το θηλυκό και 8-14 εκ. το αρσενικό, και μπορεί να φτάσουν μέχρι τα 22,5 εκ. και 18 εκ. αντίστοιχα. Αλιεύεται με γρίπους και κιούρτους, πλέον της τράτας, και προτιμάται λόγω του μεγάλου μεγέθους και της εξαιρετικής γεύσης (FAO, Κούκουρας et al., 1997).

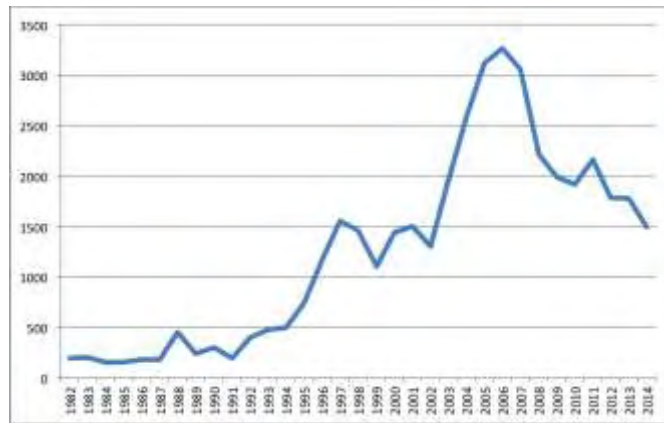


Εικόνα 4. *Penaeus kerathurus* (FAO)



Εικόνα 5. Διανομή της *P. kerathurus* στον Ελλαδικό χώρο. (FAO)

Το δείγμα στο οποίο μελετήθηκε ανήκει στο είδος *Penaeus kerathurus* (Forsskal, 1775) και αλιεύθηκε στο Αιγαίο πέλαγος, ανοιχτά της Χαλκιδικής. Η αλιευμένη παραγωγή του *P. kerathurus* στον Ελλαδικό χώρο έφτασε τους 1.492 τ. το 2014, ενώ ακολουθεί πτωτική πορεία μετά το 2006 που είχε αγγίξει τους 3.263 τ., όπως φαίνεται και στο σχήμα 2 (FAO).



Σχήμα 2. Παραγωγή της *P. kerathurus* στην Ελλάδα (τόνοι). (FAO)

Ασφάλεια τροφίμων και μικροοργανισμοί στα αλιεύματα

Ο όρος μικροβιακή αλλοίωση (microbial spoilage) περιλαμβάνει κάθε μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου σε βαθμό που να καθίσταται μη αποδεκτό. Η μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων είναι θέμα παγκόσμιου ενδιαφέροντος αφού το 25% όλων των εδωδιμων προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα χάνεται εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας (Baird-Parker, 2000). Τα βακτήρια αποτελούν την κυριότερη πηγή μόλυνσης και αλλοίωσης των τροφίμων. Υπερέχουν έναντι των άλλων μικροοργανισμών εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας των διαφόρων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις σε pH, θρεπτικά συστατικά, θερμοκρασία. Επίσης έχουν τη δυνατότητα αναερόβιας ανάπτυξης, εκκρίνουν τοξίνες και μπορούν να σχηματίσουν ενδοσπόρια. Ο όγκος και η σύνθεση της μικροχλωρίδας επηρεάζονται από την θερμοκρασία της θάλασσας, την εποχή, τις συνθήκες υγιεινής κατά την αλίευση, την μεταφορά και τυχόν επεξεργασία τους, καθώς και από τη διάρκεια και το είδος της ψύξης κατά τη συντήρηση. Οι τροφές γενικότερα, μπορούν να χαρακτηριστούν ως

«δυναμικά συστήματα» στα οποία οι αλλαγές που υφίστανται εμφανίζονται στο pH, στην διατροφική τους σύσταση και στη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται σ' αυτά με τον καιρό. Κάθε προϊόν έχει τη δική του ξεχωριστή μικροχλωρίδα και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τους αυτή αλλάζει εξαιτίας των διαφορετικών ικανοτήτων που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί προκειμένου να ανεχτούν τη συντήρηση (Gram & Dalgaard, 2002). Το ελάχιστο και το μέγιστο pH για την ανάπτυξη των βακτηρίων είναι 4,5 και 9 αντίστοιχα, ενώ το ιδανικό είναι 6-8 (Νυχάς Γ.Ι.). Έτσι, παρότι η κύρια χημική σύνθεση των αλιευμάτων αλλά και ο τρόπος αλλοίωσης μοιάζει με τα αντίστοιχα του κρέατος, τα αλιεύματα είναι περισσότερο ευπαθή και αποτελούν καλύτερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών λόγω του αυξημένου σχετικά pH και του χαμηλότερου επίπεδου γλυκόζης.

Ενώ η μικροβιακή αλλοίωση των φρέσκων και συντηρημένων ψαριών είναι εκτενώς μελετημένη, η γνώση για την αλλοίωση των λοιπών θαλασσινών προϊόντων όπως τα οστρακόδερμα ή τα καρκινοειδή είναι ελλιπής. Έχει διαπιστωθεί πως η αλλοίωση πιθανώς να προκαλείται από οξυγαλακτικά βακτήρια, συγκεκριμένα ψυχρότροφα εντεροβακτήρια και/ή τον μικροοργανισμό *Photobacterium phoshoreum*, ενώ τα γένη *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Serratia* και *Flavobacterium* έχουν βρεθεί σε αλλοιωμένα στρείδια (Manousaridis et al., 2005).

Τα αλιεύματα είναι ιδιαίτερα ευάλωτα τρόφιμα που επιβάλλεται να ψύχονται αμέσως μετά την αλίευσή τους και να παραμένουν σε αυτήν την κατάσταση μέχρις ότου καταναλωθούν ή επεξεργαστούν περαιτέρω. Αλλοιώνονται ταχύτατα σε θερμοκρασίες 15-20° C. Η διάρκεια διατήρησης αυξάνεται πέντε ή και έξι φορές αν η θερμοκρασία μειωθεί από τους 10° C στους 0° C, και διπλασιάζεται σε μείωση θερμοκρασίας από τους 3° C στους 0° C (Μπλούκας Ι., 2004). Οι φρέσκες γαρίδες θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία μεταξύ 0 και 4° C (FAO). Η ψύξη με πάγο εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα, τόσο μετά την αλίευση στο αλιευτικό σκάφος, όσο και για τη διατήρηση μέχρι την κατανάλωση. Η θερμοκρασία του πάγου κυμαίνεται από -5° έως -0,5° C. Θα πρέπει να σημειωθεί πως υπάρχουν τρεις βασικοί παράγοντες για την επιτυχή συντήρηση των αλιευμάτων στον πάγο: α/ Ο βαθμός τεμαχισμού του πάγου, β/ η διανομή του πάγου γύρω από τα αλιεύματα και γ/ η αναλογία πάγου-αλιευμάτων. Ιδανικά, ο πάγος ερχόμενος σε επαφή με τα αλιεύματα θα πρέπει να τήκεται ώστε να εξασφαλίζονται άριστες θερμικές ανταλλαγές και η ψύξη να είναι ταχεία. Επίσης, τα

νερά της τήξης του πάγου απομακρύνουν τις ξένες ύλες και τα μικρόβια που υπάρχουν στη εξωτερική επιφάνεια των αλιευμάτων, τα οποία διατηρούνται υγρά, τα χρώματα διατηρούν τη ζωντάνια τους και το προϊόν διατηρείται φρέσκο.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε πάγο ή ψυχρή άλμη, παρατηρούνται αλλαγές στη μικροχλωρίδα. Ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σύνθεση της μικροχλωρίδας είναι η θερμοκρασία. Συνήθως τα βακτήρια από τα εύκρατα κλίματα είναι κυρίως ψυχρότροφα, όπου η θερμοκρασία του κυρίως υδάτινου όγκου είναι έως 10° C. Ωστόσο η θερμοκρασία στην επιφάνεια της θάλασσας αυξάνεται κατά τη θερμή περίοδο του έτους με αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των μεσόφιλων βακτηρίων. Και οι δύο παραπάνω κατηγορίες βακτηρίων αναπτύσσονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20-35° C, ενώ η αλλοίωση λαμβάνει χώρα σε 1 – 2 μέρες σε θερμοκρασία άνω των 15° C. Η μικροβιακή δραστηριότητα μπορεί να περιοριστεί με χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (ψυχρή αποθήκευση). Το πλεονέκτημα της ψυχρής αποθήκευσης είναι η παράταση της παραμονής των τροφίμων σε καλή κατάσταση λόγω της μείωσης του ρυθμού αλλοίωσής των. Με την ψυχρή αποθήκευση δεν βελτιώνεται η ποιότητα του προϊόντος και δεν μπορεί να σταματήσει η αλλοίωσή του μπορεί όμως να καθυστερήσει σημαντικά (Λαφτσίδης, 2015).

Στόχοι της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός του εμπορικού χρόνου ζωής, της αρχικής μικροβιολογικής κατάστασης καθώς και της μεταβολής της μικροβιακού πληθυσμού σε φρέσκες γαρίδες (*Penaeus kerathurus*) διατηρημένες τόσο σε πάγο (0 βαθμοί κελσίου) όσο και στο οικιακό ψυγείο (5 βαθμοί κελσίου). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναμένεται να αξιοποιηθούν από κλάδους που ασχολούνται με την ποιότητα των νωπών αλιευμάτων, όπως ιχθυοκαλλιέργειες ή βιομηχανίες επεξεργασίας και μεταποίησης αλιευμάτων.

Ποιοτική αξιολόγηση καρκινοειδών

Φρεσκότητα αλιευμάτων

Η φρεσκότητα των αλιευμάτων μπορεί να οριστεί ως το πρόσφατα αλιευμένο προϊόν της θάλασσας. Υπάρχει σημαντικός όγκος βιβλιογραφίας για τον προσδιορισμό και τη μέτρηση της φρεσκότητας, ωστόσο δεν υπάρχει συνάφεια ως προς τον ορισμό της φρεσκότητας, ακόμη και για το αν και πώς μπορεί να μετρηθεί.

Η φρεσκότητα των αλιευμάτων εκτιμάται με χρήση οργανοληπτικών, βιοχημικών, μικροβιολογικών και χημικών μεθόδων (Olafsdottir et al, 1997). Τα αλιεύματα δεν διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ανάλογα με το προϊόν και τις συνθήκες διατήρησής του, υποβαθμίζεται ποιοτικά ή αλλοιώνεται. Ο ενδεικτικός χρόνος διατήρησης των νωπών αλιευμάτων είναι μόλις μία ή δύο ημέρες (Λαφτσίδης, 2015). Οι γαρίδες και τα μαλακόστρακα γενικότερα αλλοιώνονται ταχύτερα από τα ψάρια για διάφορους λόγους. Αρχικά είναι μικρότερα σε μέγεθος, τα μικρά ψάρια αλλοιώνονται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Επίσης, εκτός από τη μικροβιακή δραστηριότητα, η αλλοίωση οφείλεται και σε ενζυματικές και μη ενζυματικές αιτίες.

Ποιοτική υποβάθμιση

Αυτολυτικά φαινόμενα

Οι μη επιθυμητές μεταβολές μπορούν να προκληθούν από ενζυμική δραστηριότητα, αφυδάτωση, διάφορες χημικές αντιδράσεις (μη ενζυμική αμαύρωση, οξείδωση, υδρόλυση) που δεν καταλύονται από ένζυμα, επιμόλυνση και μηχανικά αίτια – πχ. χτυπήματα (Harbell 1988, Λαφτσίδης 2015). Στα καρκινοειδή, επειδή δεν αφαιρούνται τα εντόσθια αμέσως μετά την αλίευση, και ειδικότερα στις γαρίδες που πεθαίνουν σχεδόν αμέσως μετά την αλίευση, οι μεταθανάτιες αυτολυτικές μεταβολές συμβαίνουν ταχύτερα. Η ποιοτική υποβάθμιση στις γαρίδες μπορεί να σχετίζεται επίσης με διάφορα ένζυμα στη σάρκα αλλά και στον κεφαλοθώρακα. Οι πρωτεάσες γενικά επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα μετά την αλίευση προκαλώντας την υδρόλυση των πρωτεϊνών

του μυϊκού ιστού κατά την συντήρηση και την επεξεργασία (Jiang et al., 1991). Μεταξύ των πρωτεολυτικών ενζύμων, η κολλαγενάση επιδρά στο μαλάκωμα του μυϊκού ιστού (Brauer et al., 2003).

Ενζυματική μελάνωση

Η ενζυματική αμαύρωση ή μελάνωση είναι αντίδραση που περιλαμβάνει δυο στάδια. Αρχικά είναι το ενζυμικό στάδιο στο οποίο είναι δεδομένη η συμμετοχή του χαλκού και έπειτα το χημικό στάδιο όπου είναι απαραίτητη η παρουσία αέρα. Το ένζυμο που εμπλέκεται στο πρώτο στάδιο είναι η πολυφαινολοξειδάση που απαντάται, εκτός από τις γαρίδες, σε άλλα ζώα (και στον άνθρωπο), σε φυτά και σε μύκητες. Η πολυφαινολοξειδάση καταλύει μια σειρά αντιδράσεων όπου από μονοφαινόλες τελικά παράγονται κινόνες. Στη συνέχεια οι κινόνες που παράγονται ως χημικά ασταθείς ενώσεις, παρουσία οξυγόνου, υφίστανται χημική πλέον οξείδωση και πολυμερισμό προς κόκκινα ή καφέ-κόκκινα πολυμερή και τελικά προς μαύρες μελανίνες (Τσακαλίδου, 2015).

Στις γαρίδες η ενζυματική μελάνωση ξεκινά από τον κεφαλοθώρακα, συνήθως 2 – 4 μέρες από την αλίευση και επεκτείνεται στην κοιλιά, στα πλεοπόδια και την ουρά κατά τη συντήρηση σε πάγο. Δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου, ωστόσο είναι ανεπιθύμητη καθώς υποβαθμίζει ποιοτικά το προϊόν που χάνει την εμπορική του αξία. Η ψύξη δεν εμποδίζει το φαινόμενο, αλλά το καθυστερεί απλά καθώς τα ένζυμα παραμένουν ενεργά κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ψύξη, σε πάγο, αλλά και μετά την απόψυξη.

