



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«Υδατοκαλλιέργειες» -**  
**«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»**

**ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**“Επίδραση της χιτοζάνης στο χρόνο συντήρησης (shelf-life)  
αποκελυφόμενων μυδιών *Mytilus galloprovincialis*”**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ**

Καλλιόπη Χατζηλάρη

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Ιωάννης Βάτσος

ΚΑΡΔΙΤΣΑ (Η ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ) 2012



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

---

**POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM**

***“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”***

***IN COLLABORATION WITH  
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

**Thesis:**

***“Effect of chitosan in the shelf-life of unshelled mussels *Mytilus galloprovincialis*”***

**POSTGRADUATE STUDENT**

Kalliopi Chatzilari

**SUPERVISOR**

Ioannis Vatsos

KARDITSA (or HGOUMENITSA) 2012

## ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία αφιερώνεται στα δύο πολυαγαπημένα μου παιδιά, Θεοδώρα και Μιχαήλ, που τους έλειψα σημαντικά κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού αυτού διπλώματος καθώς επίσης και στο σύζυγό μου κτηνίατρο Γεώργιο Μπακατάρη, ο οποίος με στήριξε αφάνταστα και συνέβαλε αποτελεσματικά στην πραγμάτωση της μεταπτυχιακής αυτής διετίας.

## Περίληψη

Εξαιτίας της αξιοσημείωτης ανάπτυξης της μυδοκαλλιέργειας στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια και επειδή τα οστρακοειδή αποτελούν μία υψηλής διατροφικής αξίας τροφή για τον άνθρωπο, κρίνεται απαραίτητη η διεξοδική μελέτη όσον αφορά την επίτευξη του βέλτιστου χρόνου συντήρησης των μυδιών του είδους *Mytilus galloprovincialis* που ευδοκιμούν στη χώρα μας και στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου.

Στην παρούσα εργασία τρεις ομάδες αποκελυφωμένων μυδιών εμβαπτίστηκαν για 30 min σε: αποστειρωμένο νερό, διάλυμα 5% χιτοζάνης (σε 0,5 % οξικό οξύ) και σε διάλυμα 0,5 % οξικού οξέος. Στην συνέχεια, τα μύδια τοποθετήθηκαν σε νερό και συντηρήθηκαν υπό ψύξη (4 °C). Κατά την διάρκεια της συντήρησης εκτιμήθηκαν η μεταβολή του pH, της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) αλλά και των *Pseudomonas spp.*, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των θειοαναγωγικών βακτηρίων και των εντεροβακτηριοειδών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η ομάδα των μυδιών που εμβαπτίστηκαν μόνο σε νερό για 30 λεπτά, ο αποδεκτός χρόνος συντήρησης στην ψύξη ήταν 4 ημέρες, ενώ στις ομάδες των μυδιών που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης και οξικού οξέος για 30 λεπτά, ο αποδεκτός χρόνος συντήρησής τους υπό ψύξη (με βάση τους μικροβιολογικούς δείκτες) επιμηκύνθηκε και έφτασε στις 6 ημέρες.

Όμως η χιτοζάνη δεν φαίνεται να είχε κάποια επίπτωση στον χρόνο συντήρησης των μυδιών, ενώ το αποτέλεσμα οφειλόταν στην ύπαρξη οξικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την διάλυση της χιτοζάνης. Περαιτέρω έρευνα της επίδρασης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τις σάρκας των μυδιών που εμβαπτίστηκαν στο οξικό οξύ

είναι απαραίτητη, προτού χρησιμοποιηθεί αυτό το οξύ ως παράγοντας βελτίωσης του χρόνου συντήρησης των μυδιών.

## **Abstract**

Due to the remarkable development of the mussel culture in Greece in the last decades and due to the high nutritional value of the mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured Greece and in the Mediterranean area, an intensive study of the optimization of the period of time during which the mussels can be stored (self-life) at 4 °C until consumption is of great importance.

In the present study, three groups of mussels cultured in the north of Greece were obtained and after removing their valves, they were immersed in: sterile water, a solution of 5% chitosan (in 0,5% acetic acid) and a 0,5% v/v solution of acetic acid for 30 min. Subsequently the mussels were placed into sterile water and stored at 4 °C. The change in their pH, as well as the increase in the total viable count (TVC) and the changes in the cfu/ml of *Pseudomonas* spp., *Lactic acid bacteria*, *Enterobacteriaceae* and H<sub>2</sub>S-producing bacteria for a period of six days were recorded and evaluated.

According to the results of this study, the mussels that were immersed only in sterile water appeared to have a shelf-life of 4 days, whereas the mussels that were immersed in chitosan and in acetic acid prior to their storage at 4 °C, appeared to have a shelf-life of 6 days.

However, the chitosan was considered to have no effect on the shelf-life and the inhibition of the microbial growth was due to the use of acetic acid to increase the solubility of chitosan. Further evaluation of the effect on the organoleptic characteristics of the treated mussels is required prior to a more extensive application of the acetic acid as a factor to increase the shelf-life of the mussel meat.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου κο Ιωάννη Βάτσο για την πολύτιμη βοήθειά του και την εξαιρετική συνεργασία που μου προσέφερε στην εκπόνηση του επιστημονικού πειράματος και τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων του Α.Π.Θ για την εκπαίδευση σχετικά με τη μικροβιολογία των τροφίμων που μου παρείχαν ώστε να μπορέσω ν' ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις του πειράματος της εργασίας μου.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού διπλώματος κα Φωτεινή Αθανασοπούλου , διότι επιλέγοντάς με, μου έδωσε την ευκαιρία να διεκδικήσω την κατάκτηση του μεταπτυχιακού διπλώματος της Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>Σελ.1</b>
1.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΟΣΤΑΚΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>MYTILUS</i>	Σελ.1
1.2 Η ΜΥΔΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ	Σελ.4
1.3 ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Σελ.7
1.4 ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΜΥΔΙΩΝ	Σελ.11
1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ	Σελ.13
1.5.1 Μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Σελ.16
1.5.2 Βιοχημικές μεταβολές	Σελ.19
1.5.3 Μικροβιακές μεταβολές	Σελ.22
1.6 ΧΙΤΟΖΑΝΗ	Σελ.28
1.6.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	Σελ.28
1.6.2 Συνδυασμός χιτοζάνης και όζοντος ως απολυμαντικά	Σελ.31
1.6.3 Συνδυασμός χιτοζάνης και γαλακτικού οξέος	Σελ.36
1.7 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	Σελ.39
1.8 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	Σελ 44
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>Σελ.45</b>
2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	Σελ.45
2.2 Μέτρηση της τιμής του pH	Σελ.49
2.3 Αρίθμηση των ψυχρότροφων βακτηρίων	Σελ.49
2.4 Αρίθμηση των ψευδομονάδων	Σελ.52
2.5 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	Σελ.54



2.6 Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών	Σελ.55
2.7 Αρίθμηση των θειοαναγωγικών βακτηρίων	Σελ.55
2.8 Στατιστική επεξεργασία	Σελ.57
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>Σελ.58</b>
3.1 Μεταβολή pH	Σελ.58
3.2 Αρίθμηση των ψυχρότροφων βακτηρίων	Σελ.58
3.3 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	Σελ.61
3.4 Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών	Σελ.63
3.5 Αρίθμηση των θειοαναγωγικών βακτηρίων	Σελ.67
3.6 Αρίθμηση των ψευδομονάδων	Σελ.71
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>Σελ.76</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>Σελ.84</b>
<b>5 . ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>Σελ.85</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΟΣΤΡΑΚΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *MYTILUS*

Στην Ευρώπη υπάρχουν διαδεδομένα τρία είδη μυδιών του γένους *Mytilus*, το *Mytilus edulis* (blue mussel - μπλε μύδι), το *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel – μεσογειακό μύδι) και το *Mytilus trossulus* (Baltic mussel – μύδι της Βαλτικής) (Gosling, 1992 - Koehn, 1991).

Το μύδι της Βαλτικής γενικότερα θεωρείται ότι ευδοκίμει μόνο στη Βαλτική θάλασσα και δεν υπάρχει σημαντική αλιεία ή υδατοκαλλιέργεια γύρω από το συγκεκριμένο είδος. Αντίθετα, υπάρχει εκτεταμένη θαλασσοκαλλιέργεια για το μπλε και το μεσογειακό μύδι, τα οποία διανέμονται σε διάφορες περιοχές, έχουν την ικανότητα της υβριδοποίησης και τα υβρίδιά τους είναι γόνιμα.

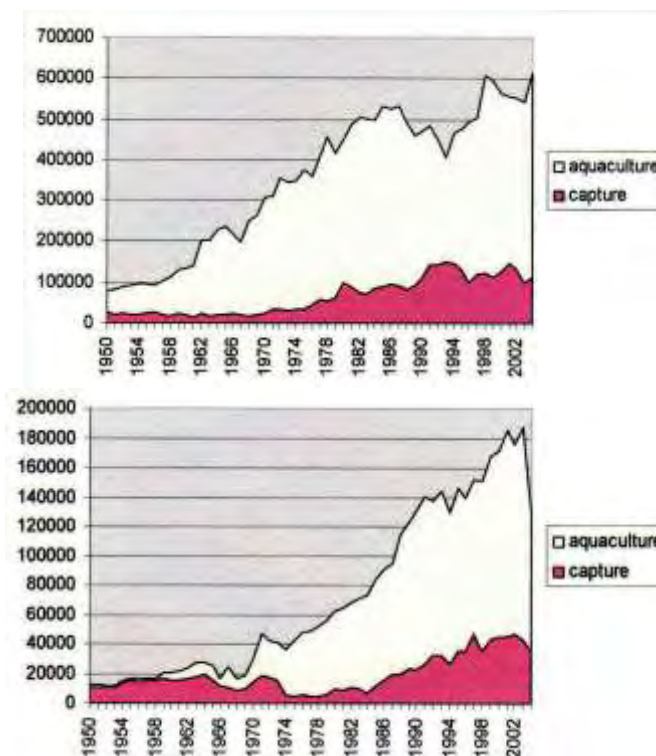
Από το 1995 υπάρχει μία γενετική μέθοδος βασισμένη στο DNA των ανωτέρω ειδών, σύμφωνα με την οποία γίνεται η ταυτοποίηση αυτών και των υβριδίων τους που εκτείνονται από τη γαλλική ακτή του Ατλαντικού έως και τη βόρεια Σκωτία.



**Εικόνα 1:** Γεωγραφική κατανομή των ειδών *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* στην Ευρώπη (Gosling, 1992)

Τα εμπορικά είδη που εκτρέφονται στον κόσμο είναι: το κοινό ή μπλε μύδι *Mytilus edulis*, το Μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis* και κάποια είδη τροπικά, υποτροπικά του γένους *Perna* όπως το *P. viridis* στην Ινδία και Άπω Ανατολή (Ινδονησία, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Σιγκαπούρη, Ταϊλάνδη), *P. canaliculus* στη Ν. Ζηλανδία και το είδος *P. perna* σε Βενεζουέλα, Εκουαδόρ, Βραζιλία, Ν. Αφρική (Spencer, 2002). Επίσης τα είδη *Mytilus chilensis* στην Χιλή, *M. smaragdinus* σε Ταϊλάνδη και Φιλιππίνες, το *M. planatulus* στην Αυστραλία και *M. coruscus* στην Κορέα (FAO ,1999).

Τα περισσότερο διαδεδομένα ανά τον κόσμο είδη μυδιών που εκτρέφονται κυρίως στην Ευρώπη είναι το *Mytilus edulis* και κυρίως το *Mytilus galloprovincialis*. Η συνολική Ευρωπαϊκή παραγωγή μυδιών των ανωτέρω ειδών από υδατοκαλλιέργεια και αλιεία κατά τα έτη 1950 – 2004 φαίνεται στην εικόνα 2 σύμφωνα με στοιχεία του FAO (2006).



**Εικόνα 2:** Συνολική παραγωγή μυδιών (υδατοκαλλιέργεια και αλιεία) κατά τα έτη 1950-2004 των ειδών *M. edulis* ( πάνω ) και *M. galloprovincialis* ( κάτω )

Με βάση τα στοιχεία του έτους 2005 (Eurostat 2008) η παγκόσμια παραγωγή μυδιών πλέον είναι περίπου 1.800.000 t, εκ των οποίων περίπου 100.000 t αποτελούν την παραγωγή του μεσογειακού μυδιού *Mytilus galloprovincialis*. Η ίδια πηγή αναφέρει ότι η συνολική ευρωπαϊκή παραγωγή *Mytilus galloprovincialis* είναι λίγο μικρότερη από 100.000 t, και η Ελλάδα παρουσιάζει το 1/5 της ευρωπαϊκής παραγωγής.

Τα μύδια καλλιεργούνται σε πολλές περιοχές στον κόσμο (Εικ.3) και κυρίως τα είδη *Mytilus edulis* και *Mytilus galloprovincialis*.

Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί μυδιών είναι η Κίνα, η Ισπανία, η Ολλανδία, η Δανία, η Ιταλία και η Ελλάδα. Στην χώρα μας καλλιεργείται κατεξοχήν το είδος *Mytilus galloprovincialis*, του οποίου η παγκόσμια εξάπλωση φαίνεται στην Εικ.3.



**Εικόνα 3:** Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση του *M. Galloprovincialis*.

Το *Mytilus galloprovincialis* συναντάται σε ηπειρωτικά κλίματα αλλά σε πιο θερμά νερά. Στην Ευρώπη εμφανίζεται στις νήσους της Βρετανίας, στην Ιβηρική Χερσόνησο και στην Μεσόγειο. Στο βόρειο ημισφαίριο συναντάται στην νότια Καλιφόρνια, την Ιαπωνία, το Χόνγκ Κόνγκ και κατά μήκος της ανατολικής ακτής της

Κίνας, ενώ στο νότιο ημισφαίριο στην δυτική Αυστραλία, την Τασμανία, τη Ν. Ζηλανδία και την Ν. Αφρική (Spencer 2002).

## **1.2 Η ΜΥΔΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Όσον αφορά τη χώρα μας, η καλλιέργεια οστρακοειδών έχει μία μακρά ιστορία που ξεκινά από τον 4<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. Σήμερα συναντάται στην Αλεξανδρούπολη, στον Αμβρακικό, στο Πόρτο-Λάγος, στο Μαλιακό, στο Σαρωνικό, στο Στρυμονικό και κυρίως στους κόλπους Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού ( Εικ.4).



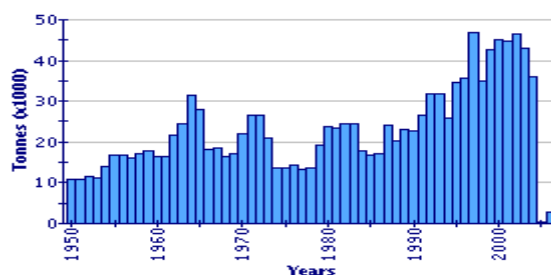
**Εικόνα 4:** Κύριες περιοχές της Ελλάδας στις οποίες καλλιεργείται το μύδι *Mytilus galloprovincialis*

1=Αλεξανδρούπολη, 2=Πόρτο-Λάγος, 3=Στρυμονικός, 4=Θεσσαλονίκη και Θερμαϊκός,  
5= Αμβρακικός, 6= Μαλιακός, 7= Σαρωνικός ( Γαληνού - Μητσούδη, 1999).

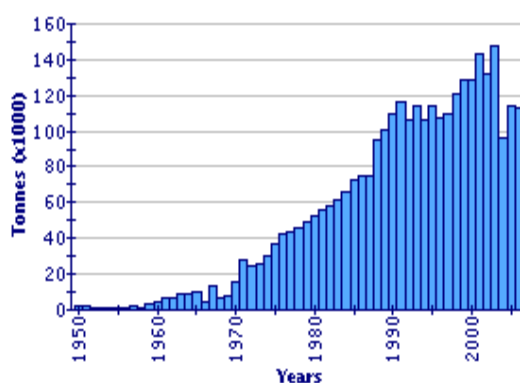
Με βάση τα στοιχεία του έτους 2004 (FAO Fishery Statistics) η καλλιέργεια οστρακοειδών, προσφέρει σήμερα στην παγκόσμια κατανάλωση, περίπου 13.000.000 t, εκ των οποίων 1.900.000 t είναι τα μύδια (Εικ 1.2.1.). Η ευρωπαϊκή παραγωγή

οστρακοειδών είναι περίπου 750.000 εκ των οποίων 600.000 είναι μύδια και η παραγωγή της στο μεσογειακό μύδι ανέρχεται σε 95.000. Απ' αυτήν οι 30.000 μυδιών αποτελούν την ελληνική παραγωγή. Το 80-90 % της παραγωγής αυτής εξάγεται κυρίως στην Ιταλία.