Ειδικοί Μικροοργανισμοί Αλλοίωσης

Η μικροβιολογία των αλιευμάτων που αλλοιώνονται αποτελεί θέμα μελέτης από τους επιστήμονες και τη βιομηχανία για δεκαετίες. Πρόκειται για διάφορα είδη βακτηρίων, ωστόσο ορισμένα από αυτά είναι που έχουν την εντονότερη δραστηριότητα στην αλλοίωση των θαλασσινών. Η δράση των βακτηρίων αυτών αποτελεί τον

σημαντικότερο παράγοντα που επιδρά στην αλλοίωση των νωπών αλιευμάτων. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα είναι κυρίως αυτοί της αρχικής μικροχλωρίδας του τροφίμου και αυτοί οι οποίοι προέρχονται από επιμόλυνση και περιγράφονται ως Ειδικοί Μικροοργανισμοί Αλλοίωσης (EMA – Specific Spoilage Organisms: SSO) (Huss, 2000).

Τα φρέσκα ψάρια και τα θαλασσινά είναι εξαιρετικά ευπαθή συγκρινόμενα με άλλα προϊόντα φρέσκου κρέατος. Η ποιότητά τους μειώνεται ραγδαία εξαιτίας της ταυτόχρονης δράσης πολλών μικροοργανισμών που τα οδηγούν στην τελική αλλοίωσή τους (Gram & Huss, 1996). Η δραστηριότητα των μικροοργανισμών είναι η κύρια αιτία αλλοίωσης των αλιευμάτων. Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού (Total Viable Count) – καθώς και η μέτρηση των συγκεκριμένων ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης – χρησιμοποιούνται ως «δείκτες» που προσδιορίζουν το βαθμό αποδοχής τους (Olafsdottir et al., 1997). Οι μικροβιακές μέθοδοι μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες που αφορούν στην ποιότητα των αλιευτικών προϊόντων. Καλά αποτελέσματα έχουν προέλθει από τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης μικροβίων όπως η καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα σε τρυβλία και άλλες τεχνικές ανάπτυξης που συμπεριλαμβάνουν περίοδο επώασης (Olafsdottir et al., 1997). Η μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (Total Viable Count: TVC) εκτιμά, από ποσοτική άποψη, την παρουσία του γενικού μικροβιακού πληθυσμού σε ένα δείγμα. Στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης, ο αριθμός του μικροβιακού πληθυσμού των αλιευμάτων είναι 10^7 - 10^8 cfu/g., αν και πολλές φορές χρησιμοποιούνται χαμηλότερα επίπεδα σαν ενδείξεις αποδοχής. Για το λόγο αυτό, μαζί με τις μεθόδους για την εκτίμηση της ποιότητας των αλιευμάτων έχουν αναπτυχθεί και μαθηματικά μοντέλα που εκφράζουν τις επιπτώσεις των συνθηκών συντήρησης, όπως η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα, σε συσχέτιση μεταξύ των μικροβιακών αριθμών και της εναπομένουσας διάρκειας ζωής (Olafsdottir et al., 1997). Οι Gram θετικοί μικροοργανισμοί είναι, σε σχέση με τους Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, περισσότερο ανθεκτικοί στην υψηλή θερμοκρασία, στην κατάψυξη, στο αλάτι, στην χαμηλή ενεργότητα νερού, στα υψηλά επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα και στην ακτινοβολία. Ωστόσο, τα υπάρχοντα δεδομένα για την ποσοτική επενέργεια των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην κινητική των μικροοργανισμών είναι ανεπαρκή για να προβλέψουν με ακρίβεια εκείνα τα μικροβιακά είδη που πρόκειται να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα θαλασσινά προϊόντα (Dalgaard, 2003). Σε φρέσκα ή ελαφρώς συντηρημένα θαλασσινά προϊόντα, οι

μικροοργανισμοί αλλοίωσης είναι συνήθως παρόντες σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αποτελούν μόνο ένα δευτερεύον μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, αλατότητας κ.τ.λ. αυξάνονται γρηγορότερα σε σχέση με την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα προκαλώντας την τελική αλλοίωση των προϊόντων (Dalgaard, 2003).

Στις γαρίδες ειδικότερα παίζουν σημαντικό ρόλο οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης. Ενώ σε άλλα καρκινοειδή (αστακοί, καβούρια) που παραμένουν ζωντανά μετά την αλίευση, η σάρκα παραμένει στείρα μικροοργανισμών, οι γαρίδες πεθαίνουν σχεδόν αμέσως, με αποτέλεσμα να ξεκινά αμέσως και η αλλοίωσή τους. Βέβαια, η ψυχρή αποθήκευση ευνοεί την ψυχρότροπη μικροχλωρίδα, τα κυριότερα βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις φαίνεται να είναι μέλη της ομάδας *Acinetobacter* – *Moraxella*. Ωστόσο, βακτήρια των ειδών *Pseudomonas* και *Corynebacterium* σχετίζονται συχνά με την μικροχλωρίδα που προκαλεί αλλοιώσεις.

Στα βακτήρια που ενδιαφέρουν την βιομηχανία αλιευμάτων περιλαμβάνονται τα εξής:

- ***Pseudomonas spp.***: Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram, αερόβια, μεσόφιλα έως ψυχρότροφα βακτήρια. Οι ψευδομονάδες αναπτύσσονται κατά κύριο λόγο σε ζωικά τρόφιμα, πλούσια σε πρωτεΐνες, όπως τα κρέατα και τα ιχθυηρά. Πολλές ψευδομονάδες είναι ψυχρότροφες και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία από 0 έως 4° C ή και χαμηλότερη και επιφέρουν αλλοιώσεις με την έκκριση λιπολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων. Παράλληλα υδρολύουν τις λιπαρές ουσίες προς γλυκερίνη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η εμπορική αξία πολλών τύπων κρεάτων, αποθηκευμένων σε οικιακά ή εμπορικά ψυγεία, προσδιορίζεται από την δράση ψυχρότροφων μικροβίων, μεταξύ των οποίων δεσπόζουσα θέση κατέχουν οι ψευδομονάδες (Μπαλατσούρας, 2006).
- **Οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria)**: Είναι θετικά κατά Gram, συνήθως ακίνητα, μη σπορογόνα, ζυμωτικά βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ ως τελικό προϊόν ζύμωσης (Ringo & Gatesoupe, 1998). Το γαλακτικό οξύ, ο σχηματισμός του οποίου αποτελεί τη βάση πολλών βιομηχανικών ζυμώσεων, είναι υπεύθυνο για την παράγωγή προϊόντων χρήσιμων για τον άνθρωπο όπως το βούτυρο, το γιαούρτι, το ψωμί, η μπίρα το κρασί κ.α. Ωστόσο, οξυγαλακτικά βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις εμφανίζονται σε υψηλούς βαθμούς κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης

αλιευτικών προϊόντων. Την βιομηχανία αλιευμάτων απασχολούν κυρίως τα γένη *Lactobacillus* και *Carnobacterium* (Parlapani et al, 2015).

- ***Enterobacteriaceae***: Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γενών και ειδών βακτηρίων, αρνητικών κατά Gram, που διαβιούν κατά κύριο λόγο στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και των ανώτερων ζώων και κατά δεύτερο λόγο στο έδαφος και το νερό. Τα εντεροβακτηριοειδή έχουν συγκεντρώσει την προσοχή των μικροβιολόγων τροφίμων κατά κύριο λόγο εξαιτίας των παθογόνων γενών *Escherichia*, *Salmonella* και *Shigella* τα οποία συνήθως προκαλούν εντερίτιδες σοβαρής μορφής στον άνθρωπο και σε άλλα σπονδυλωτά. Ωστόσο, εκτός από την παθογόνο δράση τους, τα εντεροβακτηριοειδή αναπτύσσονται στα τρόφιμα προξενώντας σοβαρές αλλοιώσεις. Οι αλλοιώσεις από εντεροβακτηριοειδή ποικίλουν από τρόφιμο σε τρόφιμο και εκδηλώνονται με αύξηση της οξύτητας, την έκλυση CO₂ και H₂, το σχηματισμό δύσοσμων ουσιών, ενδεχομένως με αύξηση ιζώδους, με σχηματισμό βλέννας κ.τ.λ. (Μπαλατσούρας, 2006).

- ***Shewanella putrefaciens***: Ένας μεγάλος αριθμός γενών και ειδών αναερόβιων μικροοργανισμών παίρνουν δραστικά μέρος στην αλλοίωση των τροφίμων. Τη βιομηχανία αλιευμάτων ενδιαφέρουν τα βακτήρια που εκλύουν H₂S και πιο συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός *Shewanella putrefaciens*. Πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae*. Με φυσικό βιότοπο το χώμα και το νερό, διανέμεται ευρέως στη φύση. Σπάνια έχει εμπλακεί ως ανθρώπινο παθογόνο. Συγκαταλέγεται στους μικροοργανισμούς που εξειδικεύονται στη αλλοίωση των αλιευμάτων, των πλούσιων σε πρωτεΐνες και υψηλού pH που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε συσκευασίες υπό κενό ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες. Ο μικροοργανισμός παράγει ποικίλα πτητικά σουλφίδια, συμπεριλαμβανομένου του υδρόθειου (H₂S) και στα ψάρια διασπά το TMAO σε TMA.

- ***Brochothrix thermosphacta***: Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* ενδιαφέρει σαν μικροοργανισμός που προκαλεί αλλοιώσεις σε τρόφιμα, ενώ δεν υπάρχει κανένα στοιχείο που να υποστηρίζει ότι είναι παθογόνο. Πρόκειται για θετικό κατά Gram, μη σπορογόνο και ακίνητο ραβδόμορφο βακτήριο. Σε αποθηκευμένα σε ψύξη αλιεύματα η ανάπτυξη του *B. thermosphacta* εξαρτάται από τη συγκέντρωση του O₂. Έτσι, κυριαρχεί σε παρουσία O₂ πάνω από 0,2% (Coton et al., 2013). Σε αναερόβιες συνθήκες ο *Lactobacillus spp.* επικρατεί του *B. thermosphacta* (Comi, 2017).

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που προκαούν αλλοιώσεις σε αλιεύματα που προέρχονται από την περιοχή της Μεσογείου και αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι οι *Pseudomonas spp.* και *Shewanella spp.*, ενώ συνήθως όταν η αποθήκευση γίνεται σε συσκευασίες κενού ή/και τροποποιημένης ατμόσφαιρας οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια . (Parlapani et al., 2017, Parlapani et al., 2015). Υπάρχουν εξωγενείς και ενδογενείς παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μετά την αλίευση. Η σημαντικότερη των εξωτερικών παραμέτρων είναι η θερμοκρασία καθώς επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη ή ακόμα και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί διακρίνονται με βάση το φάσμα των θερμοκρασιών που αναπτύσσονται σε θερμοφίλους (προτιμούν υψηλές θερμοκρασίες), μεσόφιλους (προτιμούν μέσο εύρος θερμοκρασιών), ψυχρόφιλοι προτιμούν χαμηλές θερμοκρασίες) και ψυχρότροφους (σε γενικές γραμμές μεσόφιλοι που όμως ανέχονται χαμηλές θερμοκρασίες) (Πίνακας 1).

| Μικροοργανισμοί | Θερμοκρασία ανάπτυξης (°C) | |
|-----------------|----------------------------|----------|
| | Βέλτιστο ανάπτυξης | Ελάχιστη |
| Θερμόφιλοι | 55-65 | 30 – 40 |
| Μεσόφιλοι | 30 – 40 | 5 – 10 |
| Ψυχρόφιλοι | 12 – 18 | <0 – 10 |
| Ψυχρότροφοι | 20 – 30 | <0 – 10 |

Πίνακας 1. Θερμοκρασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών. (προσαρμογή από Λαφτσίδα, 2015)

Επίσης, άλλοι παράγοντες είναι η μεγάλη ποσότητα ύδατος στους ιστούς και η μόνιμα υγρή κατάσταση του δέρματος των αλιευμάτων που αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Η μικροβιακή αλλοίωση μπορεί να παρουσιαστεί ως αποχρωματισμός ή επιφανειακή γλοιώδης ουσία, ή ακόμα και με την εμφάνιση αποικιών. Ο αποχρωματισμός ή μελανές κηλίδες είναι ενδεικτικά της αλλοίωσης των γαρίδων (Jeong et al, 1991). Έτσι, είναι σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων συντήρησης οι οποίες να διατηρούν υψηλή ποιότητα και φρεσκότητα των γαρίδων.

Οι ενδογενείς παράμετροι αφορούν στο υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών και είναι το pH και η ενεργότητα του νερού (A_w). Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε διάφορες τιμές pH, ο κάθε μικροοργανισμός έχει συγκεκριμένο εύρος τιμών στο

οποίο είναι σε θέση να αναπτυχθεί. Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια έχουν βέλτιστη περιοχή pH ανάπτυξης κοντά στο 7.

Το νερό επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η ενεργότητα του νερού είναι ο λόγος της μερικής πίεσης των ατμών του νερού (P) στην επιφάνεια του τροφίμου σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία προς την πίεση των ατμών του καθαρού νερού (P_w) στην ίδια θερμοκρασία $A_w = P / P_w$). Είναι ουσιαστικά μέτρο για το κλάσμα του νερού που είναι άμεσα διαθέσιμο για χημικές αντιδράσεις, την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την δράση των ενζύμων, αφού το νερό στα τρόφιμα είναι δεσμευμένο σε διάφορες μορφές (Λαφτσιδής, 2015). Οι τιμές της A_w είναι μικρότερες από 1, ενώ το καθαρό νερό έχει τιμή 1. Η ενεργότητα του νερού επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης των βακτηρίων που παράγουν τοξίνες. Για κάθε βακτήριο υπάρχει μια ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού κάτω από την οποία είναι αδύνατη η ανάπτυξη ή η παραγωγή τοξίνης. Έτσι με μείωση της ενεργότητας νερού στο περιβάλλον που υπάρχουν μικροοργανισμοί αυξάνεται η οσμωτική πίεση του εξωτερικού της κυτταρικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα τη σταδιακή καταστροφή της και τον θάνατο των μικροοργανισμών. Ακόμη, μεταβάλλοντας την ενεργότητα του νερού επηρεάζεται η υφή των τροφίμων, η δράση των ενζύμων και η ταχύτητα των αντιδράσεων μη ενζυμικής αμαύρωσης που λαμβάνουν χώρα στα τρόφιμα (Λαφτσιδής, 2015).

Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα

Εκτός από την αλλοίωσή τους, τα καρκινοειδή μπορούν να αποτελέσουν πηγή παθογόνων μικροοργανισμών. Έρευνα σε φρέσκες γαρίδες στην αγορά έδειξε την παρουσία *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* σε ποσοστό 37% και 17% αντίστοιχα ενώ 54% των στελεχών είναι ανθεκτικό σε τουλάχιστο ένα αντιβιοτικό (Berry et al., 1994). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί σε αλιεύματα ευθύνονται για ένα ποσοστό τροφιμογενών λοιμώξεων και τροφικών δηλητηριάσεων στον άνθρωπο. Από τις 967 περιπτώσεις τροφιμογενών επιδημιών (με γνωστή αιτία) στις Η.Π.Α. για την περίοδο 1993 – 1997, το 19% προκλήθηκε από αλιεύματα. Τα καρκινοειδή και τα μαλάκια μαζί ευθύνονταν για τον ίδιο αριθμό περιπτώσεων με τα πουλερικά (περίπου 1900), τα τελευταία όμως καταναλώθηκαν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (Olsen et al.,

2000). Οι κυριότεροι παράγοντες είναι τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα, οι τοξίνες και οι βιογενείς αμίνες. Ωστόσο στα καρκινοειδή γενικά δεν συσσωρεύονται τοξίνες και δεν έχει επιβεβαιωθεί σχηματισμός ενδογενών αμινών (πχ. ισταμίνης κ.α.) ούτε και η παρουσία παρασίτων. Τα βακτήρια μπορεί να προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον ή το περιβάλλον γενικότερα στο οποίο διατηρούνται μετά την αλίευση, ή ακόμα και από επιμόλυνση από τον άνθρωπο που έρχεται σε επαφή με τα αλιεύματα κατά την επεξεργασία. Οι ιοί ενδημούν στο θαλάσσιο περιβάλλον και αποτελούν την μορφή ζωής σε μεγαλύτερη αφθονία στη θάλασσα. Ωστόσο κανείς από τους ιούς αυτούς δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο (Lees, 2000). Οι ιοί που προκαλούν τροφογενείς λοιμώξεις ενδημούν στην ανθρώπινη γαστροεντερική οδό και προέρχονται από ανθρώπινα περιττώματα (Cliver, 1988). Η παρουσία τους στα αλιεύματα είναι αποτέλεσμα κακής υγιεινής καθώς μεταδίδονται είτε από μολυσμένα με λύματα ύδατα ή από τους χειριστές των τροφίμων.

Μέθοδοι της αξιολόγησης ποιότητας των νοπών αλιευμάτων

Οργανοληπτική ανάλυση

Τα φρέσκα μαλακόστρακα, όταν είναι ακόμα ζωντανά, εμφανίζουν αντανάκλαστικές κινήσεις στα μάτια, τις κεραίες και τα πόδια. Έχουν οσμή θάλασσας, η επιφάνειά τους γυαλιστερή, τα αρθρωτά μέρη είναι στερεά, δύσκαμπτα και προσκολλημένα στο σώμα. Η θωρακική μεμβράνη (συνδέει το κεφάλι με το υπόλοιπο σώμα της γαρίδας) πρέπει να είναι ισχυρά τεντωμένη, ανθεκτική, διάφανη. Το κεφαλικό τμήμα δεν πρέπει να είναι μελανιασμένο ή να φέρει μαύρες κηλίδες (Ψαρουδάκη et al, 2008).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν βασικό κριτήριο ποιότητας για τους καταναλωτές καθώς καθορίζουν τον βαθμό αρέσκειας και αποδοχής από αυτούς. Είναι συνήθης η κατάταξη των αλιευμάτων σε ποιοτικές κατηγορίες με βάση τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά καθώς οι καταναλωτές θεωρούν δεδομένα τα άλλα (υγιεινή, θρεπτικότητα). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αξιολογούνται με τις αισθήσεις και περιλαμβάνουν την εμφάνιση (χρώμα, δομή των τροφίμων, μέγεθος και σχήμα, τυχόν ελαττώματα), την υφή, την οσμή και τη γεύση.

Οι οργανοληπτικές δοκιμές μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις ομάδες: τις ακριβείς δοκιμές, οι οποίες δείχνουν εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, τις περιγραφικές και τις υποκειμενικές δοκιμές. Οι ακριβείς και περιγραφικές δοκιμές είναι αντικειμενικές, αναλυτικές δοκιμασίες στις οποίες χρησιμοποιείται μια επιλεγμένη επιτροπή κριτών. Οι υποκειμενικές δοκιμές βασίζονται στη μέτρηση της προτίμησης ή της αποδοχής του προς κατανάλωση αλιεύματος. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από το σκοπό της εφαρμογής της οργανοληπτικής αξιολόγησης και χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη προϊόντων νέας τεχνολογίας, στον έλεγχο ποιότητας, σε καταναλωτικές μελέτες ή στην έρευνα. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες περιγραφικές δοκιμές στηρίζονται σε ταξινόμηση (κατά κλίμακες) της ποιοτικής αξιολόγησης και στη λεπτομερή περιγραφή ενός ή περισσότερων χαρακτηριστικών του προς εξέταση προϊόντος (Olafsdottir et al., 1997). Έχουν αναπτυχθεί και οριστεί διάφορες μέθοδοι για την οργανοληπτική ανάλυση των καρκινοειδών.

Οι κλίμακες Torry αναπτύχθηκαν για χρήση σε έρευνα αλλά σύντομα υιοθετήθηκαν από τη βιομηχανία αλιευμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο για επιθεώρηση και ποιοτικό έλεγχο. Η κατηγοριοποίηση για τη (ροζ) γαρίδα φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 2. Κατηγορίες φρεσκότητας γαρίδας σύμφωνα με την κλίμακα Torry (προσαρμογή από Archer, 2010).

| Κατηγορία | Χρώμα και διαφάνεια σάρκας | Συνεκτικός ιστός | Κεφάλι | Σώμα | Οσμή |
|-----------|--------------------------------------|------------------|-----------------------|--|--|
| 5 | Διάφανη | Γκρι | Καφέ / Σκούρο κόκκινο | Πορτοκαλί / ροζ (τουρκουάζ αβγά) | Φρέσκα φύκια, νερού, ντελικάτη |
| 4 | Ελαφρώς αδιάφανη προς το εσωτερικό | Μουντό γκρι | Σκουρότερο | Ελαφρά πράσινο / κίτρινη χροιά στην κοιλία. Χλωμό κίτρινο πλευρικά. (αβγά: λερωμένο μεταλλικό πράσινο) | Φύκια, γλυκιά, γάλακτος, φρεσκοκομμένου γρασιδιού, μεταλλική, ιωδίου |
| 3 | Η αδιαφάνεια επεκτάθηκε στο μισό της | - | Σκούρο πράσινο / μωβ | Πράσινο / πορτοκαλί (αβγά: γκρι / | Οξεία / γλυκιά οσμή λεμονιού, |

| | | | | | |
|---|--|------------|-------------------|--|---|
| | σάρκας από το εσωτερικό το οποίο γίνεται κίτρινο | | | μπλε) | μουχλιασμένων φύλλων, σανού |
| 2 | Ίσως ακόμη να υπάρχει διαφάνεια στις άκρες της ουράς. Εσωτερικό: κίτρινο/πράσινο | - | Πράσινο / κίτρινο | - | Κόμποστ, ενσίρωμα, αποσυντιθέμενα λαχανικά, χούμος, λάσπη, απόνερα, NH ₃ |
| 1 | Πλήρως αδιάφανο | Κιτρινωπός | Πράσινο / μαύρο | Λερωμένο κίτρινο / καφέ-πορτοκαλί. Καλυμμένο με χλωμή κίτρινη γλίτσα | Ούρων, σκύλου, αμίνες, βουστάσιο, ιδρώτα, NH ₃ |

Ακόμη, τεχνολόγοι αλιευμάτων από ερευνητικά ινστιτούτα και τη βιομηχανία αλιευμάτων σκανδιναβικών και ευρωπαϊκών χωρών, ανέπτυξαν τη μέθοδο στην οποία ο δείκτης ποιότητας (QIM - Quality Index Method) περιγράφει την οργανοληπτική αξιολόγηση των αλιευμάτων. Βασίζεται σε σημαντικές αισθητηριακές παραμέτρους ποιότητας για ολόκληρα ψάρια χρησιμοποιώντας αρκετές παραμέτρους και σύστημα βαθμονόμησης από 0 έως 3 για την κάθε μια παράμετρο (Hyldig, Green-Petersen, 2004).

Η συχνότερα εφαρμοζόμενη μέθοδος στην Ευρώπη είναι η EU Scheme (European Union Scheme) σύμφωνα με τον Καν. (ΕΕ) Νο. 2406/96. Η κατηγοριοποίηση των αλιευμάτων γίνεται ανάλογα με το είδος σε κατηγορίες φρεσκότητας και σε απαράδεκτα για κατανάλωση ή περαιτέρω επεξεργασία. Ποιο συγκεκριμένα, για τις γαρίδες καθορίζονται 2 κατηγορίες φρεσκότητας: Εξαιρετικό και Α (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Κριτήρια φρεσκότητας γαρίδας. (Προσαρμογή από Καν.(ΕΕ) 2406/96)

| | |
|--|------------------------------|
| | Κριτήρια |
| | Κατηγορία φρεσκότητας |

| | Εξαιρετικό | A |
|--|---|---|
| Στοιχειώδεις απαιτήσεις | <ul style="list-style-type: none"> - Επιφάνεια του κελύφους: υγρή και στιλπνή, - Οι γαρίδες πρέπει να πέφτουν χωριστά, όταν μεταφέρονται από το ένα δοχείο στο άλλο - Η σάρκα πρέπει να μην έχει ξένη οσμή - Οι γαρίδες δεν πρέπει να περιέχουν άμμο, βλέννα και άλλα ξένα σώματα | Οι ίδιες με τις απαιτήσεις της κατηγορίας «Εξαιρετικό» |
| Όψη: 1. της γαρίδας με το κέλυφός της | Έντονο ερυθρορόδινο χρώμα με μικρές λευκές κηλίδες· θωρακικό μέρος του κελύφους | Χρώμα από ελαφρώς ασθενές ερυθρορόδινο μέχρι κυανοερυθρό με λευκές κηλίδες· το θωρακικό μέρος του κελύφους πρέπει να είναι ανοικτόχρωμο με γκριζες αποχρώσεις |
| Κατάσταση της σάρκας κατά και μετά την αφαίρεση του κελύφους | <ul style="list-style-type: none"> - Το κέλυφος αποσπάται εύκολα με μόνον απώλειες σάρκας αναπόφευκτες από τεχνικής πλευράς. - Ανθεκτική, αλλά όχι σκληρή | <ul style="list-style-type: none"> - Το κέλυφος αποσπάται δυσκολότερα με ελάχιστες απώλειες σάρκας - Λιγότερο ανθεκτική, ελαφρώς σκληρή |
| Τρίμματα | Αποδεκτά ελάχιστα τρίμματα γαρίδας | Αποδεκτή μικρή ποσότητα τριμμάτων γαρίδας. |
| Οσμή | Οσμή φρέσκων φυκιών, ελαφρώς γλυκειά οσμή | Υπόξινη· έλλειψη οσμής φυκιών. |

Η Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί όταν πωλούνται πολυάριθμα ψάρια και οστρακόδερμα εντός των συνόρων της να έχουν προηγουμένως βαθμονομηθεί με βάση τα κριτήριά του EU Scheme (Huss, 1995). Ας σημειωθεί εδώ πως ο συγκεκριμένος κανονισμός δεν εφαρμόζεται σε μικρές ποσότητες προϊόντων που διατίθενται απευθείας από τους παράκτιους αλιείς στο λιανικό εμπόριο ή τους καταναλωτές (Άρθρο 2, παρ. 2, Καν. (ΕΚ) 2406/96). Αφορά σε τυποποιημένα προϊόντα ή προϊόντα που πωλούνται σε μεγάλες ποσότητες στο εμπόριο, στα οποία είναι αναγκαία η κατηγοριοποίηση σε ποιότητες και μεγέθη, ώστε να εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη δυνατή ομοιογένεια της εκάστοτε παρτίδας, οι οποίες αποτελούν και τη μονάδα ελέγχου από τους αρμόδιους φορείς με βάση τα συγκεκριμένα κριτήρια αξιολόγησης. Άλλωστε ένας από τους σκοπούς του κανονισμού είναι να υποστηριχθούν τα προϊόντα ποιότητας. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση της ποιότητας από τις επίσημες ελεγκτικές αρχές έχουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων.

Η ποιοτική υποβάθμιση συνίσταται κυρίως σε μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, με αποτέλεσμα την μειωμένη αποδοχή από τους καταναλωτές και συνεπώς τη μείωση της εμπορικής του αξίας, χωρίς όμως να θεωρείται ακατάλληλο για κατανάλωση. Βέβαια η ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για την αλλοίωσή του. Η αλλοίωση των αλιευμάτων ορίζεται ως οι μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (εμφάνιση, γεύση, οσμή και υφή) του προϊόντος που το καθιστούν ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση.