Η ανάπτυξη της μυδοκαλλιέργειας ξεκίνησε στην Ελλάδα από το 1980 και κορυφώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990, πιο συγκεκριμένα τα έτη 1995-1999. Συγκριτικά με την Ευρώπη, η ανάπτυξη των μυδιών στην Ελλάδα έγινε 20 χρόνια αργότερα. Η εξέλιξη της παγκόσμιας αλίευσης και παραγωγής μυδιών του είδους *Mytilus galloprovincialis* φαίνεται στις εικόνες 5 και 6.



Εικόνα 5: Παγκόσμια αλίευση μυδιού *Mytilus galloprovincialis*(Eurostat, FAO, 2004)



Εικόνα 6: Παγκόσμια παραγωγή του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* από μυδοκαλλιέργειες (Eurostat, FAO, 2004)

Η μυδοκαλλιέργεια είναι μια μη εντατική μορφή εκτροφής που στηρίζεται στις φυσικές διαδικασίες για την προμήθεια γόνου και τροφής (Inglis et al, 2000). Η επιλογή της μεθόδου καλλιέργειας ανά τον κόσμο εξαρτάται από τη θέση, το κόστος και την λειτουργία της εγκατάστασης.

Σήμερα τα πιο διαδεδομένα συστήματα εκτροφής που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: α) Καλλιέργεια βυθού, β) Καλλιέργεια στη στήλη νερού, γ) Το πασσαλωτό (pole), δ) Σύστημα με σχεδίες (raft) και ε) Το πλωτό σύστημα (longline).



**Εικόνα 7:** Σύστημα με σχεδίες ( raft ) που χρησιμοποιείται στην Ισπανία ( FAO, 2006)

Στη χώρα μας χρησιμοποιούνται κυρίως το πασσαλωτό και το πλωτό σύστημα στις περιοχές της Θεσσαλονίκης, του Θερμαϊκού, της Πιερίας και της Ημαθίας όπου υπάρχουν οι περισσότερες μυδοκαλλιέργειες, συγκριτικά με την υπόλοιπη επικράτεια.

Το πασσαλωτό (pole) πραγματοποιείται με τη βύθιση ξύλινων πασσάλων στον πυθμένα της θάλασσας, πάνω στους οποίους τυλίγονται ελικοειδείς αρμαθίες με τα μύδια(στα γαλλικά bouchot). Τοποθετούνται στη μεσοπαραλιακή ζώνη ώστε να είναι 2-3cm πάνω από τον πυθμένα.(Gosling, 1992)

Το πλωτό σύστημα (longline) αποτελείται από ένα οριζόντιο σχοινί από πολυπροπυλένιο (μάνα) που επιπλέει στην επιφάνεια ή 1,5-3 m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας με την βοήθεια πλωτήρων, (Εικ. 8) από όπου κρέμονται

σχοινιά με μύδια, σε απόσταση 50 cm μεταξύ τους. Σε ισχυρά ρεύματα, τοποθετούνται βαρίδια στα σχοινιά για να διατηρούνται κάθετα. Ο αριθμός και το μέγεθος των πλωτήρων εξαρτάται από το βάρος που πρόκειται να σηκώσουν (π.χ. ένα σχοινί μήκους 200 m και διαμέτρου 18-30 mm στηρίζεται σε 25-30 πλωτήρες που έχουν απόσταση μεταξύ τους 0,5-1,5 m). Τα κάθετα σχοινιά είναι μήκους 4-6 m και διαμέτρου 14-18 mm. Τοποθετούνται κατά μήκος των σχοινιών ξύλινες σφήνες μήκους 25 mm κάθε 25-40 cm, για να εμποδίσουν τα μύδια να «χυθούν», πρακτική που ακολουθείται και στις σχεδίες (Spencer 2002).



**Εικόνα 8:** Καλλιέργεια μυδιών με πλωτό σύστημα ([http 1](http://1))

### **1.3 ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ *M. galloprovincialis***

Στη χώρα μας καλλιεργείται το μύδι *Mytilus galloprovincialis*, γνωστό ως μεσογειακό μύδι, ευρέως διαδεδομένο σε ολόκληρη τη Μεσόγειο, αλλά και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης.





**Εικόνα 9:** *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck,1819) -http2

Τάξη: Animalia

Φύλο: Mollusca

Κλάση: Bivalvia

Οικογένεια: Mytilidae

Γένος: *Mytilus*

Είδος: *Mytilus galloprovincialis*

Το χρώμα του *M. galloprovincialis* είναι σκούρο μπλε ή καστανόχρωμο, σχεδόν μαύρο-ιώδες. Οι δύο θύρες είναι σχεδόν τριγωνικές και αποστρογγυλέμενες. Η μορφή του κελύφους ποικίλλει ανά περιοχή. Τείνει επίσης να γίνει μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα είδη της ίδιας οικογένειας, μέχρι 15 cm, αν και χαρακτηριστικό του μέγεθος είναι από 5 – 8 cm. Μπορεί να βρεθεί από εκτεθειμένες βραχώδεις περιοχές μέχρι και σε αμμώδεις ακτογραμμές. Σε αντίθεση με άλλα είδη εμφανίζει μεγάλη ανοχή στον έντονο υδροδυναμισμό και στις επιδράσεις της παλίρροιας (Carlton 1992). Το εμπορεύσιμο μέγεθος είναι μεγαλύτερο των 5 cm (ΠΔ. 86/1998 όπως τροποποιήθηκε από το ΠΔ. 227/2003). Το σώμα του *M. galloprovincialis* περικλείεται από το όστρακο και έχει δίλοβο μανδύα. Ο μανδύας εξωτερικά είναι

προσκολλημένος στο εσωτερικό των θυρίδων του οστράκου. Στο μανδύα βρίσκονται και οι γονάδες. (Εικ. 10).



**Εικόνα 10:** Ο μανδύας και οι γονάδες του *Mytilus galloprovincialis*(http3)

Φέρει δύο ζεύγη βραγχίων, τα οποία είναι τα όργανα αναπνοής του και εξυπηρετούν στην τροφοληψία διότι συμβάλλουν στο διαχωρισμό των κατάλληλων, από άποψη μεγέθους, μεριδίων τροφής, προωθώντας τα στο στόμα. Επίσης υπάρχει το πόδι με το βύσσο. Στην βάση του μανδύα (περιοχή συνδέσμου - ένωση των θυρίδων), βρίσκεται η σπλαχνική μάζα (Gosling 2003).

Το μύδι είναι διηθηματοφάγος οργανισμός, διηθεί το θαλασσινό νερό με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του και της θερμοκρασίας του νερού, συγκρατώντας έτσι τα κατάλληλα μερίδια τροφής διαστάσεων 1-25  $\mu\text{m}$ , αποβάλλοντας τα υπόλοιπα ως ψευδοκόπρανα (Γαληνού-Μητσούδη 2003).

Το μήκος του μυδιού μπορεί να ξεπεράσει τα 10-13 cm ( Gosling, 2003).

Οι ρυθμοί αύξησης στο *Mytilus* spp. είναι εξαιρετικά μεταβλητοί. Μέρος αυτής της διακύμανσης εξηγείται από το γονότυπο ( Walters, 2008), αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης είναι πιθανότατα το περιβάλλον. Οι ακόλουθοι παράγοντες επηρεάζουν τα ποσοστά ανάπτυξης στο *Mytilus* spp. Απ' αυτούς κάποιοι

μπορεί να επιδράσουν από κοινού, ανάλογα με την τοποθεσία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Seed & Suchanek, 1992 ).

1. Θερμοκρασία
2. Αλατότητα
3. Διαθεσιμότητα τροφής
4. Έκθεση στην παλίρροια
5. Ενδοειδικός ανταγωνισμός για χώρο και τροφή
6. Παρασιτισμός

Σύμφωνα με τον Arial (1997) το *Mytilus galloprovincialis* φτάνει τα  $72,84 \pm 0,74$  mm μήκος σε 18 μήνες στην Μαύρη θάλασσα (Τουρκία.), ενώ στην Ιταλία η ανάπτυξη του *M. galloprovincialis* είναι ραγδαία φτάνοντας σε μήκος 50,00 mm σε περίπου 14,5 μήνες από την εγκατάστασή τους (Ceccherelli & Rossi 1984).

Εκτός από τους γρήγορους ρυθμούς αύξησης, τα μύδια έχουν και μεγάλη θρεπτική αξία εξαιτίας της περιεκτικότητας της σάρκας τους σε πρωτεΐνες, συνεπώς αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τους υδρόβιους οργανισμούς και για τον άνθρωπο. Η θρεπτική τους αξία και ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξής τους από την άλλη, τους καθιστούν πολύ καλούς οργανισμούς για καλλιέργεια (Αντωνιάδου, 2003).

Ένα μύδι περιέχει 79-83% υγρασία, πρωτεΐνη 11-13% υψηλής βιολογικής αξίας, 2,0-2,3% υδατάνθρακες, 1,5- 1,8% λίπος και 0,35% μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις (Metaxatou, 1998). Αποτελεί τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και χοληστερόλη (King et al., 1990). Η σάρκα έχει υψηλή αναλογία λιπαρών οξέων Ω3/Ω6 με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Η αύξηση των Ω3 λιπαρών οξέων στο αίμα συμβάλλει στη χαμηλή εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών και θνησιμότητας από αρτηριοσκλήρυνση και καρδιακές παθήσεις (Vasakou et al., 2003).

Τα μύδια, τόσο ωμά όσο και μεταποιημένα, είναι τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας και διαιτητικά. Παρέχουν φθηνή, καλής ποιότητας πρωτεΐνη( σε ποσοστό 60% επί της ξηρής ουσίας τους) (Choo and Ng, 1990). Είναι φτωχά σε λίπος και χοληστερόλη και πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ( σε ποσοστό 42-45% των ολικών λιπαρών οξέων) (Orban et al.,2002), τα οποία πολυακόρεστα (Ω3-Ω6) είναι βιολογικά σημαντικά διότι μειώνουν σε μεγάλο βαθμό τον κίνδυνο καρδιακής νόσου (Kromhout et al., 1985). Επίσης είναι πλούσια σε λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές βιταμίνες ( A, B1, νιασίνη, B2, C, D, E) και μακροστοιχεία ( Fe, Ca ) (Cheong and Lee, 1984).

#### **1.4 ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΜΥΔΙΩΝ**

Η Ελλάδα παράγει περισσότερο από 25.000 τόννους μυδιών *Mytilus galloprovincialis* το χρόνο, ποσό το οποίο έχει διπλασιαστεί τις τελευταίες δεκαετίες ( Vareltsis, 1996). Περισσότερο από το 90% αυτής της ποσότητας προέρχεται από μυδοκαλλιέργειες της Βόρειας Ελλάδας ( περιοχή Πιερίας, Ημαθίας και Θεσσαλονίκης ).

Σύμφωνα με την Εθνική και Κοινοτική νομοθεσία που στοχεύει στην προστασία των καταναλωτών, όλες οι ποσότητες οστρακοειδών που προορίζονται για κατανάλωση πρέπει υποχρεωτικά να περνούν από τα Κέντρα Καθαρισμού Οστρακοειδών. Η διαδικασία αυτή καλείται εξυγίανση και ισχύει για τα μύδια, όπως και για όλα τα υπόλοιπα οστρακοειδή που αλιεύονται στις ελληνικές θάλασσες. Σε αυτές τις εγκαταστάσεις, μέσω κλειστών κυκλωμάτων νερού και με τη βοήθεια μηχανικών, βιολογικών και χημικών διεργασιών, γίνεται επεξεργασία του ανακυκλοφορούμενου νερού και καθώς τα μύδια διηθούν αλληπάλλληλα το νερό, απαλλάσσονται τελικά από τοξικές ουσίες και παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μετά την απαραίτητη για τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή εξυγίανση, τα μύδια διακινούνται στην ελληνική αγορά με δύο μορφές: α) με κέλυφος σε ειδικά δίχτυα και β) αποκελυφωμένα σε ειδική πλαστική σακούλα από πολυαιθυλένιο. Επίσης διακινούνται νωπά και κατεψυγμένα στον ελλαδικό χώρο, αλλά γίνονται και εξαγωγές σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Στη θαλάσσια περιοχή που ξεκινά να εκτείνεται ανατολικά του Αξιού ποταμού φθάνοντας έως το Κίτρος βρίσκονται το 80-90% των μυδοπαραγωγικών εγκαταστάσεων της Ελλάδας, με ανάλογο μερίδιο και στην εθνική παραγωγή. Ένα μέρος των παραγωγής μυδιών διατίθεται στην ελληνική αγορά, ενώ μεγάλο μέρος εξάγεται στις αγορές της Ιταλίας, Γαλλίας και Ισπανίας. Η αυξανόμενη μάλιστα ζήτηση των μυδιών στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη και την υγιεινή των μυδιών οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής.

Στις νέες μονάδες των οστρακοκαλλιεργητών, απασχολούνται πολλές οικογένειες της περιοχής, ενώ οι επενδύσεις που έχουν γίνει επιτρέπουν στους καταναλωτές να απολαμβάνουν φρέσκο μύδι, τυποποιημένο ή μη, που φθάνει στο τραπέζι με τις κατάλληλες εγγυήσεις και συνθήκες υγιεινής. Το μύδι οστρακοκαλλιέργειας μεγαλώνει στους φυσικούς χώρους που μεγαλώνει και το ελεύθερο μύδι, σε φυσικές συνθήκες. Η αποφλοιώση γίνεται σε αποφλοιωτήρια που είναι εγκεκριμένα από τις αρμόδιες Υπηρεσίες Αλιείας.

Στο Δήμο Αξιού, υπάρχουν 26 οικογένειες του διαμερίσματος των Κυμίων και 17 του διαμερίσματος των Μαλγάρων που έχουν ως βασική οικονομική δραστηριότητα την καλλιέργεια μυδιού, ενώ στο Δήμο Χαλάστρας υπάρχουν 250 οικογένειες που ασχολούνται με την καλλιέργεια του μυδιού και την αλιεία, είτε ως οικογενειακές επιχειρήσεις είτε ως εργαζόμενοι σε αντίστοιχες επιχειρήσεις ή αποφλοιωτήρια. Στο Δήμο Αξιού παράγονται συνολικά 7000 τόνοι ετησίως (5000

στα Κύμينا και 2000 στα Μάλγαρα), ενώ στο Δήμο Χαλάστρας παράγονται περίπου 5000 τόνοι, από τους οποίους το μεγαλύτερο ποσοστό εξάγεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Τα Κέντρα Αποστολής Οστρακοειδών έχουν αναλάβει τη διακίνηση των μυδιών και τον συστηματικό τους έλεγχο όσον αφορά στην υγιεινή κατάσταση των προϊόντων, αποκελυφωμένων ή μη, πριν αυτά αποσταλούν. Στην εσωτερική αγορά τα μύδια διατίθενται κυρίως σε ψύχα, δηλαδή αποφλοιωμένα και λιγότερο σε όστρακο. Το φρέσκο μύδι ξεχωρίζει από το κλειστό γυαλιστερό όστρακό του, το ευχάριστο θαλασσινό του άρωμα και την αφθονία του σε νερό εσωτερικά. Το 80% των μυδιών με κελύφη εξάγονται κυρίως στην Ιταλία και λιγότερο στην Ολλανδία και Γαλλία. ([http4: www.terresdeau.gr](http://www.terresdeau.gr))

## **1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΔΙΩΝ**

Ο υψηλός συντελεστής ενεργού νερού των μυδιών ( $a_w > 0.95$ ), η υψηλή περιεκτικότητά τους σε γλυκογόνο και ελεύθερα αμινοξέα καθώς και το υψηλό pH (6.7-7.1), τα κάνουν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Jay, 2005).

Η μικροβιακή χλωρίδα των μυδιών ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα του νερού από το οποίο αλιεύονται καθώς και του νερού πλυσίματος, αλλά και από πολλούς άλλους παράγοντες.

Τα κύρια γένη των βακτηρίων που αναπτύσσονται στα μύδια όπως και στα περισσότερα υπόλοιπα όστρακα είναι τα ακόλουθα: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Serratia* and *Flavobacterium*. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης επικρατούν τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* και ορισμένες ζύμες στα τελευταία στάδια (Jay, 2005).

Τα μύδια προωθούνται στην ελληνική αγορά φρέσκα ή μεταποιημένα. Οι συνήθεις μέθοδοι μεταποίησης περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την κονσερβοποίηση και το μαρινάρισμα. Τα φρέσκα μύδια πωλούνται ολόκληρα με το κέλυφος διατηρημένα σε πάγο, ή σε συσκευασίες από πολυαιθυλένιο μέσα σε αποστειρωμένο νερό και διατηρημένα σε ψύξη. Και στις δύο περιπτώσεις ο χρόνος συντήρησης (shelf-life) των ωμών μυδιών στην ψύξη δεν είναι μεγαλύτερος των 6-7 ημερών.

Ο όρος shelf-life έχει επικρατήσει στην ορολογία των τροφίμων και αποδίδεται στην χρονική εκείνη περίοδο που τα τρόφιμα είναι ασφαλή για την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο, πριν ακριβώς αρχίσει η αλλοίωσή τους. Το shelf life ενός προϊόντος ξεκινά από την ώρα παραγωγής ή κατασκευής αυτού και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι τα συστατικά του, η διαδικασία παρασκευής του, το είδος της συσκευασίας και ο τρόπος της αποθήκευσης αυτού. (<http5>)

Επειδή λοιπόν όπως αναφέρθηκε παραπάνω το shelf life των ωμών μυδιών δεν ξεπερνά τη μία εβδομάδα με τον κλασικό τρόπο συντήρησής τους στην ψύξη, υπάρχει μία διαρκής ανάγκη ανάπτυξης νέων τεχνολογιών και αποτελεσματικότερων μεθόδων συντήρησης, οι οποίες να επιτρέπουν παράταση του χρόνου συντήρησης των θαλάσσιων αυτών προϊόντων της χώρας μας. Τέτοιοι τρόποι είναι: α) η χρησιμοποίηση όζοντος και β) η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (modified atmosphere packaging – MAP).

Η χρήση του όζοντος για την αύξηση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων ξεκίνησε τυχαία το 1909 σε μία αποθήκη τροφίμων στην Κολονία της Γερμανίας, όταν παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια ενός τεμαχίου κρέατος μετά την εγκατάσταση μίας γεννήτριας όζοντος μέσα στο χώρο της εν λόγω αποθήκης (Rollex Australasia LTD, 1999). Έτσι σήμερα το όζον είναι ένα άριστο απολυμαντικό μέσο και με τη χορήγησή του καταπολεμάται ο πληθυσμός της

ολικής μικροβιακής χλωρίδας, οπότε αυτόματα αυξάνεται ο χρόνος συντήρησης (shelf life) των τροφίμων. Συγκεκριμένα για τα μύδια, το όζον αποτελεί αποτελεσματικό μέσο για την εξυγίανσή τους πριν τη διακίνησή τους στην εγχώρια ή ξένη αγορά.

Σε πείραμα που διεξήχθη σε μεσογειακά μύδια (Manousaridis et al, 2004) που διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε συσκευασία κενού (vacuum-packaged), χορηγήθηκε ατμόσφαιρα όζοντος για 60 min και 90 min, με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησής τους. Στον πίνακα 1 που ακολουθεί φαίνεται η εμφανής μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας των μυδιών, ιδιαίτερα στα 90 min χορήγησης.

**Πίνακας 1.** Επίδραση της ατμόσφαιρας όζοντος στην ολική μικροβιακή αερόβια χλωρίδα (OMX) σε μύδια διατηρημένα στο ψυγείο σε συσκευασία κενού.

Ημέρα	μάρτυρες	60 min	90 min
0	3.47+0.2	3.17+0.1	2.77+0.1
2	3.97+0.2	3.77+0.2	3.27+0.1
4	6.07+0.3	4.47+0.2	3.97+0.2
6	6.87+0.3	5.87+0.3	5.47+0.2
8	7.07+0.4	6.07+0.3	5.67+0.3
10	7.37+0.3	6.87+0.3	6.67+0.3
12	8.77+0.4	8.47+0.4	7.87+0.4

Η χρησιμοποίηση συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας επίσης είναι μία πολύ αποτελεσματική μέθοδος για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των μυδιών στην ψύξη. Σε πείραμα που διενεργήθηκε στο Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων, αποδείχθηκε πως το δείγμα των μυδιών που διατηρήθηκε σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (80% CO<sub>2</sub> / 20%N<sub>2</sub>) , πέτυχε το μεγαλύτερο χρόνο συντήρησης των 14-15 ημερών , ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα είχαν λιγότερο χρόνο τουλάχιστον 4-5 ημέρες. Το συγκεκριμένο δείγμα υπερείχε κατά πολύ στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή), όσο και στα μικροβιολογικά και βιοχημικά. (Goulas et al, 2004).



Η συσκευασία σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε συνδυασμό με την ψύξη έχει αποδειχθεί ως ένα πολύ αποτελεσματικό μέσο για την παράταση του χρόνου συντήρησης με παράλληλη διατήρηση της ποιότητας πολλών διατροφικών προϊόντων (κόκκινου κρέατος, πουλερικών, φρούτων, λαχανικών, ειδών αρτοποιίας, φρέσκων ζυμαρικών και ψαριών) (Brody, 1989).

Γενικότερα σε όλα τα τρόφιμα, αλλά και ειδικότερα στα ψάρια και κατά συνέπεια στα οστρακοειδή που αφορούν την εν λόγω εργασία, κατά την παραμονή τους στην ψύξη παρατηρούνται μεταβολές στο μικροβιακό τους φορτίο καθώς και στα βιοχημικά και οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται αφενός μεν από τη διάρκεια και τις συνθήκες της αποθήκευσής τους και αφετέρου από την αρχική ποιότητα του προϊόντος. Δεν υπάρχει διεθνής μέθοδος ή εργαλείο που να διερευνά και να αποδεικνύει την ποιότητα των θαλάσσιων προϊόντων.

### **1.5.1. Μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά**

Οι οργανοληπτικές μέθοδοι είναι ίσως οι πιο ακριβείς δείκτες ποιότητας αυτών, αλλά δυστυχώς δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε ευρεία κλίμακα εξαιτίας του εξειδικευμένου προσωπικού και των χρονοβόρων διαδικασιών που απαιτούν.

Στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εξετάζονται περιλαμβάνονται τα εξής : α) εξωτερική εμφάνιση (appearance), β) οσμή (odour), γ) χρώμα (color) και δ) υφή σάρκας. Σε πειράματα που έλαβαν χώρα στο παρελθόν (Erkan, 2005) αποδείχθηκε πως για τα μύδια ισχύει η παρακάτω κλίμακα σύμφωνα με την οποία χαρακτηρίζονται κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση ή απορρίπτονται.

**Εξαιρετικό** δείγμα μυδιών ( $9 \geq E \geq 8$ ) θεωρείται εκείνο που έχει στιλπνή επιφάνεια, χαρακτηριστική οσμή γλυκιάς φρεσκάδας, ζωηρό χρώμα και πολύ σταθερή υφή σάρκας.

**A κατηγορίας** ( $8 > A \geq 6$ ) χαρακτηρίζεται εκείνο που έχει υγρή επιφάνεια, μη ειδική ελαφρά οσμή φρέσκου, πορτοκαλίζον χρώμα και απλά σταθερή υφή σάρκας.

**B κατηγορίας** ( $6 > B > 4$ ) θεωρείται το δείγμα με επιφάνεια λιγότερο υγρή από το A, οσμή ελαφρά αμμωνιακή, μουντό χρώμα και πολύ λιγότερο σταθερή υφή σάρκας.

**Γ κατηγορίας** ( $4 \geq \Gamma$ ) χαρακτηρίζεται τέλος εκείνο το δείγμα μυδιών, το οποίο έχει επιφάνεια θαμπή, χαρακτηριστική οσμή αμμωνίας, χρώμα γκρι αποχρωματισμένο και μαλακή υφή σάρκας.

Οι αναφερόμενες κλείδες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της νωπότητας των οστρακοειδών και σύμφωνα με αυτές ένα δείγμα μυδιών είναι κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση όταν ανήκει στις κατηγορίες E, A και B. Τα μύδια που ανήκουν στη Γ κατηγορία είναι ακατάλληλα προς βρώση και απορρίπτονται.

Τα μύδια του πειράματος, που πραγματοποιήθηκε από τον Erkan και τους συνεργάτες του στην Κωνσταντινούπολη, κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη παρέμειναν στις κατηγορίες E και A μόνο κατά τις δύο πρώτες μέρες της αποθήκευσής τους, από τη δεύτερη μέχρι την τέταρτη ημέρα επήλθαν στην κατηγορία B, ενώ μετά την τέταρτη ημέρα δε μπόρεσαν να διατηρήσουν την ποιότητά τους και έπεσαν στη Γ κατηγορία. Συμπερασματικά λοιπόν αναφέρεται πως ο χρόνος συντήρησης των μυδιών στην ψύξη των  $4^{\circ}\text{C}$  είναι 4 ημέρες. Μετά την τέταρτη ημέρα τα μύδια αλλοιώνονται και είναι ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση (shelf-life 3-4 ημερών) (Kastanidou- Monousou, 1982). Στον ίδιο χρόνο συντήρησης κατέληξαν και τα πειράματα μεταγενέστερων ερευνητών (Gokoglou, 2002; Pastoriza et al, 2004).

Στο παραπάνω πείραμα που έγινε στην Κωνσταντινούπολη (Erkan, 2005), χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) σε δύο δείγματα μυδιών, MAP<sub>1</sub> (50%N<sub>2</sub>/50%CO<sub>2</sub>) και MAP<sub>2</sub> (100%CO<sub>2</sub>) για τη βελτίωση του χρόνου συντήρησης στην ψύξη στους 4 °C. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μυδιών που μετρήθηκαν ήταν: α) η **επιφάνεια** (appearance) , β ) η **οσμή** (odor) , γ) η **γεύση** (taste) και δ) η **υφή της σάρκας** (texture).

Η κλίμακα αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη: **10-8 (πολύ καλή ποιότητα)**, **8-6 (καλή)**, **6-5 (επαρκής)**, **5-4 (αποδεκτή)**, **3,9-1 (κακή ποιότητα)**. (Karl et al, 2001). Από τον Erkan (2005) βρέθηκε ότι ο χρόνος συντήρησης των μυδιών στην ψύξη στους 4 °C είναι 4 ημέρες. Τα μύδια του εν λόγω πειράματος παρέμειναν στην κατηγορία της καλής ποιότητας μέχρι την 7<sup>η</sup> ημέρα και ενώ το δείγμα που δεν ήταν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (control) έφτασε να απορριφθεί στην 11<sup>η</sup> ημέρα, τα δείγματα MAP<sub>1</sub> και MAP<sub>2</sub> απορρίφθηκαν τη 13<sup>η</sup> ημέρα. Επομένως ο χρόνος συντήρησης αποδεδειγμένα αυξάνεται με τη χρήση συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

Σε παρόμοιες μελέτες (Goulas et al, 2005) και (Caglak et al, 2007) αναφέρθηκε ότι ο χρόνος συντήρησης των φρέσκων μυδιών σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι κατά 4 ημέρες μεγαλύτερος από εκείνον της συσκευασίας με αέρα. Κατά την Pastoriza et al, 2004 αναφέρεται ότι τα μύδια που συντηρούνται στην ψύξη σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχουν τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Από τα δείγματα τροποποιημένης ατμόσφαιρας που προαναφέρθηκαν, το MAP<sub>1</sub>(50%N<sub>2</sub>/50%CO<sub>2</sub>) αποδείχθηκε καλύτερο ως προς τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά σε σχέση με το MAP<sub>2</sub>(100%CO<sub>2</sub>).

### **1.5.2. Βιοχημικές μεταβολές**

Εκτός από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, οι μεταβολές των οποίων αποτελούν δείκτη νωπότητας των αλιευμάτων και συνεπώς των μυδιών που αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας, κατά τη συντήρηση στην ψύξη παρατηρούνται βιοχημικές και μικροβιακές μεταβολές πολύ σημαντικές για την ποιότητα του προϊόντος. Η μεταβολή της ποιότητας των αλιευμάτων κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη γενικότερα οφείλεται στη συνδυασμένη δράση των ενζύμων των ιστών και της μικροβιακής μόλυνσης.

Ως βιοχημικοί δείκτες νωπότητας των αλιευμάτων θεωρούνται το pH, το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) και η ινδόλη.

Ξεκινώντας από το pH, αξίζει να αναφερθεί πως αποτελεί έναν από τους κυριότερους δείκτες νωπότητας όλων των τροφίμων. Ορίζεται ως ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των κατιόντων υδρογόνου μέσα στο τρόφιμο.  $pH = -\log_{10} [H^+]$

Στους ζωικούς ιστούς αμέσως μετά τη σφαγή παύουν οι δραστηριότητες οι σχετιζόμενες με τη ζωή, όπως η αερόβια αναπνοή, καθώς και η αντίσταση στην ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Αντίθετα συνεχίζεται η αναερόβια αναπνοή (γλυκόλυση) με μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη και στη συνέχεια σε γαλακτικό οξύ και ενέργεια, προκαλώντας μείωση του pH από μία αρχική φυσιολογική τιμή περίπου 7 σε τελική τιμή 5.1 έως 6.5. Η αναερόβια αναπνοή σταματά μετά από χρονικό διάστημα 1-36 h μετά τη σφαγή. Το χρονικό αυτό διάστημα και η τελική τιμή pH εξαρτώνται από το είδος του ιστού και τον τρόπο χειρισμού πριν και μετά τη σφαγή. Παράλληλα μειώνεται το περιεχόμενο των ιστών σε ATP και επέρχεται νεκρική ακαμψία. Οι μειωμένες τιμές ATP και pH προκαλούν αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών και μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού.

Μία μικρή μείωση του pH είναι επιθυμητή γιατί καθυστερεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών και ευνοεί τη διατήρηση καλού χρώματος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με σωστούς χειρισμούς και γρήγορη ψύξη μετά τη σφαγή ώστε ο ρυθμός γλυκόλυσης να είναι βραδύς. Με την παραμονή στην ψύξη (2 °C επί 2 έως 3 εβδομάδες) η νεκρική ακαμψία εξαφανίζεται και το κρέας γίνεται τρυφερό.

Κατά την αποσύνθεση των αλιευμάτων, οι πρωτείνες των ιστών διασπώνται σε πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα, αμίνες και πτητική αμμωνία. Το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) που υπάρχει στη σάρκα τους διασπάται στις πτητικές αμίνες διμεθυλαμίνη (DMA) και τριμεθυλαμίνη (TMA). Στην παρουσία της τριμεθυλαμίνης οφείλεται η χαρακτηριστική οσμή ψαρίλας των αλιευμάτων.

Το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N) των αλιευμάτων είναι ένας πολύ αξιόπιστος δείκτης της φρεσκότητας της ωμής σάρκας αυτών. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης η τιμή του δείκτη αυτού αυξάνεται σε αντίθεση με το pH.

Σε προηγούμενα πειράματα σε μύδια σημειώθηκε τιμή ολικού πτητικού αζώτου σε φρέσκα μύδια αρχικά ίση με 12,38mg/100g σάρκας, η οποία στην συνέχεια αυξήθηκε σε 22,55mg/100g σάρκας μετά την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Στο όριο του αποδεκτού ( δηλαδή την 4<sup>η</sup> ημέρα) το ολικό πτητικό άζωτο είχε τιμή 15mg/100g. (Erkan, 2005).