Φυσικές και μηχανικές μέθοδοι

Είναι γνωστό πως οι ηλεκτρικές ιδιότητες του δέρματος και των ιστών μεταβάλλονται μετά τον θάνατο, και ένας τρόπος μέτρησης των μεταβολών αυτών ή του βαθμού αλλοίωσης θα μπορούσε να στηριχτεί σε αυτή την ιδέα. Ωστόσο είναι πολλές οι δυσκολίες που πρέπει να ξεπεραστούν στην ανάπτυξη ενός οργάνου: για παράδειγμα διαφοροποιήσεις μεταξύ ειδών, μεταξύ παρτίδων, διαφορετικές μετρήσεις όταν τα αλιεύματα αλλάζουν μορφή όπως στο φιλετάρισμα ή την κατάψυξη, αν έχουν αίμα ή όχι, καθώς επίσης τη φτωχή συσχέτιση του αισθητήρα ενός οργάνου και των αντίστοιχων μετρήσεων. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιο όργανο για τον εκμηχανισμό

της αξιολόγησης της ποιότητας των αλιευμάτων, κάτι που είναι επιθυμητό για τη βιομηχανία αλιευμάτων. Οι σημαντικότερες μέθοδοι συμπεριλαμβάνονται η μέτρηση της υφής, η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και η μέτρηση του pH.

Η γνώση για το pH των αλιευμάτων μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση τους. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με pH-μέτρο τοποθετώντας τα ηλεκτροδία απευθείας στη σάρκα του αλιεύματος ή σε εναιώρημα δείγματος σάρκας σε απεσταγμένο νερό.

Μικροβιολογικές μέθοδοι

Οι οργανοληπτικές μέθοδοι καθορισμού της διάρκειας ζωής και της ποιότητας των θαλασσινών είναι δύσκολο να βαθμονομηθούν. Για το λόγο αυτό χρειάζονται οι εργαστηριακές αναλύσεις οι οποίες είναι σε θέση να καθορίσουν επακριβώς το βαθμό συμμόρφωσης των θαλάσσιων προϊόντων προς τα πρότυπα αγορών όπως αυτά καθορίζονται από διεθνείς ή εγχώριες οδηγίες (Olafsdottir et al., 1997). Ο στόχος των μικροβιολογικών ελέγχων των αλιευμάτων είναι η αξιολόγηση της πιθανής παρουσίας μικροοργανισμών που αφορούν στη δημόσια υγεία και της ένδειξης του επιπέδου υγιεινής των αλιευμάτων που σχετίζεται με τη θερμοκρασία και την υγιεινή κατά τους χειρισμούς και επεξεργασία των προϊόντων. Τα μικροβιολογικά δεδομένα δεν παρέχουν πληροφορίες για την φρεσκότητα των αλιευμάτων ή την ποιότητα για κατανάλωση. Ωστόσο ο αριθμός των Ειδικών Μικροοργανισμών Αλλοίωσης (EMA) θα συσχετιστεί με την υπολοιπόμενη διατηρησιμότητα των αλιευμάτων.

Οι παραδοσιακές μικροβιολογικές εξετάσεις είναι χρονοβόρες, ακριβές και απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό για τη διεξαγωγή τους αλλά και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Γενικά δεν συνίστανται σε ευρεία κλίμακα. Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί διάφορες ταχείες μικροβιολογικές μέθοδοι, μερικές από αυτές τις αυτοματοποιημένες μεθόδους μπορεί να είναι χρήσιμες όταν πρέπει να εξεταστεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων (Huss, 1995).

Χημικές μέθοδοι

Ενώ οι χημικές αλλοιώσεις των ψαριών είναι εκτενώς μελετημένες, η γνώση γύρω από τις χημικές αλλαγές που υφίστανται τα οστρακόδερμα και τα καρκινοειδή κατά τη διάρκεια της συντήρησης, είναι ελλιπής. Η μέτρηση του ολικού βασικού πτητικού αζώτου (TVB-N) είναι μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον προσδιορισμό της ποιότητας των θαλασσινών προϊόντων. Είναι γενικός όρος που περιλαμβάνει τη μέτρηση της τριμεθυλαμίνης (που παράγεται από βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις), διμεθυλαμίνης (που παράγεται από αυτολυτικά ένζυμα κατά τη συντήρηση σε κατάψυξη), της αμμωνίας (που παράγεται από την απαμίνωση των αμινοξέων και των νουκλεοτιδικών καταβολιτών) και άλλων πτητικών αζωτούχων ενώσεων που σχετίζονται με την αλλοίωση των αλιευμάτων.

Αν και οι αναλύσεις είναι σχετικά απλές, θεωρούνται αναξιόπιστες για τη μέτρηση της αλλοίωσης των πρώτων δέκα ημερών γιατί απεικονίζουν μόνο μεταγενέστερα στάδια προηγμένης αλλοίωσης. Ωστόσο, είναι χρήσιμες στην μέτρηση της ποιότητας των κεφαλόποδων (καλαμάρι) και για τα καρκινοειδή (Huss, 1995).

Άλλοι δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι η μέτρηση των βιογενών αμινών, που σχηματίζονται από τη δράση των βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνουν αμινοξέα της σάρκας των αλιευμάτων, η μέτρηση της οξείδωσης λίπους όπου ανιχνεύονται τα υπεροξειδία που παράγονται από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, η μέτρηση της αιθανόλης που είναι κοινός μεταβολίτης μιας ομάδας βακτηρίων και χρησιμοποιείται σε κονσερβοποιημένα προϊόντα.

Υλικά και μέθοδοι

Γενικά

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν ο μικροβιολογικός πληθυσμός σε φρέσκες γαρίδες, οι χημικοί δείκτες αλλοίωσης, οι οργανοληπτικές μεταβολές και ο εμπορικός χρόνος ζωής των γαρίδων κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 0° και 5° C. Αναλυτικότερα μελετήθηκαν:

- i. Η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στις μεταβολές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των γαρίδων και κατ' επέκταση στον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος.
- ii. Η μεταβολή του pH γαρίδων σε σχέση με τον χρόνο και τη θερμοκρασία συντήρησης.
- iii. Η αρχική μικροβιολογική κατάσταση και η μεταβολή της (microbiota) σε επίπεδο γένους και είδους στις γαρίδες διατηρημένες σε 0° C (σε πάγο) και στους 5° C (οικιακό ψυγείο).

Προμήθεια και συντήρηση των γαρίδων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων προμηθεύτηκαν φρέσκες γαρίδες , που αλιεύθηκαν την ίδια μέρα στο Αιγαίο Πέλαγος ανοιχτά της Χαλκιδικής. Παραλήφθηκε ικανοποιητική ποσότητα γαρίδων, οι οποίες μεταφέρθηκαν αυθημερόν σε ισόθερμα κιβώτια με πάγο στο χώρο του εργαστηρίου, όπου και αποθηκεύθηκαν οι μισές σε τελάρο σε ψυγείο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία στους 5° C και οι υπόλοιπες μισές σε ισόθερμο ψυγείο καλυμμένες με πάγο, ο οποίος πάγος ανανεωνόταν καθημερινώς ώστε να παραμένει σταθερή η επιθυμητή θερμοκρασία των 0° C.



Εικόνα 6. Γαρίδες στην αγορά

Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές, σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν οι ίδιες και στις δύο περιπτώσεις και δεν τροποποιήθηκε καμία παράμετρος κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων.

Αναλύσεις

Οργανοληπτική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η συνηθέστερη στην Ευρώπη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ποιοτική αξιολόγηση των θαλασσινών στην βιομηχανία αλιευμάτων, που είναι η EU Scheme (European Union Scheme). Η Ευρωπαϊκή μέθοδος αξιολόγησης των φρέσκων γαρίδων περιλαμβάνει δυο επίπεδα ποιότητας: E, A. (Πίνακας 2). Το E αντιπροσωπεύει την εξαιρετική ποιότητα των αλιευμάτων, το A την καλή έως αποδεκτή ποιότητα ενώ οι γαρίδες που έχουν αλλοιωθεί περαιτέρω κρίνονται ως ακατάλληλες για κατανάλωση.

Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίστηκε ο χρόνος απόρριψης των γαρίδων στην κάθε μια θερμοκρασία συντήρησης.

Ποιο αναλυτικά, αναλύθηκε η ποιότητα των δειγμάτων γαρίδας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στις θερμοκρασίες των 0° C και 5° C, από την ημέρα 0 μέχρι να κριθούν απορριπτέα ποιοτικά. Αξιολογήθηκαν συνολικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (η οσμή, το χρώμα και η όψη) των γαρίδων, ώστε στην εκάστοτε μέτρηση να γίνει η αντίστοιχη κατάταξη με βάση την Ευρωπαϊκή μέθοδο αξιολόγησης.

Μέτρηση pH

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με pH-μέτρο με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στο προϊόν μίξης της σάρκας με απεσταγμένο νερό. Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μέτρηση pH σε όλα τα δείγματα για όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Μικροβιολογικές αναλύσεις

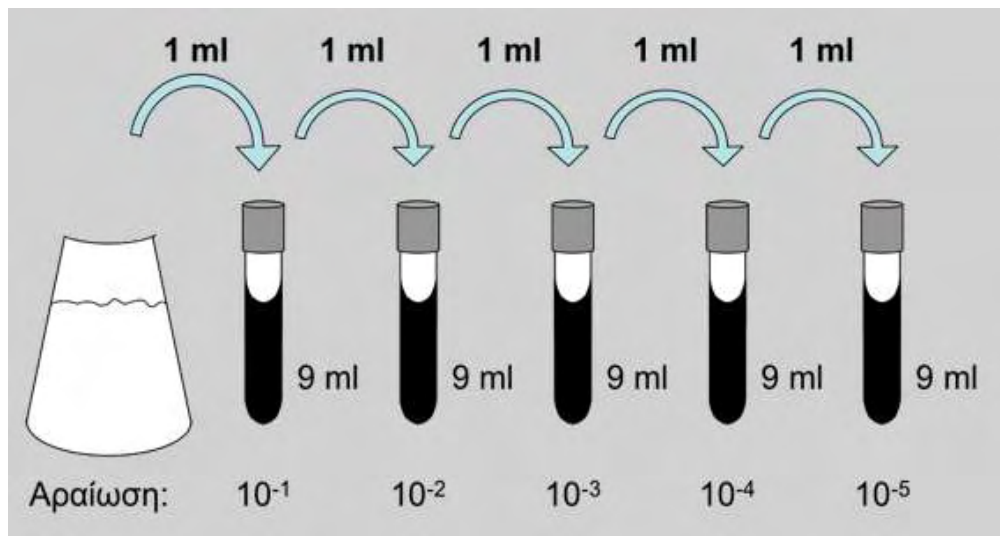
Γενικά

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν συνολικά έξι δείγματα γαρίδας των 10 g, τρία δείγματα από τις γαρίδες στους 0 βαθμούς κελσίου και τρία δείγματα από τις γαρίδες στους 5 βαθμούς κελσίου, τα οποία μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες όπου προσθέτονταν 90 ml Maximum Recovery Diluent (MRD) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (εικ. 7).



Εικόνα 7. Συσκευή ομογενοποίησης τύπου Stomacher.

Κατόπιν πραγματοποιούνταν δεκαδικές αραιώσεις με την μεταφορά 1 ml δείγματος σε 9 ml αποστειρωμένου MRD σε συγκεντρώσεις από 10^{-2} έως 10^{-5} (εικ. 8).



Εικόνα 8. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα έγινε με δύο τεχνικές ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα:

1) Με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) που αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0,1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό. Εφαρμόζεται γενικά στους αερόβιους μικροοργανισμούς.

2) Με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) που αποτελείται από τα εξής στάδια: α) Τοποθέτηση γνωστού όγκου (1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο και β) μετάγγιση θρεπτικού υλικού που περιέχει άγαρ θερμοκρασίας 45°C (ρευστή κατάσταση). Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται γενικά στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Για την καταμέτρηση επιλέχθηκε η αραιώση όπου ο αριθμός των αποικιών κυμαίνονταν από 15 έως 300. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel του Microsoft Office.



Εικόνα 9. Καταμέτρηση μικροοργανισμών στα τρυβλία.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν οι εξής:

- i. Ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) σε:
 - Tryptone Soy Agar (TSA), με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, την πρώτη μέρα και την ημέρα της απόρριψης.
 - Iron Agar, με την τεχνική της ενσωμάτωσης, καθημερινά από την πρώτη μέρα έως την ημέρα απόρριψης.
- ii. Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε Iron Agar. Ακολούθησε καταμέτρηση των μαύρων μόνο αποικιών μετά την επώαση των τρυβλίων στους 25° C για 3-5 ημέρες.
- iii. Οξυγαλακτικά βακτήρια με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε MRS Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25° C για 3-5 ημέρες.
- iv. *Pseudomonas sp.*, επίστρωση σε CFC Agar και επώαση σε θερμοκρασία 25° C για 2-3 ημέρες.
- iv. *Enterobacteriaceae* με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε VRBGA και επώαση σε θερμοκρασία 37° C για 24 ώρες.

Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Το **TSA** είναι θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης που επιτρέπει την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε επίπεδο εργαστηρίου, αερόβιων

αλλά και αναερόβιων βακτηρίων. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 . Η σύνθεση του TSA έχει ως εξής:

Πίνακας 4. Συστατικά TSA.

| Συστατικά | gr / 1000 ml |
|--------------------|--------------|
| Tryptone | 15,00 |
| Soy peptone | 5,00 |
| NaCl | 5,00 |
| Agar | 12,00 |

Το **Iron Agar** χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H_2S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), δεξτρόζη, λακτόζη και σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου (Fe) και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες. Η σύνθεση του Iron Agar έχει ως εξής:

Πίνακας 5. Συστατικά Iron Agar

| Συστατικά | gr / 1000 ml |
|--------------------------------|--------------|
| Beef Extract | 3.0 |
| Yeast Extract | 3.0 |
| Balanced Peptone No 1 | 20.0 |
| NaCl | 5.0 |
| Lactose | 10.0 |
| Ferric Citrate | 0.3 |
| Sucrose | 10.0 |
| Glucose | 1.0 |
| $Na_2S_2O_3$ | 0.3 |
| Phenol Red | 0.025 |

| | |
|------------------|------|
| Agar No 2 | 12.0 |
|------------------|------|

Το θρεπτικό υπόστρωμα **de Man – Rogosa – Sharpe (MRS) agar** χρησιμοποιήθηκε για την αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η γλυκόζη είναι ο ζυμούμενος υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο (CH_3COONa) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το κιτρικό αμμώνιο ($C_6H_{17}N_3O_7$) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής. Το τελικό pH ρυθμίστηκε στο 6.4 ± 0.2 . Η σύνθεση του MRS agar έχει ως εξής:

Πίνακας 6. Συστατικά MRS Agar

| Συστατικά | gr / 1000 ml |
|-------------------------------|--------------|
| Mixed Peptones | 10.0 |
| Yeast Extract | 5.0 |
| Beef Extract | 10.0 |
| Glucose | 20.0 |
| K_2HPO_4 | 2.0 |
| CH_3COONa | 5.0 |
| Triammonium Citrate | 2.0 |
| $MgSO_4$ | 0.2 |
| $MnSO_4$ | 0.05 |
| Tween® 80 | 1.08 |
| Agar | 15.0 |

Το **Cephalothin-Sodium Fusidate-Cetrimide (CFC) Agar** είναι εκλεκτικό μέσο για την ανάπτυξη της *Pseudomonas spp.* Παρέχει όλα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για

Pseudomonas spp. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν Gram+ και ορισμένα Gram- βακτήρια.

Πίνακας 7. Συστατικά CFC Agar.

| Συστατικά | g / 1000 ml |
|------------------------------------|-------------|
| Gelatin Peptose | 16.0 |
| K₂SO₄ | 10.0 |
| Enzymatic Digest of Casein | 10.0 |
| MgCl₂ | 1.4 |
| Bacteriological Agar | 13.0 |

| Συστατικά CFC | mg / 500 ml θρεπτικού |
|---------------------|-----------------------|
| Cetrimide | 5.0 |
| Fucidin | 5.0 |
| Cephaloridin | 25.0 |

Η αρίθμηση των *Enterobacteriaceae* γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)**. Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των εντεροβακτηριοειδών σε τρόφιμα. Το τελικό pH είναι 7.4 ± 0.2 . Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών αλάτων (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Η αντίδραση των βακτηρίων με τη γλυκόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες και περιβάλλονται από με μια κόκκινο-μωβ άλω παρουσία δείκτη pH Neutral red).

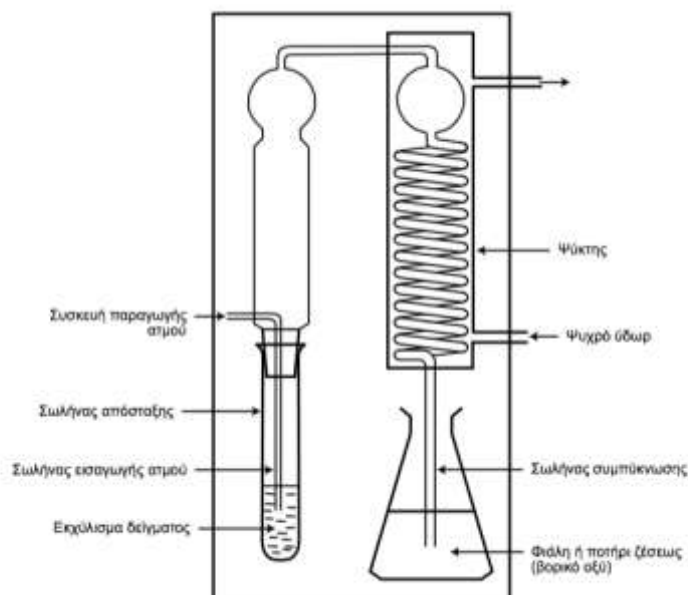
Πίνακας 8. Συστατικά VRBGA.

| Συστατικά | g / 1000 ml |
|----------------------|-------------|
| Yeast Extract | 3.0 |
| Peptone | 7.0 |
| NaCl | 5.0 |
| Bile Salts | 1.5 |
| Glucose | 10.0 |
| Neutral Red | 0.03 |

| | |
|-----------------------|-------|
| Crystal Violet | 0.002 |
| Agar | 12.0 |

Χημική Ανάλυση

Για τη χημική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του προσδιορισμού του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N, Total Volatile Basic Nitrogen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η μέθοδος απόσταξης εκχυλίσματος, αποπρωτεϊνισμένου δια υπερχλωρικού οξέος: Ποσότητα σάρκας 10 g ομογενοποιήθηκε σε συσκευή τύπου Stomacher με 90 ml διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος 6% για 2 λεπτά και έπειτα ακολούθησε διήθηση σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Στη συνέχεια ακολούθησε η απόσταξη ατμού, όπου ποσότητα 50 ml εις διπλούν του διηθήματος ($n = 2$) με 6 ml NaOH 20% οδηγούταν σε αποστακτήρα. Η δέσμευση των πτητικών βασικών αζωτούχων ουσιών γινόταν με την προσθήκη 50 ml H_2BO_3 3% και 3 σταγόνες δείκτη και τέλος ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0.1 M HCl ως πρότυπο διάλυμα. Απαιτείται ανάλυση εις διπλούν. Τέλος διαξέγεται τυφλή δοκιμή, όπου αντί εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται 50 ml του διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος (Παρλαπάνη, 2013).



Εικόνα 10. Συσκευή απόσταξης ατμού

Αποτελέσματα

Οργανοληπτική ανάλυση και προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Την πρώτη ημέρα (ημέρα 0), οι γαρίδες αξιολογήθηκαν ποιοτικά στην κατηγορία εξαιρετικό (E). Στους 0° C, οι γαρίδες διατηρήθηκαν στην κατηγορία E μέχρι την ημέρα 2, και στην κατηγορία A έως την ημέρα 5. Την ημέρα 6 κρίθηκαν αλλοιωμένες, συνεπώς ακατάλληλες για εμπορία. Στους 5° C, οι γαρίδες υποβαθμίστηκαν ποιοτικά στην κατηγορία A από την ημέρα 1 και διατηρήθηκαν μέχρι την ημέρα 2. Την ημέρα 3 κρίθηκαν αλλοιωμένες, συνεπώς ακατάλληλες για εμπορία (πίνακας 9).

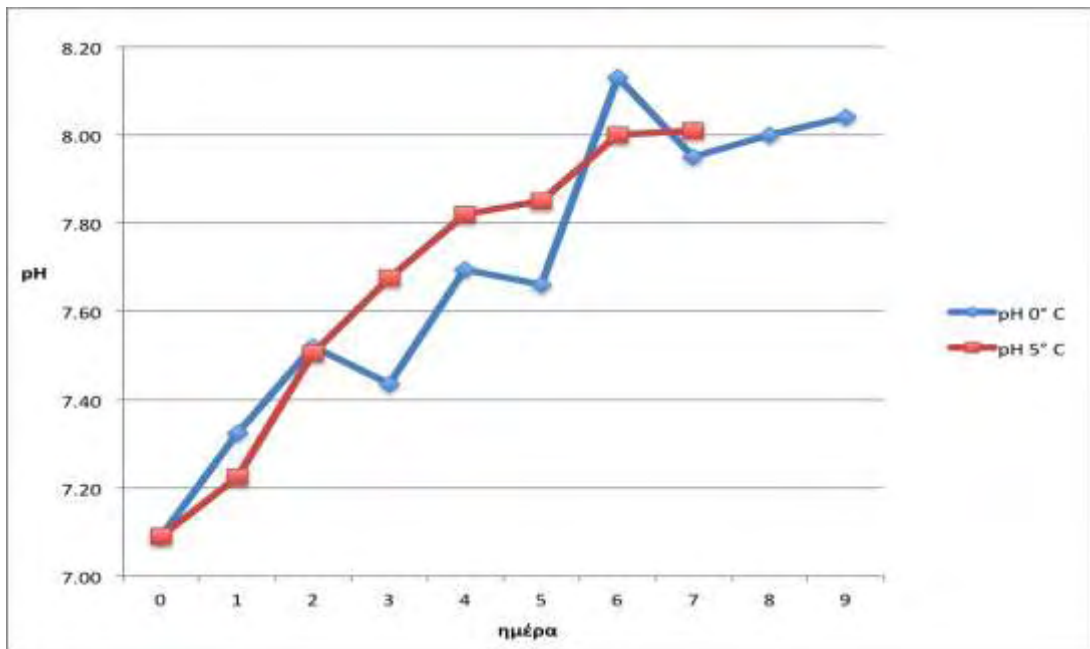
Πίνακας 9. Κατηγορία ποιότητας των γαρίδων ανά ημέρα και θερμοκρασία συντήρησης: Εξαιρετικό (E), A, Απορριπτόμενο (Απορ.).

| Ημέρα | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------|---|---|---|-------|---|---|------|---|---|---|
| 0° C | E | E | E | A | A | A | Απορ | - | - | - |
| 5° C | E | A | A | Απορ. | - | - | - | - | - | - |

Επομένως, ο χρόνος απόρριψης των γαρίδων, βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, είναι 6 ημέρες στους 0° C και 3 ημέρες στους 5° C.

Μέτρηση pH

Το pH παρουσιάζει αύξηση και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (0° C και 5° C). Στο Σχήμα 3 απεικονίζεται η μεταβολή της τιμής του pH σε συνάρτηση με τον αριθμό των ημερών. Το πείραμα ξεκινάει από την ημέρα 0 όπου το pH των δειγμάτων είναι 7,09 έως την ημέρα 9 (σύνολο: 10 ημέρες). Γενικά, ο ρυθμός αύξησης είναι παρόμοιος και στις δύο περιπτώσεις, μεγαλύτερος τις πρώτες ημέρες και μειώνεται μετά την ημέρα 3.



Σχήμα 3 . Μεταβολή του pH της σάρκας της γαρίδας κατά τη συντήρηση στους 0 και 5° C

Μικροβιολογική Ανάλυση

Οι μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη διάρκεια της συντήρησης των γαρίδων στους 0 και τους 5° C φαίνονται στα σχήματα 4 και 5 αντίστοιχα. Τα σημεία των γραφημάτων αντιστοιχούν στους μέσους όρους των 3 επαναλήψεων στην απαρίθμηση των μικροοργανισμών.

Η **ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX)** που καταμετρήθηκε σε Iron Agar, κατά την αποθήκευση της γαρίδας στους 0° C φαίνεται πως παρουσιάζει αργή ανάπτυξη με μεγάλη περίοδο προσαρμογής. Η αρχική τιμή την ημέρα 0, ήταν 3.77 log cfu / g και όπως φαίνεται, η αύξηση του πληθυσμού ξεκινάει μετά την ημέρα 5. Η ολική μικροβιακή χλωρίδα συνεχίζει να αυξάνεται και μετά την ημέρα απόρριψης, την ημέρα 6, οπότε η τιμή της OMX ήταν 4.76 log cfu / g. Η OMX συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι και την τελευταία ημέρα του πειράματος, την ημέρα 9, που φτάνει την τιμή των 5.79 log cfu / g (Σχήμα 4).

Στους 5° C η OMX αυξάνεται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τους 0° C. Φαίνεται πως η περίοδο προσαρμογής διήρκεσε 1 ημέρα, παρουσίασε αυξητικό ρυθμό μέχρι την

απόρριψη των γαρίδων την ημέρα 3, και ο ρυθμός αύξησης φαίνεται πως μειώνεται από την ημέρα 5, μέχρι την τελευταία ημέρα μέτρησης, την ημέρα 7, οπότε η τιμή της OMX ήταν 5.5 log cfu / g (Σχήμα 5).

Για τη μέτρηση της OMX χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά θρεπτικά υλικά. Εκτός από το Iron Agar όπου η μέτρηση γινόταν καθημερινά, η OMX καταμετρήθηκε και σε TSA. Οι καταμετρήσεις έγιναν την ημέρα 0, και τις ημέρες απόρριψης για την κάθε θερμοκρασία (Πίνακας 10). Φαίνεται πως οι τιμές της OMX είναι παρόμοιες τις αντίστοιχες ημέρες απόρριψης, ημέρα 3 και ημέρα 6, για τους 0 και τους 5° C αντίστοιχα. Σαν απόλυτες τιμές φαίνεται πως στο IA αναπτύσσονται λιγότερες αποικίες συγκριτικά με το TSA, με τιμές σημαντικά διαφορετικές όπου η διαφορά αγγίζει περίπου το 2 log cfu /g σε κάθε αντίστοιχη ημέρα.

Πίνακας 10. Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, σε TSA, την ημέρα 0 και τις αντίστοιχες ημέρες απόρριψης στους 0 και τους 5° C. Οι τιμές είναι σε log cfu /g (± τυπική απόκλιση).