Την ίδια ανοδική πορεία κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων στην ψύξη παρουσιάζει και η τιμή της τριμεθυλαμίνης (TMA-N) που παράγεται κατά την αποδόμηση του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης από τα βακτηριακά ένζυμα και την παρουσία των ειδικών οργανισμών (SSO-Specific Spoilage Organisms), οι οποίοι προκαλούν αλλοιώσεις στα αλιεύματα. Τιμή TMA-N=10-15mg/100g σάρκας έχει οριστεί από τον Connell το 1995 ως μέγιστο όριο αποδοχής ενός αλιεύματος ως φρέσκο.

Οι βιοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την αλλοίωση των ψαριών και των οστρακοειδών οφείλονται κυρίως σε βακτηριακή δράση ,αν και μελέτες έχουν δείξει πως ενδεχομένως υπάρχει και συνεισφορά από ενδογενή ένζυμα.

Σε όλες τις επιστημονικές μελέτες που αναφέρθηκαν οι βιοχημικές μεταβολές ορίστηκαν σε πτητική βάση μέσω της μέτρησης του αζώτου και της ινδόλης.

Η ινδόλη είναι το προϊόν της αποδόμησης του αμινοξέος τρυπτοφάνη που υπάρχει στη σάρκα των αλιευμάτων και κατά την αλλοίωση αυτών διασπάται μέσω του ενζύμου τρυπτοφανάση που βρίσκεται σε ορισμένα μεσόφιλα βακτήρια , συνήθως Gram αρνητικά. Ένας καλός συσχετισμός επίσης έχει βρεθεί ότι υπάρχει μεταξύ του πληθυσμού της *Escherichia coli* και του επιπέδου της παραγόμενης ινδόλης.

Η τιμή του πτητικού αυτού προϊόντος αποτελεί δείκτη της αποσύνθεσης των αλιευμάτων και παράλληλα της νοπότητας αυτών.

Στο πείραμα του Erkan το 2005 σε μύδια *Mytilus galloprovincialis* η τιμή της ινδόλης στα πολύ φρέσκα μύδια της πρώτης ημέρας ήταν 15,6μg/kg και ανέβηκε στα 39,8μg/kg την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στην ψύξη.

Υπάρχει σαφής στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της ινδόλης και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οστρακοειδών ( $r_s = -0.9732$ ,  $P < 0.05$ ).

Οι βιογενείς αμίνες γενικότερα προέρχονται από την αποκαρβοξυλίωση ελεύθερων αμινοξέων από ενδογενή και βακτηριακά ένζυμα. Για το λόγο αυτό η παρουσία των βιογενών αμινών αποτελεί δείκτη της νοπότητας των αλιευμάτων.

Ορισμένα είδη των βακτηριακών γενών *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* και *Photobacterium* , όπως και ορισμένα εντεροβακτηριοειδή και οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν αποκαρβοξυλίωση ελεύθερων αμινοξέων (Gigiray et al, 1999).

Για παράδειγμα η τυροσίνη προέρχεται από τη διάσπαση πρωτεϊνών και πεπτιδίων κατά τη διαδικασία της ενζυματικής πρωτεόλυσης στους μυς και συνεπώς χρησιμοποιείται ως μέτρο αυτής της μυικής δραστηριότητας.

Η πουτρεσκίνη είναι το προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης του αμινοξέος ορνιθίνη, ενώ η κανδαβερίνη προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης.

Η πουτρεσκίνη και η κανδαβερίνη έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες νωπότητας αλιευμάτων επειδή ήταν οι πρώτες αμίνες που ανευρέθηκαν στα δείγματα των αλιευμάτων πριν ακόμα αρχίσει η αποσύνθεση αυτών (Lakshmanan et al, 2002). Η τιμή της πουτρεσκίνης σε ζωντανά μύδια ήταν 24,7mg/kg και αυξήθηκε κατά την συντήρηση στην ψύξη στα 62,56mg/kg την 6<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης.

Μία αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων της πουτρεσκίνης και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μυδιών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ( $r_s = -0.7232$ ,  $P < 0.05$ ).

Δεν υπάρχουν δεδομένα μετρήσεων άλλων βιογενών αμινών ( τυραμίνης, σπερμίνης, σπερμιδίνης, κανταβερίνης, ισταμίνη ) κατά τη συντήρηση των μυδιών στην ψύξη.

Γενικότερα οι μέχρι σήμερα μελέτες σχετικά με τις μεταβολές των οργανοληπτικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των μυδιών έχουν εξασφαλίσει ένα χρόνο συντήρησης 4 ημερών στην ψύξη των  $4 \pm 1^{\circ} \text{C}$ .

### **1.5.3. Μικροβιακές μεταβολές**

Κατά προσέγγιση το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων χάνεται ετησίως λόγω μικροβιακής αλλοίωσης των τροφών (Lund et al, 2000).

Στην πραγματικότητα η μικροβιακή δραστηριότητα είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για την αλλοίωση των φρέσκων και ελαφρώς διατηρημένων αλιευμάτων.

Για το λόγο αυτό ο ολικός αριθμός των μικροοργανισμών που ονομάζεται ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) έχει καθοριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση, την Ιαπωνία και την Αμερική ως δείκτης της νοπότητας των αλιευμάτων. (<http4>)

Η OMX αντιπροσωπεύει τον ολικό αριθμό εκείνων των βακτηρίων, τα οποία έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν ορατές ευδιάκριτες αποικίες, όταν καλλιεργούνται σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα (Plate count agar – PCA) και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (Khan et al, 2005). Η OMX μετράται σε CFUs / gr δείγματος (colony forming units- μονάδες σχηματιζόμενων αποικιών). Τιμή OMX άνω των  $10^5$  cfu/gr σημαίνει ακαταλληλότητα του δείγματος για ανθρώπινη κατανάλωση (ICMSF, 1992).

Τιμές  $OMX=10^6-10^7$  cfu  $gr^{-1}$  αποδίδονται σε κακούς χειρισμούς του δείγματος ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης αυτού ή ακόμα αυξημένη θερμοκρασία κατά τη μεταφορά του , με αποτέλεσμα το δείγμα να απορρίπτεται ως κακώς διατηρημένο και ακατάλληλο προς βρώση (Hunt et al, 1984 ).

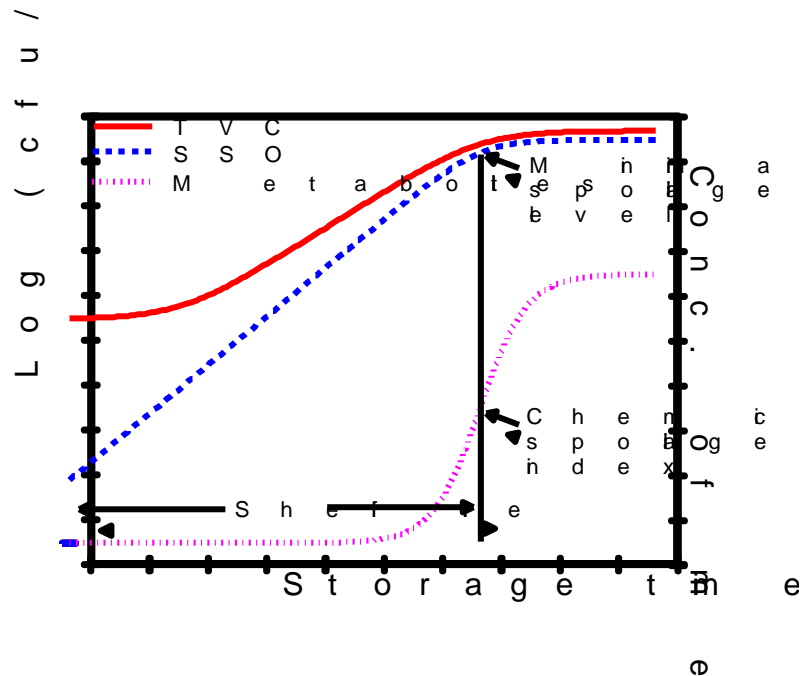
Η OMX πρέπει να προσμετράται αμέσως μετά την παραγωγή του δείγματος και πριν ξεκινήσει η διαδικασία συντήρησης αυτού, ώστε να είναι μέσα στα αποδεκτά όρια.

Συγκεκριμένα, στα αλιεύματα και συνεπώς επίσης στα οστρακοειδή αλλοιώσεις προκαλούνται από συγκεκριμένα είδη βακτηρίων (SSOs- Specific spoilage organisms), τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του προϊόντος .

Οι εν λόγω μικροοργανισμοί κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, ατμοσφαιρικής πίεσης, περιεκτικότητας του δείγματος σε NaCl, τιμές υγρασίας  $a_w$  και παρουσίας συντηρητικών, αναπτύσσονται ταχύτερα από την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα και παράγουν ενεργούς μεταβολίτες που ευθύνονται για την αλλοίωση του αλιεύματος.



Στο διάγραμμα που ακολουθεί (http4) φαίνεται η συσχέτιση των πληθυσμών της OMX (TVC), των ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (SSOs) και των μεταβολιτών τους σε σχέση με τον χρόνο συντήρησης (shelf life) των αλιευμάτων.



Εικ.11: Σχέση OMX με SSOs και μεταβολίτες τους κατά τη συντήρηση Αλιευμάτων (http4)

Συνεπώς οι λογάριθμοι των SSOs έχουν άμεση σχέση με το χρόνο συντήρησης των αλιευμάτων, ενώ η συσχέτιση αυτών με την OMX έχει λογική βάση όταν επικρατούν αρχικά χαμηλές τιμές OMX. Σε υψηλές τιμές αρχικής OMX δεν υφίσταται συσχέτιση.

Είναι δυνατό να προβλεφθεί ο χρόνος συντήρησης των αλιευμάτων γνωρίζοντας τους αρχικούς πληθυσμούς των SSO στα εκάστοτε δείγματα.

Σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την εκτίμηση της νοπότητας των αλιευμάτων κρίνεται απαραίτητη η γνώση των πληθυσμών των εξής ειδικών μικροοργανισμών των ειδών *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., οξυγαλακτικών βακτηρίων (lactic acid bacteria) και εντεροβακτηριοειδών.

Οι λογάριθμοι των εν λόγω βακτηρίων έχουν πολύ μεγαλύτερη σχέση με το χρόνο συντήρησης από ότι οι λογάριθμοι της OMX.

Όταν λοιπόν είναι δυνατή η μέτρηση των SSOs, μπορεί πολύ αποτελεσματικά να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο μέτρησης της OMX.

Στον πίνακα που παρατίθεται παρακάτω φαίνονται παραδείγματα ειδικών μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αλλοίωση διάφορων αλιευμάτων και οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την καταμέτρησή τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Ανάπτυξης ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (SSOs) σε αλιεύματα αποθηκευμένα σε διαφορετικά μέσα ( http4 )

Προϊόν	Μικροοργανισμός (SSOs,)	Μέθοδος καταμέτρησης
Φρέσκα ψυγμένα αλιεύματα αποθηκευμένα σε αέρα	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Iron Agar Lyngby (20-25°C, 3d)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetrimide-Fusidin-Cephaloridine (CFC) agar (25°C, 3d) <sup>4</sup> or by using a conductance method
Φρέσκα ψυγμένα αλιεύματα αποθηκευμένα σε κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Malthus conductance method (15°C, 10-50h)
	Lactic acid bacteria	Nitrite-Actidion-Polymyxin (NAP) agar with pH 6.7 (25°C, 3d) <sup>3</sup>
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Streptomycin sulphate Thallous Acetate Actidione (STAA) agar (25°C, 2-3d) <sup>4</sup>
Φρέσκα αλιεύματα αποθηκευμένα σε θ >10- 15 <sup>0</sup> C σε αέρα	<i>Vibrionaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Tryptic Soy Agar (TSA) with overlay of Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar (30°C, 48 h) <sup>3</sup>
Μαγειρεμένες και παστές γαρίδες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και ίσως διάφορα άλλα ελαφρώς διατηρημένα αλιεύματα αποθηκευμένα σε θ>15-25 <sup>0</sup> C	<i>Enterococcus faecalis</i>	Slanetz & Bartley agar (35/44°C, 48 h) <sup>4</sup>

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι για τη μέτρηση της OMX και των SSOs που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα και χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πράξη είναι αρκετά αργές διότι έχουν διαθέσιμα αποτελέσματα μετά την παρέλευση 10ωρών

έως και 5 ημερών. Νέες πολλά υποσχόμενες τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), τεχνικές ανίχνευσης ολιγονουκλεοτιδίων και αντιγόνων έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν αποτελέσματα μέσα σε μία εργάσιμη ημέρα.

Δυστυχώς όμως οι τεχνικές αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πράξη για την εκτίμηση του χρόνου συντήρησης των αλιευμάτων λόγω : α) έλλειψης ευαισθησίας όταν εφαρμόζονται σε τρόφιμα, β) έλλειψης ποιοτικών και ημιποσοτικών ανταποκρίσεων και γ) υψηλού κόστους.

Για τους λόγους αυτούς κυρίως μέχρι σήμερα εφαρμόζονται οι αργές κλασικές μικροβιολογικές μέθοδοι για την εκτίμηση του χρόνου συντήρησης των αλιευμάτων και κατά κύριο λόγο γίνεται καταμέτρηση της OMX και πολύ λιγότερο των SSOs.

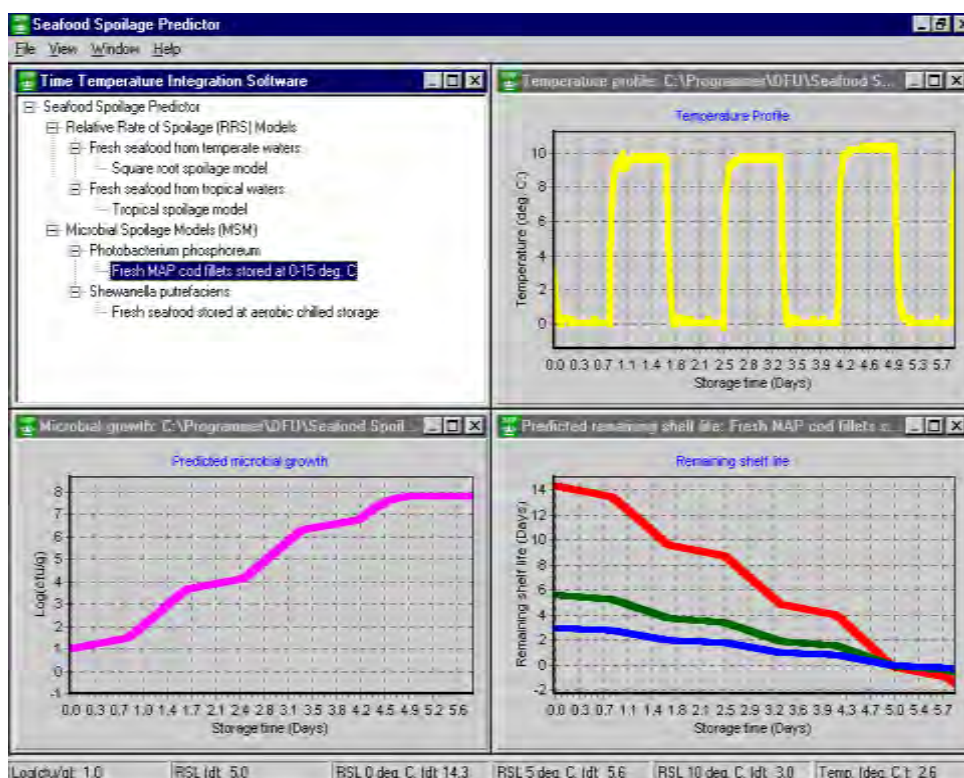
Υπάρχουν διαθέσιμα διάφορα μαθηματικά μοντέλα όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας, της ατμοσφαιρικής πίεσης και της ενεργού υγρασίας στην ανάπτυξη των ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης των αλιευμάτων. Αυτά τα μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του χρόνου συντήρησης των εκάστοτε αλιευμάτων που αποθηκεύονται σε σταθερές θερμοκρασίες. Αυτό βέβαια απαιτεί γνώση των αρχικών πληθυσμών των SSOs, των πληθυσμών τους την ώρα της έναρξης της αλλοίωσης καθώς και των συνθηκών κατά τις οποίες οι εν λόγω μικροοργανισμοί προκάλεσαν αλλοιωμένο προϊόν.

Μοντέλα για την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της *Shewanella putrefaciens* και για την επίδραση της θερμοκρασίας και του διοξειδίου του άνθρακα στην ανάπτυξη του *Photobacterium phosphoreum* έχουν τεχνολογικά αναπτυχθεί, εφαρμόσται σε αλιεύματα και περιλαμβάνονται στο λογισμικό της πρόβλεψης αλλοίωσης αλιευμάτων ( Seafood Spoilage Predictor – SSP) (Εικ. 12).

Επίσης μοντέλα για την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των διάφορων ειδών της ψευδομονάδας (*Pseudomonas spp*) έχουν επίσης αναπτυχθεί και εφαρμόσται σε αλιεύματα.

Αντίθετα, μοντέλα για την ανάπτυξη του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν προταθεί, αλλά δεν έχουν εφαρμοστεί σε αλιεύματα.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τη διασφάλιση της ποιότητας των αλιευμάτων για την ασφαλή προώθησή τους στις παγκόσμιες αγορές και κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο οι οργανοληπτικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν εκτελούνται σε καθημερινή βάση και υπάρχει μία διαρκής αναζήτηση για την ανεύρεση νέων τεχνολογιών με απώτερο στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των αλιευμάτων κατά την αποθήκευσή τους στην ψύξη των  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

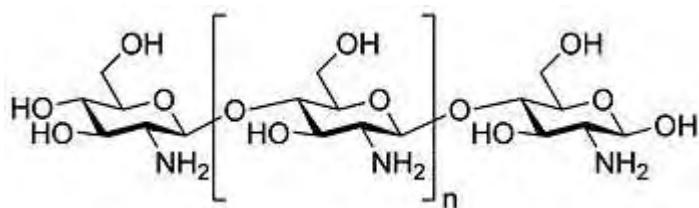


**Εικόνα 12:** Ιστοσελίδα από λογισμικό πρόβλεψης αλλοίωσης αλιευμάτων (SSP) – επίδραση ενός θερμοκρασιακού προφίλ (πάνω δεξί παράθυρο), μικροβιακής ανάπτυξης (κάτω αριστερό παράθυρο) στον παραμένον χρόνο συντήρησης των αλιευμάτων στους 0 και 5°C (κάτω δεξί παράθυρο) ([http4](http://4))

## 1.6 ΧΙΤΟΖΑΝΗ

### 1.6.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

Η χιτοζάνη είναι ένας οργανικός πολυσακχαρίτης που περιέχει β-1,4 D-γλυκοζαμίνη (αποκαρβοξυλιωμένη μονάδα) και N-ακετυλογλυκοζαμίνη (καρβοξυλική μονάδα) που παρουσιάζεται με τον παρακάτω χημικό τύπο :



Προέρχεται από τα κελύφη των θαλάσσιων καρκινοειδών (καβουριών, αστακού γαρίδων). Κατά κύριο λόγο η εμπορική χιτοζάνη παράγεται από τη χιτίνη γαρίδων και συγκεκριμένα του είδους *Pandalus borealis* όπως φαίνεται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13: Γαρίδες *Pandalus borealis* (<http7>)

Η χιτοζάνη για εμπορική χρήση παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση της χιτίνης, η οποία αποτελεί δομικό στοιχείο του εξωσκελετού των καρκινοειδών και των

μυκητιακών κυττάρων. Ο βαθμός της αποκαρβοξυλίωσης καθορίζεται από ειδικό σπεκτροσκόπιο (NMR) και ανέρχεται στις εμπορικές χιτοζάνες από 60-100% (http7).

Η χιτίνη είναι το κύριο δομικό συστατικό του χιτινώδους περιβλήματος των καρκινοειδών, των εντόμων, των μαλακίων καθώς και του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων μυκήτων και έχει διαπιστωθεί ότι παράγεται στη φύση σε ποσότητες των  $1 \times 10^9$  -  $1 \times 10^{10}$  τόνων το χρόνο (Peter, 1997).

Η χιτοζάνη που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της χιτίνης είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης με  $pK_a=6.3-7$  (Sshulz et al,1996) και με δυνατότητα εφαρμογής σε πολλούς τομείς, όπως σε επίπεδο διατροφής (Shahidi et al, 1999), σε φαρμακευτικό επίπεδο (Kurita,1998), στη βιοτεχνολογία (Somashekar et al,1996) ή ακόμα και στο περιβάλλον (Bassi et al,1999). Έχει πολλά υποσχόμενη βιολογική δράση η εφαρμογή της, συγκεκριμένα αντιμικροβιακή δράση, αντικαρκινική δράση, αιμοστατική δράση και επιταχύνει την επούλωση των τραυμάτων (Nam, 2001). Πρόσφατα η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη δυνατότητα ανάπτυξης χιτοζάνης ως φυσικού απολυμαντικού. (Kim et al, 1997). Συγκεκριμένα οι Chen et al, (2002) χρησιμοποίησαν τη χιτοζάνη ως φυσικό απολυμαντικό εναντίον παθογόνων μικροβίων που μεταδίδονται με το νερό και απέδειξαν ότι είναι πολλά υποσχόμενη η αντιμικροβιακή της δραστηριότητα.

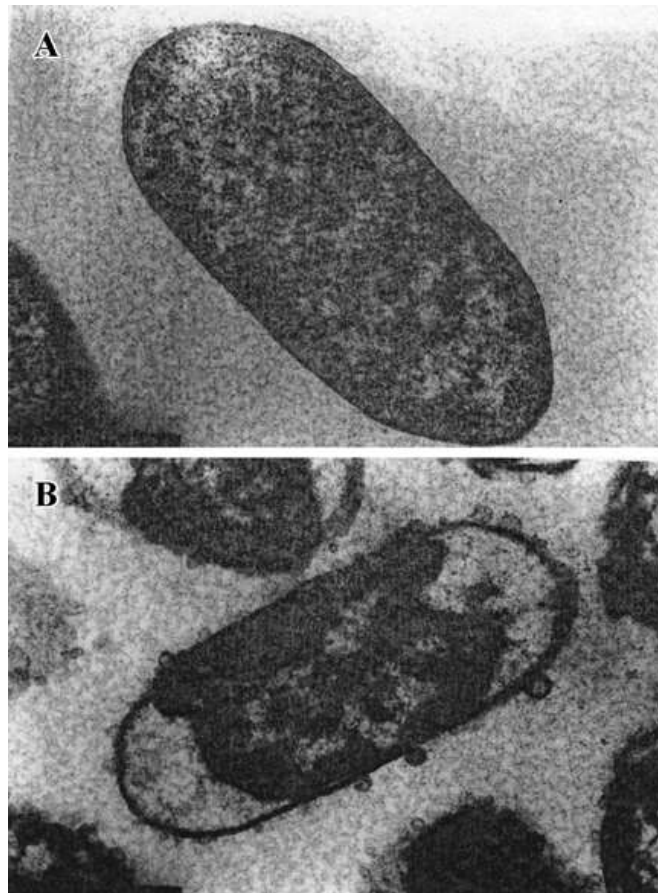
Η χιτοζάνη και τα παράγωγά της έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικά έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων σε σχέση με τα Gram θετικά (Chen et al, 2002) και η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης σχετίζεται άμεσα με την υδροφιλικότητα των εν λόγω βακτηρίων.

Σε πείραμα που διενεργήθηκε στο παρελθόν (Chung et al, 2004 ) με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης της χιτοζάνης σε μία σειρά βακτηρίων (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*) αποδείχθηκε πως η χιτοζάνη είχε ισχυρότερη αντιμικροβιακή

δράση κατά των τριών πρώτων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ιδιαίτερα κατά της *E.coli* (Εικ.14) σε σχέση με τα ακόλουθα δύο θετικά κατά Gram βακτήρια.

Επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης της χιτοζάνης από την κυτταρική επιφάνεια των συγκεκριμένων βακτηρίων σε pH=4 από ότι σε pH=5.

(Πίνακας 3)



**Εικόνα 14:** A) Βακτηριακό κύτταρο *Escherichia coli* πριν την απορρόφηση χιτοζάνης

B) Βακτηριακό κύτταρο *E.coli* μετά 4ώρες από την επίδραση χιτοζάνης (Chung et al,2004)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3 :** Ποσοστά απορρόφησης χιτοζάνης από βακτηριακά κύτταρα (Chung et al, 2004)  
 Η μονάδα της χιτοζάνης ήταν  $\mu\text{g}$  χιτοζάνης /  $1 \times 10^9$  CFU

ΣΥΝΘΗΚΗ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	<i>Salmonella typhimurium</i> ( Gram -)	<i>Escherichia coli</i> ( Gram -)	<i>Staphylococcus aureus</i> ( Gram +)	<i>Streptococcus faecalis</i> ( Gram +)
pH = 4					
χιτοζάνη 95%	22.5	20.6	18.7	17.5	16.8
χιτοζάνη 75%	18.8	17.3	15.4	14.2	12.7
pH = 5					
χιτοζάνη 95%	25.3	23.6	21.8	18.3	17.9
χιτοζάνη 75%	21.6	19.2	17.1	16.6	15.4

### **1.6.2 Συνδυασμός χιτοζάνης και όζοντος ως απολυμαντικά**

Η χιτοζάνη λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής δράσης της έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πειραματισμούς που είχαν στόχο την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης πολλών ειδών αλιευμάτων τόσο μόνη της , όσο και σε συνδυασμό με διάφορα οργανικά οξέα και όζον.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Rong et al, (2010) η συνδυασμένη εφαρμογή οξονοποιημένου νερού και χιτοζάνης σε στρείδια του Ειρηνικού (*Crassostrea gigas*) εξασφάλισε ένα χρόνο συντήρησης 20-21 ημερών, σαφώς μεγαλύτερο από αυτόν που παρατηρήθηκε μόνο με τη χρήση όζοντος (10-12 ημέρες), ή μόνο με τη χρήση χιτοζάνης (14-15 ημέρες). Ο χρόνος συντήρησης για τους μάρτυρες (control δείγμα) ήταν μόνο 8-9 ημέρες.

Η χρήση φυσικών βιοσυντηρητικών όπως η χιτοζάνη, η οποία είναι ένα βιοπολυμερές με φυσική προέλευση, είναι απολύτως αναγκαία για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των στρειδιών και γενικότερα όλων των οστρακοειδών,



επειδή τα συνθετικά χημικά συντηρητικά αποφεύγονται επιμελώς λόγω των ποικίλων τοξικών παρενεργειών τους. Η χιτοζάνη δρα αποτελεσματικά εναντίον ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και συνεπώς έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητάς της να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως συντηρητικό τροφίμων απόλυτα φυσικής προέλευσης ( Chen et al, 1999 ).

Το όζον επίσης έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα σε μεγάλο βαθμό από την παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων αλιευμάτων ως αντιβακτηριακός παράγοντας και έχει αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματικό κατά Gram – και Gram + βακτηρίων, τόσο των σπόρων όσο και των βλαστικών μορφών αυτών ( Guzel et al, 2004 ).

Ο τρόπος σχηματισμού του όζοντος από το οξυγόνο φαίνεται στο σχηματογράφημα της εικόνας που ακολουθεί (Εικ. 15).



Εικόνα 15: Τρόπος σχηματισμού όζοντος ( [http 8](http://8) )

Η χρησιμοποίηση του οζονοποιημένου νερού ως αντιμικροβιακό είναι μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική πρόταση στα παραδοσιακά απολυμαντικά, εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς του σε χαμηλές συγκεντρώσεις, του μικρού απαιτούμενου χρόνου έκθεσης του αλιεύματος σε αυτό καθώς και της μεγάλης δυνατότητάς του να εξασφαλίζει χαμηλούς πληθυσμούς βακτηρίων σε ωμά αλιεύματα πριν ακόμα την αποθήκευσή τους.

Η μικροβιακή χλωρίδα των οστρακοειδών αποτελείται από τα εξής γένη βακτηρίων : *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Shewanella* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Lactic acid bacteria* και *Bacillus* spp. Σε αυτά κυριαρχούν και επικρατούν τα Gram – των γενών *Pseudomonas* και *Vibrio* (Puchenkova, 1991; Ortigosa et al, 1994).

Η χρησιμοποίηση οζονοποιημένου νερού επέδειξε καλό βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα στην ολική μικροβιακή χλωρίδα των ωμών στρειδιών, μειώνοντάς τη από  $3.2 \times 10^3$  σε  $1.8 \times 10^2$  cfu/g, ενώ μηδενίστηκαν εντελώς οι πληθυσμοί των βακτηρίων των γενών *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* και *Lactic acid bacteria*. Τα ποσά των Gram+ βακτηρίων παρουσίασαν σημαντική μείωση και παρέμειναν μόνο 8%, ενώ οι πληθυσμοί των Gram- αντίθετα αυξήθηκαν από 77% σε 89%. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (42%), *Vibrio* (21%), και *Flavobacterium* (15%) ήταν τα επικρατέστερα και αυξήθηκαν σημαντικά από τους αρχικούς πληθυσμούς τους στα φρέσκα ωμά στρείδια πριν την οζονοποίηση, γεγονός που αποδεικνύει την υψηλή ανθεκτικότητά τους στο όζον (Πίνακας 4) ( Rong et al, 2010).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Μικροβιακή χλωρίδα ωμών και οξονοποιημένων στρεπιδίων (Rong et al, 2010)

ΓΕΝΗ βακτηρίων	ΩΜΑ ΣΤΡΕΙΔΙΑ		ΟΞΟΝΟΠΟΙΗΜΕΝΑ	
<i>Pseudomonas</i>	14	23%	22	42%
<i>Vibrio</i>	12	20%	11	21%
<i>Shewanella</i>	2	3%	-	-
<i>Alcaligenes</i>	4	7%	-	-
<i>Enterobacter</i>	3	5%	3	6%
<i>Moraxella</i>	4	7%	3	6%
<i>Acinetobacter</i>	2	3%	-	-
<i>Flavobacterium</i>	5	8%	8	15%
Ολικά Gram –	46	77%	47	89%
<i>Corynebacterium</i>	2	3%	-	-
<i>Staphylococcus</i>	2	3%	-	-
<i>Micrococcus</i>	3	5%	2	4%
<i>Lactic acid bacteria</i>	3	5%	-	-
<i>Bacillus</i>	2	3%	2	4%
Ολικά Gram+	12	20%	4	8%
Αταυτοποίητα	2	3%	2	4%
Ολικά	60	100%	53	100%

Η αντιμικροβιακή δράση του όζοντος βασίζεται στη δράση του μοριακού οξυγόνου, το οποίο οξειδώνει τους διπλούς δεσμούς των κυττάρων και καταστρέφει το DNA.

Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης αντίθετα, δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένη αλλά γενικότερα πιστεύεται ότι οφείλεται στην πολυκατιονική φύση της, η οποία προκαλεί ρήξη της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης (Helander et al, 2001), ή στην ικανότητα δημιουργίας φιλμ γύρω από το κύτταρο (Zheng et al, 2003). Η χρησιμοποίηση των ακόλουθων συγκεντρώσεων χιτοζάνης ( 0.5 , 1.0 , 5.0 και 10.0 g/l ) επέδειξε ισχυρή δράση εναντίον 13 βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τα εξεταζόμενα στρείδια (Πίνακας 5)

Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης στο πείραμα μετρήθηκε με βάση τη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων σε mm (Rong et al, 2010). Τα δεδομένα του πειράματος έδειξαν ότι τα βακτήρια των γενών *Vibrio*, *Moraxella*, *Micrococcus* και *Lactic acid bacteria* ήταν πιο ευαίσθητα από τα υπόλοιπα στην επίδραση της χιτοζάνης και η διάμετρος των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των εν

λόγω βακτηρίων έφτασαν τα 23.8, 30.8, 20.0 και 22.5 mm αντίστοιχα (κατά την εφαρμογή συγκέντρωσης χιτοζάνης 5.0 g/l).