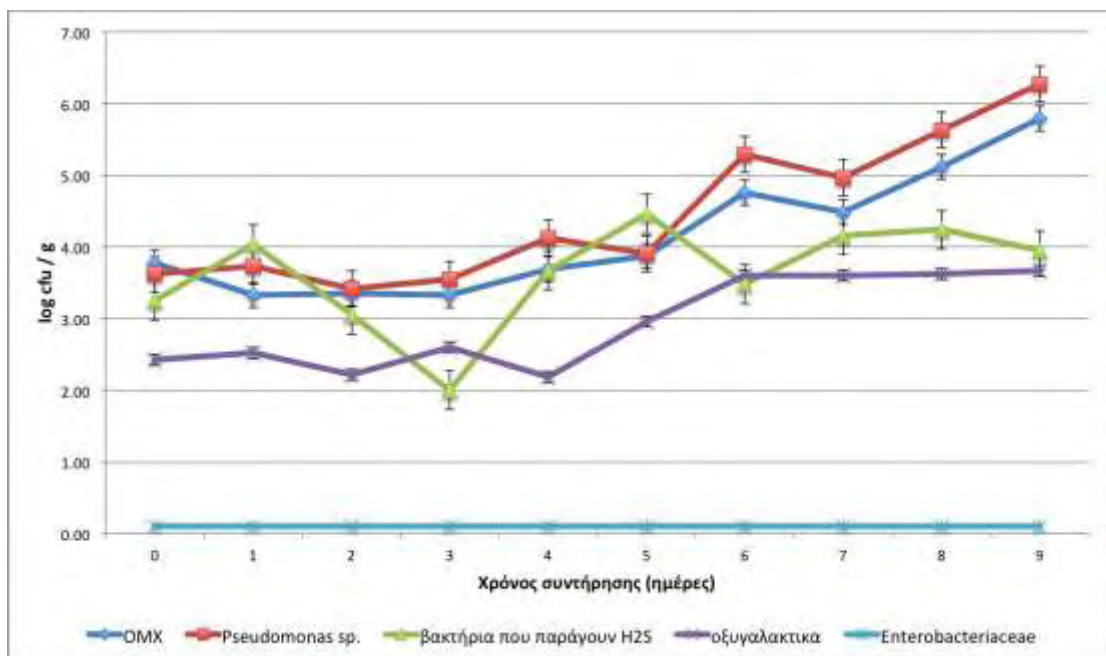
| Ημέρα | 0° C | 5° C |
|-------|------------|------------|
| 0 | 5.52±0.092 | 5.52±0.092 |
| 3 | - | 6.17±0.160 |
| 6 | 6.25±0.107 | - |

Η *Pseudomonas spp.* είναι από τους κυριότερους ειδικούς μικροοργανισμούς αλλοίωσης. Η μετάβολή του πληθυσμού ως προς το χρόνο συντήρησης στους 0 και τους 5° C φαίνεται στα σχήματα 4 και 5 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται ακολουθεί την πορεία της OMX αφού συμμετέχει σε σημαντικό ποσοστό σε αυτήν, ενώ ο πληθυσμός την ημέρα 0 είναι της τάξης του 3,62 log cfu /g. Στους 0° C υπάρχει περίοδος προσαρμογής και η αύξηση του πληθυσμού ξεκινάει ουσιαστικά μετά την ημέρα 5, ενώ συνεχίζει να αυξάνεται και μετά την ημέρα απόρριψης, την ημέρα 6, μέχρι και το τέλος του πειράματος την ημέρα 9. Στους 5° C, ο πληθυσμός αυξάνεται μετά την ημέρα 1, συνεχίζει και μετά την ημέρα 3 που απορρίφθηκαν οι γαρίδες, ως προϊόν και σταθεροποιείται από την ημέρα 4 και μετά.

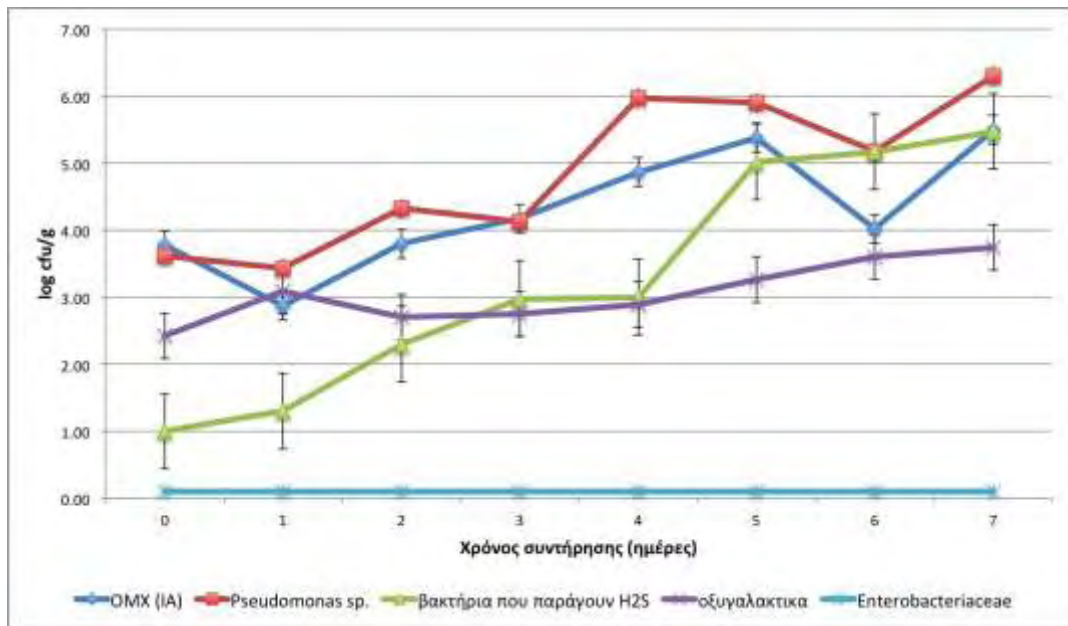
Ο πληθυσμός των βακτηρίων που παράγουν H₂S, (μεταξύ των οποίων και η *Shewanella putrefaciens*), φαίνεται πως στους 0° C παραμένει σχεδόν σε σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος από 4,04 log cfu /g την ημέρα 1 και μέχρι την ημέρα 9 που είναι στα επίπεδα των 3,95 log cfu /g (σχήμα 4). Αντίθετα, στους 5° C ο πληθυσμός αυξάνεται σταθερά από τα επίπεδα των 1,30 στα 5,48 log cfu /g την ημέρα 1 έως και την ημέρα 7 αντίστοιχα (σχήμα 5).

Ο πληθυσμός των **οξυγαλακτικών βακτηρίων** παρουσιάζει γενικά μικρές διακυμάνσεις. Στους 0° C ξεκινάει από τα επίπεδα των 2,42 log cfu /g την ημέρα 0 παραμένει σε σταθερά επίπεδα μέχρι και την ημέρα 5, και έπειτα παρουσιάζει μικρή αύξηση φτάνοντας στα επίπεδα των 3,66 log cfu/g την ημέρα 9 (σχ. 4). Παρόμοιο μοτίβο παρουσιάζεται και στους 5° C, όπου ο πληθυσμός την ημέρα 6 φτάνει τα επίπεδα των 3,60 log cfu /g (σχ. 5).

Κατά τη συντήρηση των γαρίδων στις θερμοκρασίες των 0 και 5° C δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη αποικίας βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης του 10 cfu /g για όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (σχ. 4, 5).



Σχήμα 4. Πληθυσμιακές μεταβολές των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες στους 0° C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν την τυπική απόκλιση.



Σχήμα 5. Πληθυσμιακές μεταβολές των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες στους 5° C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αναπαριστούν την τυπική απόκλιση.

Χημική Ανάλυση

Η ποσότητα του ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVB-N) στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των γαριδών (ημέρα 0) ήταν 58 mg N / 100 gr γαριδών. Στον πίνακα 11 φαίνονται οι τιμές του TVB-N, και είναι ο μέσος όρος των επαναλήψεων στους 0 και τους 5° C. Ο αστερίσκος (*) είναι η ημέρα απόρριψης με βάση τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των γαριδών. Στους 5° C παρατηρούνται υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους 0° C.

Πίνακας 11. Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. n = 2 x 2 = 4 επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση) κατά τη συντήρηση των γαριδών στους 0 και 5° C. (*: ημέρα απόρριψης)

| Ημέρα | 0° C | 5° C |
|-------|---------------|----------------|
| 0 | 58,00±64,929 | 58,00±64,929 |
| 1 | 50,79±87,736 | 63,70±61,285 |
| 2 | 47,78±79,253 | 57,65±69,562 |
| 3 | 38,08±40,658 | *109,06±78,323 |
| 4 | 37,80±58,193 | 120,53±2,499 |
| 5 | 53,94±23,452 | 170,00±62,558 |
| 6 | *100,26±0,808 | 149,27±48,992 |
| 7 | 143,79±75,828 | 125,76±3,791 |
| 8 | 152,43±53,857 | - |
| 9 | 175,04±51,142 | - |

Συζήτηση

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί την κυριότερη αιτία ποιοτικής υποβάθμισης στις νωπές γαρίδες, όπως και σε όλα τα αλιεύματα γενικότερα. Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στις γαρίδες προέρχονται από το φυσικό υδάτινο περιβάλλον από το οποίο αλιεύτηκαν, αλλά και από επιμόλυνση μετά την αλίευσή τους και κατά τη διάρκεια των χειρισμών μέχρι την κατανάλωση. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μεταβάλλεται από την ικανότητα των μικροοργανισμών να πολλαπλασιάζονται στα μικρο-περιβάλλοντα που υπάρχουν στην επιφάνεια των κελύφων και στην πεπτική οδό. Ακόμη, το κυκλοφοριακό σύστημα ορισμένων καρκινοειδών είναι ανοικτό και η αιμολέμφος των καβουριών για παράδειγμα μπορεί να περιέχει σημαντικό αριθμό βακτηρίων, ειδικότερα του γένους *Vibrio*.

Το μικροβιακό φορτίο ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες και τη θερμοκρασία των υδάτων. Γενικά, οι γαρίδες σε τροπικό κλίμα φέρουν μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων, 10^5 – 10^6 cfu/gr σε σχέση με αυτές των ψυχρότερων υδάτων ($<10^\circ\text{C} - 15^\circ\text{C}$) που φέρουν 10^2 – 10^4 cfu/gr. (Kluwer, 2005). Θα πρέπει να σημειωθεί πως μικροχλωρίδα των θαλάσσιων αλιευμάτων δεν αποτελείται από αλόφιλους μικροοργανισμούς όπως συχνά αναφέρεται αλλά κυρίως από αλατοάντοχους μικροοργανισμούς, που αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος αλατότητας με ιδανική συγκέντρωση 1–3% NaCl. Ένα παράδειγμα είναι τα αλατοάντοχα βακτήρια του είδους *Vibrio spp.* που κατά κύριο λόγο εντοπίζονται στα εντόσθια θαλάσσιων ψαριών, ενώ σε αυτά του γλυκού νερού κυριαρχούν βακτήρια του είδους *Aeromonas spp.* Τα είδη των βακτηρίων εναλλάσσονται στα ανάδρομα ψάρια (Kluwer, 2005). Στο είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται κατά τη συντήρηση παίζει ρόλο και η συνήθης χρήση του πάγου για την ψύξη των αλιευμάτων που δημιουργεί περιβάλλον μειωμένης αλατότητας και έτσι ευνοεί την ανάπτυξη των αλοανεκτικών μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί ή τα ένζυμα που εκκρίνουν μπορούν ελεύθερα να κυκλοφορήσουν ή διαχυθούν στη σάρκα όπου και αντιδρούν με το μίγμα των υπάρχουσων φυσικών ουσιών (Lee & Um, 1995). Η χημική σύσταση των ιστών των μαλακόστρακων διαφέρει σε σχέση με αυτή των ψαριών και περιέχει περισσότερες μη-πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις που προκαλούν ταχύτερη αλλοίωση (Aitken et al. 1982, Shamshad et al. 1990). Οι σχετικά υψηλές τιμές pH (7 – 8) καθώς και η υψηλή περιεκτικότητα της σάρκας των γαρίδων σε ελεύθερα αμινοξέα και άλλες αζωτούχες ενώσεις (μη πρωτεϊνικό άζωτο) αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα για ταχεία αύξηση των μικροοργανισμών.

Επίσης οι γαρίδες αλλοιώνονται ταχύτερα σε σχέση με τα άλλα καρκινοειδή επειδή πεθαίνουν σχεδόν αμέσως μετά την αλίευση, οπότε ξεκινούν άμεσα οι διεργασίες autolysis, αλλά και επειδή είναι μικρότερες σε μέγεθος και φέρουν μεγαλύτερο φορτίο μικροβιακής χλωρίδας καθώς προσφέρουν μεγαλύτερη επιφάνεια για την ίδια ποσότητα προϊόντος σε σχέση με άλλα καρκινοειδή (καραβίδες, αστακοί κλπ). Μια ομάδα αυτών των μικροοργανισμών, που χαρακτηρίζονται ως Ειδικοί Μικροοργανισμοί Αλλοίωσης (EMA) είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των μεταβολιτών που προκαλούν τις μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων και έχουν ως αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμισή τους και τελικά στην απόρριψή τους. Το είδος των μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν ως EAM εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες συντήρησης των τροφίμων με κυριότερο παράγοντα τη θερμοκρασία, δεδομένου πως στο πείραμά μας η συντήρηση ήταν σε αερόβιες συνθήκες.

Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται αυτό που είναι κοινά αποδεκτό στη σχετική βιβλιογραφία, πως δηλαδή για τις γαρίδες που προέρχονται από τα εύκρατα ύδατα και συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες σε αερόβιες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης απαρτίζονται κατά κύριο λόγο από αυτούς του γένους *Pseudomonas spp.*, που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, και δευτερευόντως τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (κυρίως *Shewanella putrefaciens*) (Boziaris et al., 2011; Koutsoumanis et al. 1999). Όπως προκύπτει, τα *Pseudomonas spp.* είναι οι μικροοργανισμοί που έχουν τον υψηλότερο πληθυσμό και μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης στους 5° C, σε σχέση με τη συντήρηση των γαρίδων στους 0° C. Παρόμοια συμπεριφορά έχουν και τα βακτήρια που παράγουν H₂S τα οποία στη συντήρηση στους 5° C ξεκινώντας από χαμηλό σχετικά πληθυσμό την ημέρα 0 παρουσιάζουν σημαντική αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, συμβάλλοντας σαφώς στην αλλοίωση του προϊόντος. Στους 0° C ο πληθυσμός των H₂S βακτηρίων παραμένει σχετικά σταθερός, σε υψηλά όμως επίπεδα και μικρότερος των *Pseudomonas spp.* Επίσης, διαπιστώθηκε η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως EAM, σε χαμηλότερους πληθυσμούς ωστόσο, αλλά με παρόμοιο ρυθμό αύξησης στους 0 και τους 5° C, γεγονός που δείχνει πως αυτές οι θερμοκρασίες καθυστερούν την αύξηση αυτής της ομάδας των βακτηρίων.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μια ομάδα βακτηριδίων υπερισχύει σε σχέση με μια άλλη, αρκετά σχετική ομάδα, δεν είναι πάντα πλήρως κατανοητός. Αυτό που είναι

γνωστό είναι ότι χρειάζονται πολύ μικρές αλλαγές στην επεξεργασία και τη συντήρηση των αλιευμάτων για να προκληθούν διαφορετικοί τύποι αλλοίωσης. Ακόμα και για τον ίδιο τύπο αλιεύματος η αλλοίωση μπορεί να εξελιχθεί διαφορετικά, ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση και άλλους άγνωστους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τη μικροβιακή ανάπτυξη (Gram et al., 1996). Οι αλλοιώσεις που προκαλούνται οφείλονται στην αποδόμηση των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων (ξίνισμα ή ζύμωση), και στη διάσπαση των λιπαρών υλών (τάγγιση) (Ashie et al., 1996). Το αλλοιωμένο προϊόν έχει πλέον υποστεί μεταβολές οι οποίες το έχουν καταστήσει ακατάλληλο για κατανάλωση ή επεξεργασία, ενδεχομένως και επικίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου (Grigorakis et al., 2003).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποθήκευση των γαρίδων σε αερόβιες συνθήκες, οπότε η ομάδα των μικροοργανισμών που χαρακτηρίστηκαν ως EAM είναι αναμενόμενη και αναζητήθηκε στη βιβλιογραφία, ενώ ο παράγοντας που μεταβλήθηκε ήταν η θερμοκρασία αποθήκευσης. Αρχικά η Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα είναι στα επίπεδα των $3,77 \log \text{ cfu /g}$ και κατά τη συντήρηση παρουσιάζει αύξηση με σαφώς ταχύτερους ρυθμούς στη θερμοκρασία των 5° C , που φτάνει στα επίπεδα των $5,5 \log \text{ cfu /g}$ την ημέρα 7, ενώ στους 0° C ανέρχεται στα επίπεδα των $5,79 \log \text{ cfu /g}$ την ημέρα 9. Η OMX απαρτίζεται από Ειδικούς Μικροοργανισμούς Αλλοίωσης (EMA), των οποίων τα προϊόντα μεταβολισμού είναι υπεύθυνα για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές κατά την αλλοίωση των τροφίμων, την ποιοτική τους υποβάθμιση και τελικά την απόρριψη τους λόγω των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Η απουσία των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* έδειξε πως η περιοχή στην οποία αλιεύτηκαν οι γαρίδες είναι ελεύθερη λυμάτων ανθρώπινης δραστηριότητας, αλλά και από το πλήρωμα του αλιευτικού σκάφους τηρούνται κανόνες καλής υγιεινής οπότε οι γαρίδες ήταν ελεύθερες παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο βαθμός ανάπτυξης της μικροβιακής χλωρίδας των αλιευμάτων όπου και επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά είναι σημαντικός για την κατηγοριοποίηση τους σε προϊόντα εξαιρετικής, καλής ή κακής ποιότητας. Για τη διατήρηση της ασφάλειας αλλά και της ποιότητας των αλιευμάτων είναι απαραίτητο να εξακριβωθούν και να ρυθμιστούν όσα αποτελούν κίνδυνο για την ασφάλεια καθώς και οι παράγοντες εκείνοι που είναι ικανοί να τα αλλοιώσουν (Κυρμανίδου 2008). Τελικά, η απώλεια της διατηρησιμότητας ενός τροφίμου σημαίνει απώλεια και των οργανοληπτικών

χαρακτηριστικών και της θρεπτικότητας του τροφίμου. Τα κυριότερα αίτια αλλοίωσης που επηρεάζουν τη διατηρησιμότητα των τροφίμων οφείλονται σε φυσικούς (θερμοκρασία, οξυγόνο, φως, υγρασία), μικροβιολογικούς, χημικούς ή ενζυμικούς παράγοντες (αυτόλυση) είτε από φυσική βλάβη των ίδιων των προϊόντων όπως η κακή μεταχείριση στις διάφορες φάσεις επεξεργασίας τους.

Μία από τις ουσίες που παράγονται από τη μικροβιακή δραστηριότητα κατά την αλλοίωση, το Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο (TVB-N), χρησιμοποιείται ως ένας δείκτης αλλοίωσης. Ωστόσο, η χρήση τέτοιου χημικού δείκτη αλλοίωσης δεν επαρκεί για τον χαρακτηρισμό ή ακόμη περισσότερο για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των αλιευμάτων, γιατί οι τιμές του δεν μεταβάλλονται κατά το πρώτο ήμισυ ή ακόμη και τα 2/3 του εμπορικού χρόνου ζωής οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ως κριτήριο για την απόρριψη των αλιευμάτων και όχι για τη φρεσκότητά τους (Παρλαπάνη 2013). Όσον αφορά τα καρκινοειδή είναι γενικά αποδεκτό ότι το TVB-N δίνει καλύτερες τιμές και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης (Boziaris et al., 2011) ωστόσο στην δική μας περίπτωση δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο.

Ειδικότερα στα καρκινοειδή, σημαντικό ρόλο στην υποβάθμιση της ποιότητας ως προϊόν παίζει και η ενζυματική δραστηριότητα η οποία προκαλεί μελάνωση που ξεκινά από τον κεφαλοθώρακα. Ο μόνος τρόπος να διαπιστωθεί και να αξιολογηθεί η πορεία της ενζυματικής μελάνωσης είναι ο μακροσκοπικός έλεγχος για τη μεταβολή του χρώματος των γαρίδων. Η οργανοληπτική αξιολόγηση λοιπόν είναι σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της φρεσκότητας των γαρίδων. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης στην παρούσα εργασία προέκυψαν από την κατάταξη του προϊόντος αξιολογώντας συνολικά την οσμή, το χρώμα και τη γενική όψη του προϊόντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι φρέσκες γαρίδες σε θερμοκρασία συντήρησης 5° C (οικιακό ψυγείο) διατηρούνται για 2 ημέρες έχοντας όμως χάσει τα άριστα χαρακτηριστικά φρεσκότητας από την 1^η ημέρα. Στους 0° C (συντήρηση σε πάγο), μπορούν να διατηρηθούν για 5 ημέρες πριν απορριφθούν και σε αυτή τη θερμοκρασία οι γαρίδες μπορούν να διατηρήσουν τα άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους για 2 ημέρες. Συνεπώς η συντήρηση στους 0° C, επηρεάζει τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, μειώνοντας τον ρυθμό αύξησής τους, αλλά και τη δραστηριότητα των ενζύμων, παρατείνοντας έτσι την εμπορική ζωή των φρέσκων γαρίδων. Η εφαρμογή λοιπόν ψύξης για την συντήρηση των γαρίδων, μπορεί να αυξήσει τον χρόνο διατήρησης

καθυστερώντας σημαντικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στους 0° C, χωρίς βέβαια να σταματά. Στη θερμοκρασία συντήρησης των 5° C, και αφού οι κυριότεροι ΕΑΜ είναι ψυχρότροφοι, δεν αναστέλλεται σημαντικά η ανάπτυξή τους και ο χρόνος συντήρησης των γαρίδων σε αυτές τις συνθήκες είναι μικρός.

Συμπεράσματα

Είναι σίγουρο πως η θερμοκρασία συντήρησης των νωπών γαρίδων και κατ' επέκταση των καρκινοειδών έχει άμεση επίδραση στη διάρκεια συντήρησης και συνεπώς στη διάρκεια διατήρησης της εμπορεύσιμης ποιότητας. Το σημαντικότερο κριτήριο φρεσκότητας και εμπορευσιμότητας των γαρίδων είναι τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά κυρίως η οσμή και η εμφάνιση. Η μεταβολή στην οσμή είναι αποτέλεσμα κυρίως της ανάπτυξης και δραστηριότητας των μικροοργανισμών που επικρατούν έναντι άλλων κατά τη συντήρηση (Ειδικών Μικροοργανισμών Αλλοίωσης), ενώ η εμφάνιση εξαρτάται κυρίως από την εξέλιξη της διαδικασίας της αμαύρωσης. Η μεταβολή του TVB-N δεν ήταν τέτοια ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αλλοίωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Aitken, A., Mackie, I.M., Merritt, J.H. & Windsor M.L.** 1982. Fish handling & processing (Second edition). London: Ministry of Agriculture, Fisheries & Food.
- **Archer Michaela**, col, 2010, Sensory assessment scoresheets for fish and shellfish – Torry & QIM, Seafish.
- **Ashie, I.N.A., Smith J.P. and Simpson, B.K.** (1996). Spoilage and shelf-life extension of frsh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, pp. 87-121.
- **Baird-Parker T.** (2003). The production of microbiologically safe and stable foods. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Lund BM, Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., pp. 2080.
- **Baird-Parker, T.C.,** 2000. The production of microbiologically safe and stable foods. In: Lund, B.M., et al. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, pp. 3–18.
- **Berry T.M., Park, D.L. and Lightner, D.V.** (1994) *Comparison of the microbial quality of raw shrimp from China, Ecuador, or Mexico at both wholesale and retail levels*. *J. Food Prot.*, 57, 150–3
- **Bouletis A., Arvanitoyannis I., Hadjichristodoulou C., Neofitou C., Parlapani F., Gkagtzis D.** *Quality changes of cuttlefish stored under various atmosphere modifications and vacuum packaging*, *J Sci Food Agric* 2016; 96: 2882–2888.
- **Boziaris, S., Kordila, A. and Nefitou, 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* 2011, 46, 887–895
- **Boziaris I, Stamatiou A, Nychas G.,** *Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products*, *J.Sci.Food Agric*2013;93:1184–1190.
- **Boziaris I.,** *Food ingredients from the marine environment. Marine biotechnology meets food science and technology*, *Marine Biotechnology* November 2014 | Volume 1 | Article 66.

- **Boziaris I., Parlapani F.** (2017). In: Bevilacqua An., et al. (Eds.), *Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish, The microbiological Quality of Food, Foodborne Spoilers*, Woodhead Publishing, pp. 61- 98.
- **Brauer, J.M.E., Leyva, J.A.S., Alvarado, L.B. and Sandez, O.R.** 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Eur. Food Res. Technol.* 217: 277-280.
- **Cliver, D.** (1988) *Virus transmission via foods*. *Food Technol.*, 42, 241–8.
- **Comi G,** *Spoilage of Meat and Fish*, The Microbiological Quality of Food, Edited by Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo and Milena Sinigaglia Department of the Science of Agriculture Food and Environment (SAFE) University of Foggia, Foggia, Italy, Elsevier, 2017, pp 179-210
- **Coton, M., Joffraud, J.J., Mekhtiche, L., Leroi, F., Coton, E.,** 2013. *Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (Pecten maximus) meat during cold storage*. *Food Microbiol.* 35, 99-107.
- **Dalgaard P.** (2003). *Spoilage of Seafood*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier Science, pp. 2471.
- **FAO & WHO,** *Codex Alimentarius, Code of Practice for Fish and Fishery Products*, First edition, Rome, 2009 (CAC/RCP 52-2003).
- **Gram L., Dalgaard P.** (2002). *Fish spoilage bacteria-problems and solutions*. *Current opinion in Biotechnology*, 13, pp. 262-266.
- **Gram L., Huss H.H.** (1996). *Microbiological spoilage of fish and fish products*, *International Journal of Food Microbiology*, 33, pp. 121-137.
- **Gram L., Voges B.V.** (1999). *Shewanella*. Danish Institute for Fisheries Research, Department of Seafood Research, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark, Academic Press, pp. 2008-2015.
- **Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., Alexis, M.N.,** 2003. *Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (Sparus aurata): sensory differences and possible chemical basis*. *Aquaculture* 225, 109–119.
- **Harbell, S.,** 1988. *Controlling seafood spoilage*. In: *Seafood Retailing Series*, Washington Sea Grant, Seattle, pp. 1–7.
- <http://faculty.weber.edu/coberg/class/3853/3853%20MOs%20and%20Food%20Spoilage%20notes.htm>
- <http://www.fao.org/fishery/species/2587/en>

- <http://www.fao.org/fishery/species/2598/en>
- <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>
- **Huss H.H.** (1995). Quality and Quality changes in fresh fish, FAO Fisheries Technical Paper, 348, FAO, Rome, Italy.
- **Huss, H.H.** (2000). Prevention and control of hazard in seafood. Food Control 11, pp.149-156.
- **Hyldig Grethe, Green-Petersen M. B. Ditte**, *Quality Index Method – An Objective Tool for Determination of Sensory Quality*, Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 13(4) 2004
- **Jay, J. M.** (1986). *Microbial spoilage indicators and metabolites*. In M. D. Pierson, & N. J. Stern (Eds.), Food-borne microorganisms and their toxins: Developing methodology (pp. 219e240). New York, N.Y: Marcel Dekker, Inc
- **Jeong, J. W., Jo, J. H., Lim, S. D., and Kang, T. S.** 1991. Change in quality of frozen breaded raw shrimp by storage temperature fluctuation. Korean Journal of Food Science and Technology 23: 532–537.
- **Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.C.** 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). J. Food Sci. 56: 322- 326.
- **Kanduri Laxman, Eckhardt A. Ronald**: Food Safety in Shrimp processing, 2002, Fishing News Books.
- **Kluwer Academic / Plenum Publishers**, *Microorganisms in Foods 6*, Second Edition, New York, 2005
- **KOUKOURAS, A., DOUNAS, K., TURKAY, M. & VOULTSIADOU-KOUKOURA, E.** (1992): Decapod crustacean fauna of the Aegean Sea. New information, check list, affinities. -Senckenbergiana marit., 22 (3/6):217-244.
- **Koutsoumanis, K., and 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 100C. Applied and Environmental Microbiology 65, pp. 698-706.
- **Land, M. F.** 1996. Les yeux: structure et fonctionnement des mé canismes optiques. In Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Crustacés. Tome VII, Fascicule II. Généralités (suite) et Systématique, ed. J. Forest, 1–42. Paris: Masson, 1002 pp.