Τα γένη *Shewanella*, *Alcaligenes* και *Corynebacterium* απέδειξαν υψηλή ανθεκτικότητα στη χιτοζάνη.

Στη συγκέντρωση των 0.5g/l δεν παρουσιάστηκε ουσιαστικά καμία αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης εναντίον κανενός από τα στελέχη του πίνακα 5. Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά ( $P > 0.05$ ) μεταξύ των συγκεντρώσεων χιτοζάνης 5.0 και 10.0 g/l, εκτός από το γένος *Flavobacterium*.

Για το λόγο αυτό ως αποτελεσματικότερη συγκέντρωση χιτοζάνης για αντιμικροβιακή δράση στα οστρακοειδή καθορίζεται εκείνη των 5.0 g/l.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5:** Αντιμικροβιακή δράση χιτοζάνης εναντίον βακτηρίων ωμών στρεπιδιών

ΓΕΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΧΙΤΟΖΑΝΗ			
	0.5g/l (mm)	1.0g/l (mm)	5.0g/l (mm)	10.0g/l (mm)
<i>Pseudomonas sp.</i>	3.8 ± 0.6	6.0 ± 1.0	13.3 ± 0.7	14.0 ± 0.8
<i>Vibrio sp.</i>	12.3 ± 0.5	14.0 ± 0.6	23.8 ± 0.9	25.5 ± 0.9
<i>Shewanella sp.</i>	0	3.3 ± 0.6	4.5 ± 0.3	5.3 ± 0.5
<i>Alcaligenes sp.</i>	0	2.5 ± 0.7	3.5 ± 0.4	3.3 ± 0.6
<i>Enterobacter sp.</i>	5.3 ± 0.5	10.3 ± 0.4	13.5 ± 0.6	13.8 ± 0.4
<i>Moraxella sp.</i>	12.8 ± 1.1	24.5 ± 1.4	30.8 ± 0.7	32.3 ± 1.9
<i>Acinetobacter sp.</i>	2.5 ± 0.5	8.0 ± 0.7	13.3 ± 0.5	14.0 ± 0.5
<i>Flavobacterium sp.</i>	4.3 ± 0.4	11.6 ± 0.5	16.0 ± 1.2	20.8 ± 0.6
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	4.3 ± 0.4	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.3
<i>Staphylococcus sp.</i>	4.0 ± 0.3	6.8 ± 0.4	12.3 ± 0.4	12.5 ± 0.4
<i>Micrococcus sp.</i>	13.3 ± 0.7	16.5 ± 0.7	20.0 ± 0.5	21.5 ± 0.6
<i>Lactid acid bacteria sp.</i>	14.0	16.0 ± 0.8	22.5 ± 0.7	23.3 ± 1.1
<i>Bacillus sp.</i>	4.3 ± 0.4	11.5 ± 0.3	13.8 ± 0.8	14.0 ± 0.6

Το συμπέρασμα του πειραματισμού των Rong et al (2010) ήταν πως με την χρησιμοποίηση μόνο του όζοντος ως συντηρητικού των στρεπιδιών, ο χρόνος συντήρησης αυτών δεν ξεπέρασε τη 10<sup>η</sup> ημέρα, με τη χρήση μόνο της χιτοζάνης ως

αντιβακτηριακού παράγοντα ο χρόνος συντήρησης έφτασε στη 14<sup>η</sup> μέρα , ενώ με τον συνδυασμό και των δύο ο χρόνος συντήρησης ξεπέρασε την 20<sup>η</sup> ημέρα .

### **1.6.3 Συνδυασμός χιτοζάνης και γαλακτικού οξέος**

Η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί επίσης σε πειραματισμούς σε συνδυασμό με το γαλακτικό οξύ για τον έλεγχο του πληθυσμού του αλόφιλου θαλάσσιου βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στη σάρκα μυδιών, το οποίο βακτήριο είναι παγκοσμίως γνωστό ότι προκαλεί πολύ σοβαρές γαστρεντερίτιδες όταν τα αλιεύματα τρώγονται ωμά (όπως τα οστρακοειδή) ή ατελώς μαγειρεμένα (Janda et al, 1988).

Το *Vibrio parahaemolyticus* ταυτοποιήθηκε αρχικά στην Ιαπωνία το 1950 ως τροφιμογενές παθογόνο (Fujino et al, 1953) και το 1977 προκάλεσε τη μεγαλύτερη αναφερόμενη τροφική δηλητηρίαση από κατανάλωση ωμών στρειδιών (209 άτομα στη Βόρεια Αμερική) (CDC, 1998).

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί έως σήμερα για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων αλιευμάτων όπως πλύσιμο, αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες , ψυχρό σοκ , πάγωμα , UV ακτινοβολία , προσθήκη άλατος και απολύμανση με χιτοζάνη , χλώριο , οργανικά οξέα , όζον και χλωροφόρμιο (Chythanya et al, 2002).

Το γαλακτικό οξύ είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα οργανικά οξέα για την απολύμανση της σάρκας των αλιευμάτων. Αναστέλλει την ανάπτυξη κυρίως των Gram αρνητικών μικροοργανισμών των γενών *Pseudomonas* και *Enterobacter*. ( Anang et al, 2007).

Η χιτοζάνη έχει επιδείξει έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον τόσο Gram θετικών βακτηρίων (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaris*) όσο και κατά Gram αρνητικών (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) (Chen et al, 2002).

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα της χιτοζάνης αναφέρεται από το βαθμό της αποκαρβοξυλίωσης, το μοριακό της βάρος, τη συγκέντρωση και το βαθμό αποκαρβοξυλίωσης αυτής (Jeon et al, 2001).

Η συνδυασμένη δράση χιτοζάνης και γαλακτικού οξέος στους πληθυσμούς του *Vibrio parahaemolyticus* ήταν καταλυτική στη σάρκα μυδιών. Η ανάπτυξη του αλόφιλου μικροβίου αναστάλθηκε πλήρως μετά την εμβάπτιση των μυδιών σε γαλακτικό οξύ 1,5-2% για 15 λεπτά και σε χιτοζάνη 0,5% για 5 λεπτά (Terzi et al, 2010).

Στον πίνακα 6 που ακολουθεί φαίνεται η λογαριθμική μείωση των μονάδων (cfu/gr) του *Vibrio parahaemolyticus* της σάρκας μυδιών μετά τη βύθιση αυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης και γαλακτικού οξέος.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6:** Λογαριθμική μείωση του *V.parahaemolyticus* σε σάρκα μυδιών μετά τη βύθισή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης και γαλακτικού οξέος (Terzi et al, 2010)

ΔΙΑΛΥΜΑ	Μείωση μονάδων cfu/g του <i>V. parahaemolyticus</i>			
	5min	15min	30min	60min
Γαλακτικό οξύ (%)				
0,5	1,91	2,38	>3,38	>3,38
1	2,13	3,38	>3,38	>3,38
1,5	2,27	>3,38	>3,38	>3,38
2	2,78	>3,38	>3,38	>3,38
Χιτοζάνη (%)				
0,05	1,33	>2,03	>2,03	>2,03
0,1	1,41	>2,03	>2,03	>2,03
0,25	1,56	>2,03	>2,03	>2,03
0,5	>2,03	>2,03	>2,03	>2,03

Η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης επηρεάζεται από το μοριακό βάρος και το βαθμό αποκαρβοξυλίωσής της καθώς και από τον τύπο του βακτηρίου. Αναφέρεται ότι έχει εντονότερη αντιβακτηριακή δράση εναντίον των Gram- βακτηρίων από τα Gram+ και εναντίον των παθογόνων σε σχέση με τα μη παθογόνα (Jeon et al, 2001). Σύμφωνα με τους (Liu et al, 2006), η χιτοζάνη μικρού μοριακού βάρους έχει ισχυρότερο αντιβακτηριακό αποτέλεσμα από ότι οι χιτοζάνες υψηλού MB.

Το γενικό συμπέρασμα από το πείραμα των (Terzi et al, 2010) είναι πως η απολύμανση της σάρκας μυδιών με γαλακτικό οξύ και χιτοζάνη μείωσε σημαντικά τις ποσότητες του *Vibrio parahaemolyticus* στα αλιεύματα αυτά. Συγκεκριμένα, η εμφύσηση των δειγμάτων μυδιών σε γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 0.5-2% προκάλεσε μείωση των πληθυσμών του *Vibrio* από 1.91 έως και πάνω από 3.38 λογαριθμικές μονάδες. Παράλληλα η βύθιση των μυδιών σε διάλυμα χιτοζάνης 0.05-0.5% προκάλεσε επίσης αξιοσημείωτη μείωση του αλόφιλου βακτηρίου από 1,33 έως και πάνω από 2.03 λογαριθμικές μονάδες.

Το γαλακτικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιβακτηριακό σε δέρμα από κοτόπουλο προκαλώντας μείωση των πληθυσμών του βακτηρίου *Salmonella typhimurium*, (Xiong et al, 1998), σε κρέας αρνιού προκαλώντας μείωση της *Escherichia coli* (Ramirez et al, 2001), σε βοδινό κρέας προκαλώντας μείωση του στελέχους 0157-H7 της *Escherichia coli* (Ransom et al, 2003) και σε μυσ στήθους κοτόπουλου προκαλώντας μείωση συνδυασμένα των βακτηρίων *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E.coli* 0157-H7 (Anang et al, 2007).

## **1.7 ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Διάφορες απόψεις σχετικά με το μηχανισμό λειτουργίας και την αντιβακτηριακή δράση των οργανικών οξέων έχουν διατυπωθεί (Cherrington et al, 1991). Η αντιβακτηριακή ικανότητα των οργανικών οξέων γενικότερα στηρίζεται στη μείωση του pH όσο και στην ικανότητα διαχωρισμού τους, γεγονός το οποίο προσδιορίζεται από την τιμή του δείκτη pKa και την τιμή του pH του κάθε οξέος.

Το pKa των περισσότερων οξέων κυμαίνεται μεταξύ 3 και 5. Έτσι και η αντιβακτηριακή ικανότητά τους αυξάνεται με τη μείωση του pH.

Τα οργανικά οξέα στην αδιάστατη μορφή τους είναι λιποδιαλυτά και μπορούν να διαχέονται διαμέσου των μικροβιακών κυττάρων. Μέσα στο κύτταρο και εν μέσω αλκαλικού περιβάλλοντος, το οξύ απελευθερώνει πρωτόνια μειώνοντας έτσι το ενδοκυτταρικό pH. Η εξάλειψη των πρωτονίων από πλευράς μικροβιακού κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα τη διάθεση όλης της ενέργειας του κυττάρου για το σκοπό αυτό, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του μικροβιακού κυττάρου, οδηγώντας έτσι σε ενσωμάτωση των ανιόντων του οξέος στο κύτταρο. Αυτή η ενσωμάτωση εξαρτάται από την τιμή του pH και τα τοξικά αποτελέσματα του οξέος οφείλονται σ' αυτό. (Μπόκος, 2008).

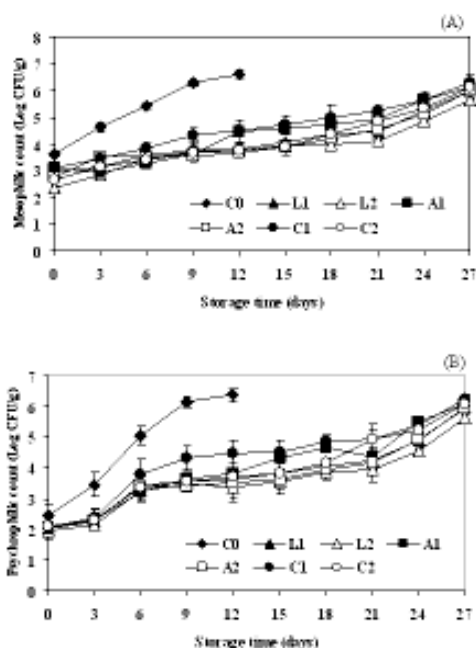
Ο τρόπος δράσης των οργανικών οξέων που αναφέρθηκε και η αντιβακτηριακή δραστηριότητα αυτών, εξηγεί το λόγο για τον οποίο τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικά .

Έχει αναφερθεί αξιοσημείωτη επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης σε διάφορα είδη τροφίμων μετά την προσθήκη οργανικών οξέων (Kim et al, 1995).

Ως παράδειγμα της αντιβακτηριακής δράσης των οργανικών οξέων στο χρόνο συντήρησης των οστρακοειδών αναφέρονται τα αποτελέσματα του πειραματισμού των ερευνητών (Masniyom et al, 2007) σύμφωνα με τα οποία ο αρχικός πληθυσμός



της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας των εξεταζόμενων μυδιών ήταν  $<10^4$  CFU/g. Στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε γαλακτικό οξύ 0,2M παρατηρήθηκε η μικρότερη σε αριθμό μεσόφιλη χλωρίδα σε σχέση με εκείνα που εμβαπτίστηκαν σε οξικό και κιτρικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό από τα τρία οξέα, ακολουθούμενο από το οξικό, ενώ το κιτρικό οξύ είχε τη μικρότερη αντιβακτηριακή δράση από αυτά. (Εικόνα 16).



**Εικόνα 16:** Επίδραση οργανικών οξέων στη μεσόφιλη (A) και ψυχρόφιλη χλωρίδα (B) πράσινου μυδιού κατά τη συντήρηση στους 4 °C ( Masniyom et al, 2007 ).

Η μεσόφιλη χλωρίδα των δειγμάτων που εμβαπτίστηκαν με γαλακτικό οξύ είχε τη μικρότερη τιμή σε σχέση με τα άλλα οξέα, αποκαλύπτοντας πως το γαλακτικό οξύ ανέστειλε την ανάπτυξη των μικροβίων αποτελεσματικά, επειδή είχε την ισχυρή ικανότητα να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών και να οξειδώσει το εσωτερικό των κυττάρων τους καταστρέφοντάς τα.

Η ενδοκυτταρική διάσπαση των οξέων που συμβαίνει μέσα στα κύτταρα των μικροοργανισμών απολήγει στη μετουσίωση των ενζύμων τους και την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών (Freese et al, 1973).

Η χαμηλότερη ικανότητα του οξικού και κιτρικού οξέος να εισέλθουν στα βακτηριακά κύτταρα αντισταθμίζεται από τη μεγαλύτερη ικανότητά τους να διασπώνται στο εσωτερικό του κυττάρου και έτσι να οξειδώνουν το κυτταρόπλασμα (Young et al, 1993). Το οξικό οξύ μάλιστα έχει αναφερθεί ότι διασπάται οδηγώντας σε χαμηλότερη ικανότητα εισόδου στα κύτταρα (Samelis et al, 2002).

Τα υψηλότερα ποσά της μικροβιακής χλωρίδας των μυδιών που εμβαιπίστηκαν σε κιτρικό οξύ μπορεί να οφείλονται σε μεγαλύτερα μοριακά μεγέθη και χαμηλότερη ικανότητα των κιτρικών οξέων να εισέλθουν στα βακτηριακά κύτταρα (Ouattara et al, 1997).

Τα ποσοστά της ψυχρόφιλης χλωρίδας που παρατηρήθηκαν στα δείγματα των μυδιών, σε αναλογία με τη μεσόφιλη, ήταν υψηλότερα χωρίς τη χρησιμοποίηση οξέων σε σχέση με εκείνα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν οξέα. (Εικόνα 16)

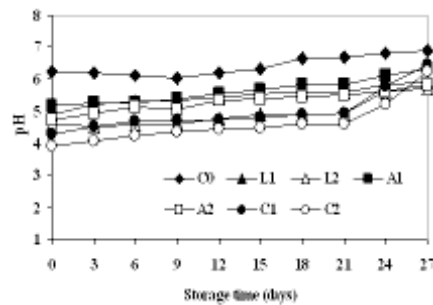
Όσον αφορά το pH, οι αλλαγές με τη χρησιμοποίηση των οργανικών οξέων φαίνονται στην εικόνα 17 που ακολουθεί. Το αρχικό pH των δειγμάτων ήταν 6,2. Μετά τη χρησιμοποίηση των οργανικών οξέων παρατηρήθηκε όπως ήταν αναμενόμενο μείωση του pH. Ανάμεσα στα τρία οξέα, εκείνα του κιτρικού οξέος παρουσίασαν το μικρότερο pH σε σχέση με το γαλακτικό και οξικό οξύ.

Το pH των δειγμάτων που εμποτίζονται σε οξέα σχετίζεται πάντα με το pKa των οξέων που χρησιμοποιούνται (Farid et al, 1998).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παρατηρείται αύξηση του pH του δείγματος μάρτυρα (χωρίς οξέα) πιθανότατα λόγω παραγωγής βασικών αμινών και μεταβολιτών από τα βακτήρια (Pastoriza et al, 1996).

Μία εντυπωσιακή αύξηση του pH παρατηρήθηκε στο δείγμα μάρτυρα των μυδιών τη 12<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης που συνδέθηκε με την αύξηση του αριθμού της μεσόφιλης και ψυχρόφιλης χλωρίδας (Εικόνα 17). Στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν οξέα, η αύξηση του pH ήταν μικρότερη και πολύ πιο αργή.

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη θεωρία που υποστηρίζει ότι το pH των μυδιών εξαρτάται από το pKa και τη συγκέντρωση των οξέων που χρησιμοποιούνται για τη συντήρησή τους.



**Εικόνα 17:** Αλλαγές στο pH δειγμάτων πράσινου μυδιού μετά τη χρησιμοποίηση οργανικών οξέων για τη συντήρηση στους 4 °C ( Masniyom et al, 2007).

Οι μικροοργανισμοί που ευθύνονται για την αλλοίωση των αλιευμάτων και επικράτησαν και στο πείραμα με τα οργανικά οξέα που αναφέρθηκε είναι κυρίως Gram αρνητικά βακτήρια, στα οποία κυριαρχεί το γένος *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp. (Hobbs, 1991).

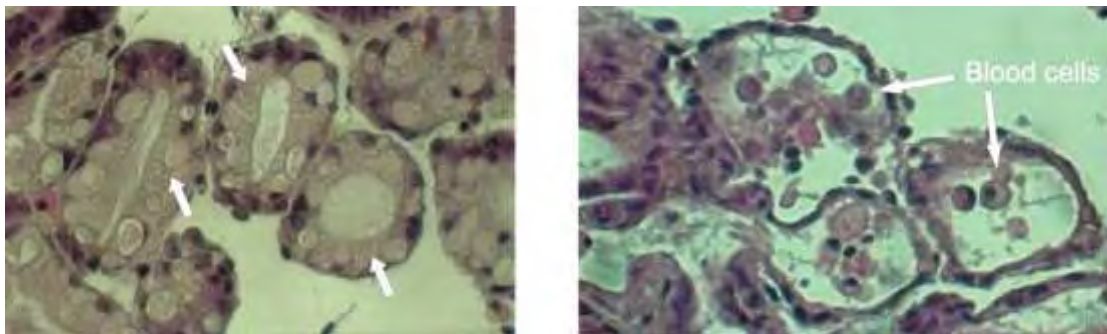
Οι Venugopal et al ανέφεραν το 1983 ότι η πρωτεάση του βακτηρίου *Pseudomonas marinoglutinosa* υδρολύει την ακτινομουσίνη στους 0-2 °C.

Γενικότερα τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αναπτύσσονται στα αλιεύματα σε υψηλό βαθμό και αποτελούν έναν από τους βασικότερους ειδικούς μικροοργανισμούς που προκαλούν την αλλοίωση αυτών (specific spoilage organisms-SSOs). Στην εικόνα 18 που ακολουθεί φαίνονται κύτταρα ψευδομονάδων του είδους *P.fluorescens* (που κυριαρχεί στα μύδια) με την εντυπωσιακή μορφή που έχουν αυτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



**Εικόνα 18:** Κύτταρα *Pseudomonas fluorescens* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο(<http> 9)

Ένα ειδικό στέλεχος μάλιστα του βακτηρίου *P.fluorescens* (το CL145A) έχει αποδειχθεί ότι όταν εμφανιστεί στα μύδια *Dreissena* spp. προκαλούν καταστροφή των κυττάρων του πεπτικού συστήματος των μυδιών αυτών (Εικ. 19).



**Εικόνα 19:** Επιθηλιακά κύτταρα(λευκά τόξα) πεπτικού συστήματος υγιών μυδιών (αριστερά) και κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα πεπτικού συστήματος μυδιών μετά από θεραπεία για *P.fluorescens* με άφθονα ερυθρά λόγω αιμορραγίας (δεξιά) (<http>9)

Η *Shewanella putrefaciens* επίσης ανήκει στους SSOs και είναι βακτήριο αρνητικό κατά Gram που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειοαναγωγικών (βακτήρια που παράγουν υδρόθειο).

Το *Photobacterium phosphoreum* ανήκει στο γένος *Vibrio* και μαζί με το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* αποτελούν χαρακτηριστικά SSOs των αλιευμάτων, τα οποία σε κάποιες συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προκαλούν εντονότερες αλλοιώσεις στα αλιεύματα.

Στους ειδικούς μικροοργανισμούς αλλοίωσης ανήκουν ακόμη οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως του γένους *Lactobacillus* ) καθώς και εντεροβακτηριοειδή (*Enterobacter* spp.) που αναπτύσσονται συχνότατα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα αλιεύματα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους

Ο υπολογισμός των SSOs είναι απαραίτητος σε οποιοδήποτε πειραματισμό αφορά προσπάθεια για τη βελτίωση του χρόνου συντήρησης (shelf-life) των αλιευμάτων.

## **1.8 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης διαλύματος χιτοζάνης και οξικού οξέος στο χρόνο συντήρησης υπό ψύξη (4 °C) αποκελυφωμένων μυδιών *Mytilus galloprovincialis*.

Για την πραγματοποίηση του στόχου αυτού εκτιμήθηκαν μικροβιακές παράμετροι (αρίθμηση ψυχρότροφων βακτηρίων, ψευδομονάδων, οξυγαλακτικών βακτηρίων, θειοαναγωγικών βακτηρίων και εντεροβακτηριοειδών), καθώς και η μεταβολή του pH , κατά την διάρκεια συντήρησης. Οι μετρήσεις των παραπάνω παραμέτρων έγιναν ανά 48 h για διάστημα 6 ημερών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά στον τομέα της επεξεργασίας, μεταποίησης και διακίνησης των μυδιών, που αποτελούν σημαντική πηγή εισοδήματος για τη χώρα μας.

## 2 . ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν μύδια του είδους *M. galloprovincialis*, τα οποία αγοράστηκαν από την κεντρική ιχθυαγορά Μοδιάνου της Θεσσαλονίκης και προέρχονταν από μυδοκαλλιέργεια της περιοχής του Μακρυγιάλου του νομού Πιερίας. Τα εν λόγω μύδια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ) μέσα σε δίχτυ και διατηρημένα σε πάγο (Εικ.20).



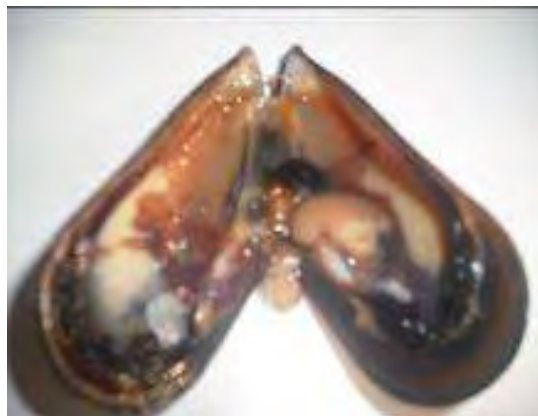
**Εικόνα 20:** Συσκευασία φρέσκων μυδιών σε δίχτυ από μυδοκαλλιέργεια του Μακρύγαλου Πιερίας



**Εικόνα 21:** Κλειστό μύδι *Mytilus galloprovincialis*



**Εικόνα 22:** Ανοικτό μύδι θηλυκού γένους *Mytilus galloprovincialis*



**Εικόνα 23:** Ανοικτό μύδι αρσενικού γένους *Mytilus galloprovincialis*

Τα μύδια στη συνέχεια πλύθηκαν καλά με στόχο την απομάκρυνση όλων των φερτών υλικών που έφεραν στην επιφάνειά τους, χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, διανοίχτηκαν με αποστειρωμένο μαχαίρι και η σάρκα τους, χωρίς το ενδοθυρικό υγρό εισήχθη σε αποστειρωμένους γυάλινους περιέκτες, οι οποίοι τοποθετήθηκαν πάνω στον ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας του εργαστηρίου (DENVER INSTRUMENT) ( Εικ. 24 ).



**Εικόνα 24 :** Ζύγιση σάρκας μυδιών σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας.

Η κάθε μια ομάδα μυδιών περιλάμβανε περίπου 150 gr σάρκας μυδιών (υπολογίστηκαν οι ποσότητες δειγμάτων, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, για 4 δειγματοληψίες :  $4 \times 25$  gr για τις μικροβιολογικές εξετάσεις (ψυχρότροφα βακτήρια, ψευδομονάδες, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτηριοειδή και θειοαναγωγικά βακτήρια) και  $4 \times 10$  gr για τη μέτρηση του pH. Το πείραμα επαναλήφθηκε με τρεις διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς μυδιών.

Στις σάρκες των μυδιών της πρώτης ομάδας (ομάδα νερού-μάρτυρας) προστέθηκε διπλάσια ποσότητα αποστειρωμένου νερού, στο οποίο η σάρκα των μυδιών παρέμεινε για 30 min. Στη συνέχεια το νερό αυτό απορρίφθηκε και προστέθηκε εκ νέου ίδια ποσότητα αποστειρωμένου νερού.



Ομοίως, στις σάρκες των μυδιών της δεύτερης ομάδας (ομάδα χιτοζάνης) προστέθηκε διάλυμα χιτοζάνης (chitosan low molecular weight, ALDRICH) 5% σε 0.5 % οξικό οξύ (Fan et al, 2009), στο οποίο η σάρκα των μυδιών παρέμεινε για 30 min. (Εικ. 25). Στη συνέχεια το διάλυμα χιτοζάνης απορρίφθηκε και προστέθηκε εκ νέου ίδια ποσότητα αποστειρωμένου νερού.



**Εικόνα 25:** Σκεύασμα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους

Τέλος στις σάρκες των μυδιών της τρίτης ομάδας (ομάδα οξικού οξέος) προστέθηκε διάλυμα οξικού οξέος 0.5 %, στο οποίο επίσης η σάρκα των μυδιών παρέμεινε για 30 min. Στη συνέχεια το διάλυμα οξικού οξέος απορρίφθηκε και προστέθηκε εκ νέου ίδια ποσότητα αποστειρωμένου νερού.

Και οι τρεις εξεταζόμενες ομάδες μυδιών μετά τα 30 min εισήχθησαν λοιπόν σε αποστειρωμένο νερό και με αυτή τη μορφή παρέμειναν στην ψύξη (4 °C ) μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα (144 h).

Από την κάθε ομάδα, παίρνονταν κάθε 48 h δείγμα 25 gr για τις μικροβιολογικές εξετάσεις (OMX, ψευδομονάδες, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτηριοειδή και θειοαναγωγικά βακτήρια) καθώς και 10 gr σάρκας για τη μέτρηση του pH, πάντα με τη χρησιμοποίηση αποστειρωμένης λαβίδας ξεχωριστής για το κάθε δείγμα. Ακολούθως τα δείγματα εισάγονταν σε αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες Stomacher.

Η διαδικασία αυτούσια επαναλήφθηκε 4 φορές (ημέρα 0, 48h, 96h, και 144 h) για την κάθε ομάδα.

## **2.2 Μεταβολή pH**

Μέσα στον αποστειρωμένο πλαστικό περιέκτη Stomacher που περιείχε τα 10 gr σάρκας μυδιών για τη μέτρηση του pH προσθέτονταν 90 ml απεσταγμένου νερού και το εν λόγω μείγμα τοποθετούνταν σε ειδική συσκευή ομογενοποίησης Stomacher του εργαστηρίου με σκοπό την αποτελεσματική ομογενοποίησή του για 2-3 λεπτά.

Στη συνέχεια μετριόταν το pH με ειδικό pHμετρο (WTW, pH 90). Ο αισθητήρας του pHμετρου αρχικά ξεπλενόταν με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια βυθιζόταν στο ομογενοποιημένο μείγμα των μυδιών και καταγραφόταν η τιμή του pH.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις τρεις ομάδες μυδιών του πειράματος στις ημέρες της δειγματοληψίας που αναφέρθηκαν παραπάνω.

## **2.3 Αρίθμηση των ψυχρότροφων βακτηρίων**

Μέσα στον πλαστικό περιέκτη εκτός από τη σάρκα μυδιών της ποσότητας των 25 gr προσθέτονταν αποστειρωμένο διάλυμα πεπτόνης 0,1% σε ποσότητα 225 ml.

Το διάλυμα πεπτόνης παρασκευάστηκε στο εργαστήριο της Υγιεινής Τροφίμων του Α.Π.Θ διαλύοντας ποσότητα 1 gr σκόνης πεπτόνης σε 1 λίτρο αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα θερμαινόταν και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε γυάλινους περιέκτες σε ποσότητα 225ml. Οι περιέκτες ακολούθως τοποθετούνταν σε κλίβανο αποστείρωσης του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας του Α.Π.Θ και αποστειρώνονταν.

Στη συνέχεια το όλο μείγμα τοποθετούνταν σε συσκευή ομογενοποίησης Stomacher ώστε να αναμιχθεί και να ομογενοποιηθεί καλά. Από το ομογενοποιημένο μείγμα μυδιών που θεωρούνταν η πρώτη αραιώση ( $10^{-1}$ ) συλλέγονταν ποσότητα 1 ml με αποστειρωμένη πιπέτα και γίνονταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις αυτού ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) (1ml δείγματος σε 9 ml πεπτόνης). Συγκεκριμένα από την  $10^{-1}$  αραιώση παίρνονταν με αποστειρωμένη πιπέτα 1 ml και προσθέτονταν στο φιαλίδιο της δεύτερης αραιώσης ( $10^{-2}$ ) με άσηπτο τρόπο κοντά στη φλόγα μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Το φιαλίδιο τοποθετούνταν σε συσκευή Vortex για περαιτέρω ανάδευση. Με τον ίδιο τρόπο γίνονταν και όλες οι επόμενες αραιώσεις. Από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα, παίρνονταν δύο σειρές δειγμάτων (διπλή σειρά δειγμάτων) και ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε μικροβιακό δείκτη αντιπροσώπευε την συγκέντρωση των αντίστοιχων μικροβίων για την αντίστοιχη ομάδα.

Αφού παρασκευάστηκαν όλες οι δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων που κρίθηκαν απαραίτητες, ακολούθησε η διαδικασία του ενοφθαλμισμού των δειγμάτων στο κατάλληλο υπόστρωμα (Plate count agar – PCA, LAB-M, LAB 10) (Εικ. 26).



**Εικόνα 26:** Θρεπτικό υπόστρωμα PCA(δεξιά)ειδικό για την ανάπτυξη OMX ψυχρότροφων βακτηρίων

Το θρεπτικό υλικό PCA παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων του Α.Π.Θ όπως και το διάλυμα της πεπτόνης . Διαλύονταν ποσότητα 23.5 gr σκόνης υποστρώματος σε 1 λίτρο αποσταγμένου νερού και στην συνέχεια θερμαίνονταν μέχρι βρασμού. Τέλος, μοιράζονταν σε γυάλινες φιάλες χωρητικότητας 250 ml, οι οποίες αποστειρώνονταν στον κλίβανο αποστείρωσης του εργαστηρίου της Ιχθυοπαθολογίας.