- **Lee, Y. C. and Um, Y. S.** 1995. Quality determination of shrimp (*Penaeus japonicus*) during iced and frozen storage. *Korean Journal of Food Science and Technology* 27: 520–524.
- **Lees, D.** (2000) *Viruses and bivalve shellfish*. *Int. J. Food Microbiol.*, 59, 81–116.
- **Manousaridis G., Nerantzaki A., Paleologos E. K., Tsiotsias A., Savvaidis I.N., Kontminas M.G.** (2005). Effect of ozone on microbial attributes of shucked mussels, *International Journal of Food Microbiology*, 22, pp. 1-9.
- **Martin W. Joel & Davis E. George**, *An Updated Classification of the Recent Crustacea*, December 14, 2001, Natural History Museum of Los Angeles County.
- **Martinez N., Martin M.C., Herrero A., Fernandez M., Alvarez M.A., Ladero V.** (2011) *qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. Review*. *Food Science and Technology*, 22: 367-376.
- **Monod, Th., and L. Laubier.** 1996. *Les Crustacés dans la Biosphère. In Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Crustacés*. Tome VII, Fascicule II. Généralités (suite) et Systématique, ed. J. Forest, 91– 166. Paris: Masson, 1002 pp.
- **Olafsdottir G., Martinsdottir E., Oehlenschläger J., Dalgaard P., Jensen B., Undeland I., Mackie I.M., Henehan G., Nielsen, J. Nilsen H.** (1997). *Methods to evaluate fish freshness in research and industry*, *Trends in Food Science and Technology*, 8, pp. 258-264.
- **Olsen, S.J., MacKinnon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H. and Slutsker, L.** (2000) *Surveillance for foodborne-disease outbreaks— United States, 1993–1997*. *Morbidity Mortality Weekly Report CDC Surveill. Summ.*, 49, 1–62.
- **Parlapani F., Haroutounian S, Nychas GJ, Boziaris I,** (2015). *Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2° C*, *Food Microbiology* 50, pp. 44 – 53.
- **Parlapani F, Verdos G, Haroutounian S, Boziaris I**(2015). *The dynamics of Pseudomonas and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C*, *Food Microbiology* 55, pp. 257 – 265.
- **Parlapani F., Mallouchos A, Haroutounian S, Boziaris I**(2017). *Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate*

un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria, Food Science and Technology 78, pp. 54 – 62.

- **Parlapani F., Kormas K., Boziaris I.** *Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis*, J Sci Food Agric 2015; 95: 2386–2394
- **Parlapani F., Boziaris I.** (2016). *Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures*, Food Science and Technology 66, pp. 553 – 559.
- **Qingzhu Z.**, 2003, *Quality Indicators of Northern Shrimp (Pandalus borealis) Stored under Different Cooling Conditions*. The United Nations University. Fisheries Training Programme.
- **Ringo E., Gatesoup F.-J.** (1998). *Lactic acid bacteria in fish: a review*, Aquaculture 160, pp. 177-203.
- **Robson A.A., Kelly S.M., Latchford W.J.**, 2006, *Effect of temperature on the spoilage rate of whole, unprocessed crabs: Carcinus maenas, Necora puber and Cancer pagurus*, Food Microbiology 24 (2007) 419–424.
- **Shahidi F., Synowiecki J.**, *Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (Chionoecetes opilio) and shrimp (Pandalus borealis) processing discards*, J. Agric. Food Chem., 1991, 39 (8), pp 1527–1532.
- **Shamshad S.I., Nisa K., Riaz M., Zuberi R.**, 1990. *Shelf life of shrimp (Penaeus merguensis) stored at different temperatures*. J. Food Sci. 55:1201-1205.
- **Wickins J.F., Lee D.O’C.**, 2002. *Food Safety and HACCP. In: Crustacean Farming*, second ed. Blackwell Science Ltd., London, pp. 306–311.

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Γεωργάκης Σ.Α, Βαρελτζής Κ.Π., Αμβροσιάδης Ι.Α.**, « Τεχνολογία Τροφίμων Ζωϊκής προέλευσης», Σύγχρονη Παιδεία, δεύτερη έκδοση, 2002
- **Κακάσης Στ.** (2011). Αξιολόγηση θρεπτικών υλικών για την καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών σε νωπούς ιχθύες. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία:

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

- **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2406/96** του Συμβουλίου της 26ης Νοεμβρίου 1996 περί καθορισμού κοινών προδιαγραφών εμπορίας ορισμένων αλιευτικών προϊόντων (ΕΕ L 334 της 23.12.1996, σ. 1)
- **Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων**, 2004, Κατάλογος Εμπορικών Ονομασιών Καν. (ΕΚ) 2065/2001, <http://www.alieia.minagric.gr/sites/default/files/basicPageFiles/Εμπορικές%20Ονομασίες%20ΙΟΥΛ2014.pdf>
- **Κούκουρας Α, Καλλιανιώτης Α, Παπακωνσταντίνου Κ, Βαφείδης Δ, Κίτσος Μ-Σ**, Διανομή και ενδαιτήματα των εμπορεύσιμων γαρίδων του Αιγαίου. Πρακτικά 5^{ου} Πανελληνίου Συμπόσιου Ωκεανογραφίας & Αλιείας 1997 – ΤΟΜΟΣ ΙΙ, σσ:95-98.
- **Κυρμανίδου, Α.** (2008). Μικροβιακές αλλαγές σε όστρακα διατηρημένα σε πάγο. Πτυχιακή Εργασία: Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.
- **Λαφτσιδής Κυριάκος**. Οδηγός υγιεινής για επιχειρήσεις μεταποίησης και εμπορίας αλιευμάτων. Διπλωματική Εργασία. Θεσσαλονίκη 2015, Τμήμα Χημείας, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Σπουδών, Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων.
- **Μπαλατσούρας Γ.** (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, σελ. 562.
- **Μπλούκας Ιωάννης**, Έπεξεργασία και συντήρηση τροφίμων, Εκδόσεις Σταμούλη, 2004.
- **Νυχάς, Γ.Ι.** Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **Παξινού Μαρία, Παπαγιαννοπούλου Ιωάννα, Τσαγκαράκη Όλγα** Εισηγήτρια : **Ψαρουδάκη Αντωνία**. Ο ρόλος των αλιευμάτων στη διατροφή και έρευνα επιπολασμού ως προς την κατανάλωσή τους σε τρεις περιοχές : Ηράκλειο, Ιθάκη, Κόρινθος, Πτυχιακή εργασία, ΣΗΤΕΙΑ 2008, ΤΕΙ ΣΗΤΕΙΑΣ, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας & Πρόνοιας. Τμήμα Διατροφής & Διαιτολογίας.
- **Παρλαπάνη Φωτεινή**, 2013, Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα, ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- **Τσακαλίδου Ε**, *Βιοχημεία Τροφίμων Ι*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου. Αθήνα 2015.
- **Αρβανιτογιάννης Ι, Σάνδρου Δ, Κούρτης Λ**, «*Ασφάλεια Τροφίμων*», University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2001
- **Hickman et al.** 2002, Ολοκληρωμένες Αρχές Ζωολογίας, εκδ. ΙΩΝ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

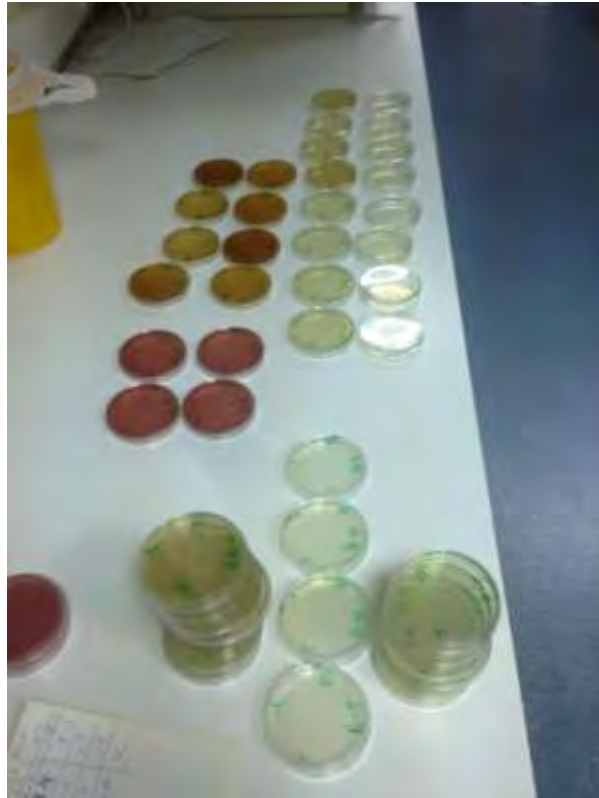
| ημέρα | OMX | Pseudomonas spp. | Βακτήρια που παράγουν H ₂ S | Οξυγαλακτικά Βακτήρια | Enterobacteriaceae |
|-------|------|------------------|--|-----------------------|--------------------|
| 0 | 3.77 | 3.62 | 3.25 | 2.42 | 0.00 |
| 1 | 3.32 | 3.73 | 4.04 | 2.52 | 0.00 |
| 2 | 3.35 | 3.41 | 3.05 | 2.22 | 0.00 |
| 3 | 3.32 | 3.54 | 2.00 | 2.60 | 0.00 |
| 4 | 3.69 | 4.12 | 3.67 | 2.18 | 0.00 |
| 5 | 3.88 | 3.90 | 4.46 | 2.96 | 0.00 |
| 6 | 4.76 | 5.29 | 3.48 | 3.60 | 0.00 |
| 7 | 4.48 | 4.96 | 4.16 | 3.60 | 0.00 |
| 8 | 5.12 | 5.63 | 4.24 | 3.62 | 0.00 |
| 9 | 5.79 | 6.28 | 3.95 | 3.66 | 0.00 |

Πίνακας 12. Μικροβιακή χλωρίδα (log cfu /g) γαρίδων στους 0° C.

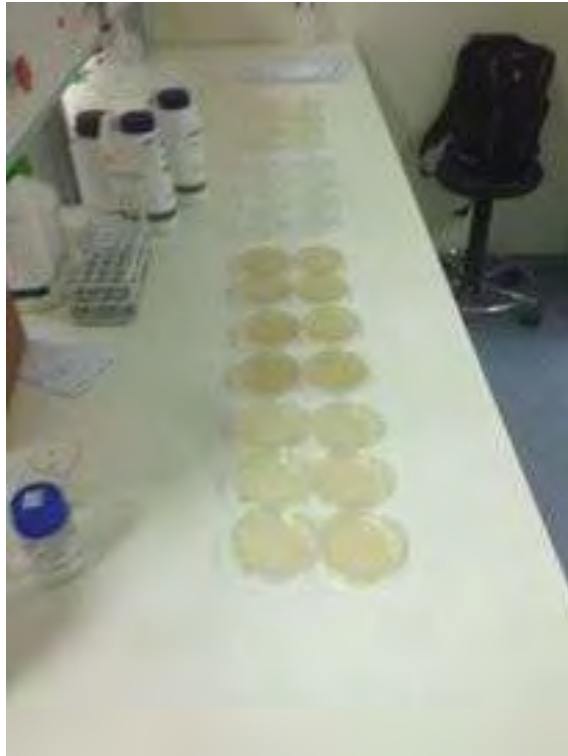
| ημέρα | OMX | Pseudomonas spp. | Βακτήρια που παράγουν H ₂ S | Οξυγαλακτικά Βακτήρια | Enterobacteriaceae |
|-------|------|------------------|--|-----------------------|--------------------|
| 0 | 3.77 | 3.62 | 1.00 | 2.42 | 0.00 |
| 1 | 2.87 | 3.43 | 1.30 | 3.09 | 0.00 |
| 2 | 3.80 | 4.32 | 2.30 | 2.70 | 0.00 |
| 3 | 4.18 | 4.13 | 2.98 | 2.75 | 0.00 |
| 4 | 4.87 | 5.98 | 3.00 | 2.89 | 0.00 |

| | | | | | |
|----------|------|------|------|------|------|
| 5 | 5.38 | 5.90 | 5.02 | 3.26 | 0.00 |
| 6 | 4.02 | 5.18 | 5.17 | 3.60 | 0.00 |
| 7 | 5.50 | 6.30 | 5.48 | 3.74 | 0.00 |

Πίνακας 13. Μικροβιακή χλωρίδα (log cfu /g) γαρίδων στους 5° C.



Εικόνα 11. Τρυβλία προς καταμέτρηση των μικροοργανισμών στο εργαστήριο



Εικόνα 12. Τρυβλία προς καταμέτρηση των μικροοργανισμών στο εργαστήριο

ABSTRACT

Microbial spoilage is the main quality deterioration cause for fresh crustaceans. A part of the original flora, either carried from their natural habitat or contaminated when handling occurs, on the outer surfaces of newly caught shrimps, are able to reach at high population levels i.e. $> 6 \log \text{ cfu /g}$. The bacteria activity causes changes to the shrimp's organoleptic characteristics. Those microorganisms are called Spoilage Specific Organisms (SSO). Moreover there are autolytic changes and enzymatic browning that takes place on the surface of the crustaceans.

The aim of this paper was to determine the shelf life of fresh crustaceans, their initial microbial quality and the growth of the spoilage microorganisms. The studied product was the caramote prawn *Penaeus kerathurus*. The prawns were stored at 0 and at 5o C, in aerobic environment, and classic techniques were used for monitoring the microbial changes. During storage, microorganisms produce volatile compounds (TVB-N) which was also determined.

It seems that the most important group of SSO, at all storage conditions, were *Pseudomonas* spp. The H₂S producing bacteria (mostly *Shewanella putrefaciens*) were fewer in number, as well as lactic acid producing bacteria. No evidence of Enterobacteriaceae was found.

The prawns stored at 0°C had larger shelf life than those stored at 5°C. The spoilage microbiota does not seem to differ compared to other crustaceans stored at the same conditions, although spoilage in prawns occurs almost right after catch, since they die almost immediately, unlike other crustaceans (lobsters, crabs) that stay alive longer.

Keywords: Specific Spoilage Organisms (SSO), crustaceans, *Penaeus kerathurus*, shelf-life, microbial spoilage, chemical spoilage index.