Το έτοιμο υπόστρωμα στη συνέχεια τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο του εργαστηρίου της Υγιεινής τροφίμων με σκοπό να κατέβει η θερμοκρασία του στους 40-45 °C. Η μείωση αυτή της θερμοκρασίας του υποστρώματος είναι απολύτως απαραίτητη ώστε να μην θανατωθούν τα μικρόβια και δεν μπορέσουν να αναπτυχθούν.

Στη συνέχεια, από κάθε μία από τις διαδοχικές αραιώσεις συλλέγονταν με άσηπτο τρόπο (κοντά σε φλόγα) με αποστειρωμένη πιπέτα 1 ml δείγματος και εισάγονταν σε αποστειρωμένο petri. Όπως αναφέρθηκε, για κάθε μία αραιώση των δειγμάτων χρησιμοποιούνταν δύο επαναλήψεις (διπλή σειρά δειγμάτων) .

Μετά τον ενοφθαλμισμό του 1 ml δείγματος στο petri με την αποστειρωμένη πιπέτα, ακολουθούσε η διαδικασία της ενσωμάτωσης, κατά την οποία εισερχόταν στο petri ποσότητα 15 ml καλλιεργητικού υλικού PCA.

Τα έτοιμα petri αφήνονταν κάποια λεπτά για να στερεοποιηθούν και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε επωαστικό ψυκτικό θάλαμο των 7 °C (ψυχρότροφα) για να επωαστούν για χρόνο 7 ημερών.

Η διαδικασία που περιγράφηκε αυτούσια επαναλαμβανόταν για την ομάδα των μυδιών που είχε εμβαπτιστεί σε νερό (που ονομάστηκε ομάδα μάρτυρας), όσο και για τις υπόλοιπες δύο εξεταζόμενες ομάδες, εκείνη που είχε εμβαπτιστεί στη χιτοζάνη (που ονομάστηκε ομάδα χιτοζάνης) καθώς και εκείνη που είχε εμβαπτιστεί στο οξικό οξύ (που ονομάστηκε ομάδα οξικού οξέος).

#### **2.4 Αρίθμηση των ψευδομονάδων**

Για την αρίθμηση των ψευδομονάδων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* agar (PS agar) – LAB-M 108) (Εικ.27).



**Εικόνα 27:** Θρεπτικό υπόστρωμα PS agar (δεξιά) εκλεκτικό για την ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

Για την αρίθμηση των ψευδομονάδων εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής εξάπλωσης.

Αρχικά παρασκευαζόταν το καλλιεργητικό υλικό με διάλυση 48,4 gr σκόνης υποστρώματος ψευδομονάδας σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό. Σ' αυτό στη συνέχεια προστιθόταν 10 ml γλυκερόλης και το όλο διάλυμα αποστειρώνόταν στον κλίβανο αποστείρωσης του εργαστηρίου ιχθυοπαθολογίας του Α.Π.Θ. Μετά την αποστείρωση και αφού η θερμοκρασία του έπεφτε σε αυτή της θερμοκρασίας δωματίου, διαλύονταν μέσα σ' αυτό δύο φιαλίδια εκλεκτικών παραγόντων LAB-M 107(CN) και LAB-M 108(CFC), τα οποία επέτρεπαν την εκλεκτική ανάπτυξη των ψευδομονάδων στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Στη συνέχεια το καλλιεργητικό υλικό επιστρώονταν σε petri τα οποία και διατηρούνταν στο ψυγείο μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Ακολούθως σε κάθε petri εισαγόταν 0,1 ml ομογενοποιημένου δείγματος μυδιών από κάθε αραίωση (όπως αναφέρθηκε πιο πάνω) με αποστειρωμένη πιπέτα και ενοφθαλμιζόταν σε ολόκληρη την επιφάνεια του υποστρώματος με κυκλικές κινήσεις με ειδική αποστειρωμένη πλαστική κεκαμένη λαβίδα. Ακολουθούσε επώαση στους 25<sup>0</sup>C για 48 ώρες.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν αυτούσια και για τις τρεις ομάδες (νερού, χιτοζάνης, οξικού οξέος) για τους τρεις εξεταζόμενους πληθυσμούς την κάθε ημέρα της δειγματοληψίας .

## **2.5 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων**

Για την αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar.

Το εν λόγω υπόστρωμα παρασκευάστηκε όπως και όλα τα προηγούμενα στο εργαστήριο της Υγιεινής Τροφίμων του Α.Π.Θ με διάλυση 70 gr σκόνης υποστρώματος σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα βραζόταν για μικρό χρονικό διάστημα και στην συνέχεια εναποτίθετο σε γυάλινους περιέκτες των 250 ml, εντός των οποίων και αποστειρώνόταν.

Όλα τα υποστρώματα που παρασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια του εν λόγω πειραματισμού τοποθετούνταν στο ψυγείο και πριν τη χρησιμοποίησή τους εισάγονταν σε φούρνο μικροκυμάτων για να λιώσουν.

Πριν την χρήση τοποθετούνταν υδατόλουτρο για να κατέβει η θερμοκρασία του ώστε να μην κάψει τα οξυγαλακτικά βακτήρια και δεν παρατηρηθεί ανάπτυξή τους.

Ακολουθήθηκε η παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων, ο ενοφθαλμισμός του υποστρώματος με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης και στη συνέχεια έγινε επιστιβάδευση 10 ml υποστρώματος MRS agar .

Η επιστιβάδευση συνέβη σε όλες τις καλλιέργειες των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και των εντεροβακτηριοειδών και των θειοαναγωγικών βακτηρίων που θα ακολουθήσουν, ενώ δε συνέβη στις καλλιέργειες της OMX στο plate count agar (PCA), ενώ τα έτοιμα petri με τις καλλιέργειες των οξυγαλακτικών επωάζονταν για τουλάχιστον 72 ώρες σε επωαστικό θάλαμο των 37 °C.

## **2.6 Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών**

Όσον αφορά τους πληθυσμούς των εντεροβακτηριοειδών, ακολουθήθηκε παρόμοια με την OMX και τα οξυγαλακτικά διαδικασία καλλιέργειας αυτών. Η διαφορά που παρατηρήθηκε στα εν λόγω βακτήρια ήταν στο είδος του καλλιεργητικού υποστρώματος και κυρίως του τρόπου παρασκευής του.

Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται τα εντεροβακτηριοειδή και το οποίο παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της παρούσας εργασίας είναι το VRGBA (Violet Red Glucose Bile Agar) της εταιρείας LAB-M.

Το υπόστρωμα αυτό παρασκευάστηκε με την διάλυση 38,5 gr σκόνης VRGBA σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό χωρίς το όλο διάλυμα να έρθει σε συνθήκες αποστείρωσης (βασική διαφορά από όλα τα υπόλοιπα καλλιεργητικά υλικά που αναφέρθηκαν).

Χρησιμοποιήθηκε και εδώ η μέθοδος της ενσωμάτωσης όπως στα ψυχρότροφα και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ακολούθησε επιστιβάδευση 10ml υποστρώματος και οι καλλιέργειες των εντεροβακτηριοειδών αφέθηκαν να επωαστούν στον ίδιο επωαστικό κλίβανο με τα οξυγαλακτικά (37 °C για 24 ώρες).

## **2.7 Αρίθμηση θειοαναγωγικών βακτηρίων**

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι μία κατηγορία βακτηρίων που ανήκουν όπως και τα προηγούμενα στους ειδικούς μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοιώσεις στα αλιεύματα (specific spoilage organisms – SSOs), ανάγουν το θείο παράγοντας υδρόθειο και για το λόγο αυτό λέγονται H<sub>2</sub>S – producing bacteria με χαρακτηριστικό εκπρόσωπό τους τον μικροοργανισμό *Shewanella putrefaciens*.



Τα θειοαναγωγικά βακτήρια αναπτύσσονται στο θρεπτικό υπόστρωμα Iron agar, το οποίο περιέχει ποσότητες σιδήρου στα συστατικά του και οι αποικίες που σχηματίζουν έχουν χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα.

Στο συγκεκριμένο υπόστρωμα εκτός από τις αποικίες των θειοαναγωγικών βακτηρίων μπορούν να καταμετρηθούν και οι αποικίες της OMX (αερόβιων βακτηρίων).

Το Iron agar (Lyngby) που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της παρούσας εργασίας δεν ήταν έτοιμο σε σκόνη όπως τα προηγούμενα που αναφέρθηκαν, αλλά παρασκευάστηκε από τα υλικά που υπήρχαν στο εργαστήριο της Υγιεινής Τροφίμων σύμφωνα με την εξής ενδεδειγμένη συνταγή που ανάγεται στο λίτρο :

α) Πεπτόνη	20 γρ.
β) Άγαρ	12 γρ.
γ) Χλωριούχο νάτριο	5 γρ.
δ) Σκόνη βόειου κρέατος	3 γρ.
ε) Σκόνη ζύμης	3 γρ.
στ) L – κυστεΐνη	0,6 γρ.
ζ) Κιτρικός σίδηρος	0,3 γρ.
η) Θειοθειϊκό νάτριο	0,3 γρ.

Τα παραπάνω υλικά με τις ποσότητες που αναφέρθηκαν διαλύθηκαν σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού, επήλθαν σε θερμοκρασία βρασμού, γινόταν μέτρηση της τιμής του pH και εισήχθησαν στη συνέχεια σε γυάλινους περιέκτες των 250ml εντός των οποίων και αποστειρώθηκαν. Διατηρήθηκαν στο ψυγείο και πριν τη χρησιμοποίηση εισάγονταν σε φούρνο μικροκυμάτων για να λιώσουν, ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν.

Ακολουθήθηκε στη συνέχεια η γνωστή διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων και οι καλλιέργειες έγιναν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (1ml δείγματος από κάθε αραιώση στο petri με αποστειρωμένη πιπέτα και 15 ml θρεπτικού υποστρώματος Iron agar). Μετά τη στερεοποίηση ακολούθησε η επιστιβάδευση 5 ml Iron agar σε όλα τα petri.

Τα έτοιμα petri με τις καλλιέργειες των θειοαναγωγικών βακτηρίων έγιναν με τον ίδιο τρόπο και για τις τρεις εξεταζόμενες ομάδες μυδιών (νερού, χιτοζάνης και οξικού οξέος ) και αφέθηκαν να επωαστούν στον επωαστικό θάλαμο των 25 °C για χρονικό διάστημα 72 ωρών.

Στο Iron agar μετρήθηκαν αποικίες θειοαναγωγικών βακτηρίων (μαύρου χρώματος) καθώς και αποικίες ολικής αερόβιας μικροβιακής χλωρίδας – OMX (που εκπροσωπείτο από το σύνολο των μαύρων αποικιών των θειοαναγωγικών και όλων των υπόλοιπων λευκών αποικιών από τα υπόλοιπα αερόβια βακτήρια) .

## **2.8 Στατιστική επεξεργασία**

Για όλους τους μικροβιακούς δείκτες και για το pH, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος t-test για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και οι τιμές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν  $P < 0,05$ . Αφού επιβεβαιώθηκε ότι μεταξύ των τριών πλυθυσμών δεν υπήρχε στατιστική διαφορά στις μετρήσεις, οι τιμές των τριών πληθυσμών για τον κάθε μικροβιακό δείκτη χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν οι τρεις ομάδες ( νερού, χιτοζάνης, οξικού οξέος ) μεταξύ τους.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Μεταβολή pH

Κατά τη μέτρηση του pH των τριών πληθυσμών μυδίων *M. Galloprovincialis* στα τρία μέσα διατήρησής τους (νερό, χιτοζάνη, οξικό οξύ) σημειώθηκαν οι εξής τιμές που παρατίθενται στον πίνακα 7.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7:** Μεταβολή pH κατά τη συντήρηση των μυδίων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O.  $\pm$  SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδίων. Οι εκθέτες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία.

pH	0 h	48 h	96 h	144 h
νερό	6.50 $\pm$ 0.025 <sup><math>\alpha</math></sup>	6.42 $\pm$ 0.02 <sup><math>\alpha</math></sup>	6.35 $\pm$ 0.03 <sup><math>\alpha</math></sup>	6.30 $\pm$ 0.02 <sup><math>\alpha</math></sup>
χιτοζάνη	5.75 $\pm$ 0.18 <sup><math>\beta</math></sup>	5.45 $\pm$ 0.15 <sup><math>\beta</math></sup>	5.45 $\pm$ 0.13 <sup><math>\beta</math></sup>	5.38 $\pm$ 0.12 <sup><math>\beta</math></sup>
Οξικό οξύ	5.10 $\pm$ 0.13 <sup><math>\gamma</math></sup>	4.92 $\pm$ 0.081 <sup><math>\gamma</math></sup>	4.91 $\pm$ 0.034 <sup><math>\gamma</math></sup>	4.90 $\pm$ 0.05 <sup><math>\gamma</math></sup>

### 3.2. Αρίθμηση των ψυχρότροφων βακτηρίων σε PCA agar, στους 7 °C.

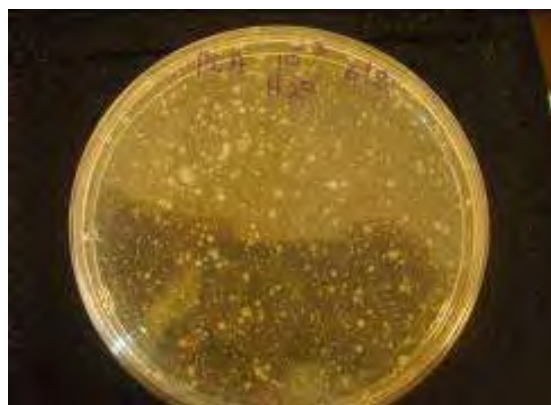
Κατά την αρίθμηση των ψυχρότροφων βακτηρίων που έλαβε επίσης χώρα στο εργαστήριο της Υγιεινής Τροφίμων του Α.Π.Θ στους τρεις πληθυσμούς *M. galloprovincialis* που διατηρήθηκαν στα τρία μέσα (νερό, χιτοζάνη, οξικό οξύ) για 30min, βρέθηκαν οι κάτωθι τιμές (M.O  $\pm$  SD) που παρατίθενται στον πίνακα 8. Οι εικόνες 28 – 34 δείχνουν χαρακτηριστικές αποικίες που αριθμήθηκαν στις διάφορες δειγματοληψίες με τη βοήθεια ειδικού οργάνου αρίθμησης αποικιών μικροβίων με φωτεινή πηγή.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8:** Αρίθμηση ψυχρότροφων βακτηρίων σε PCA agar, στους 7 °C. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδιών. Οι εκθέτες α, β, γ δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία.

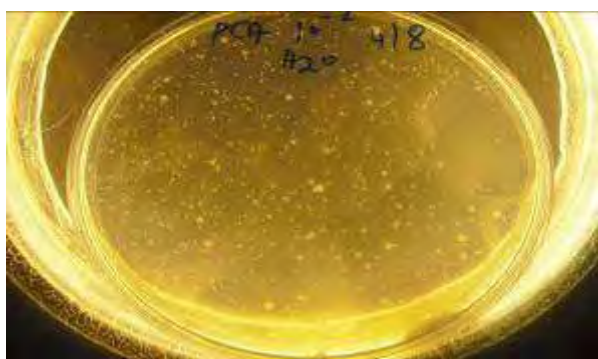
	0 h	48 h	96 h	144 h
	Ψυχρότροφα (PCA) cfu/ml	Ψυχρότροφα (PCA) cfu/ml	Ψυχρότροφα (PCA) cfu/ml	Ψυχρότροφα (PCA) cfu/ml
<b>νερό</b>	$2.1 \times 10^3 \pm 0.8^a$	$2.4 \times 10^4 \pm 0.3^a$	$9.3 \times 10^4 \pm 1.6^a$	$5.2 \times 10^5 \pm 0.3^a$
<b>χιτοζάνη</b>	$5.65 \times 10^2 \pm 225^b$	$2.5 \times 10^2 \pm 50^b$	$2.05 \times 10^2 \pm 95^b$	$1.55 \times 10^2 \pm 65^b$
<b>Οξικό οξύ</b>	$6.85 \times 10^2 \pm 430^b$	$5 \times 10^1 \pm 50^b$	$0.6 \times 10^1 \pm 5^{\gamma}$	$1.70 \times 10^2 \pm 160^b$



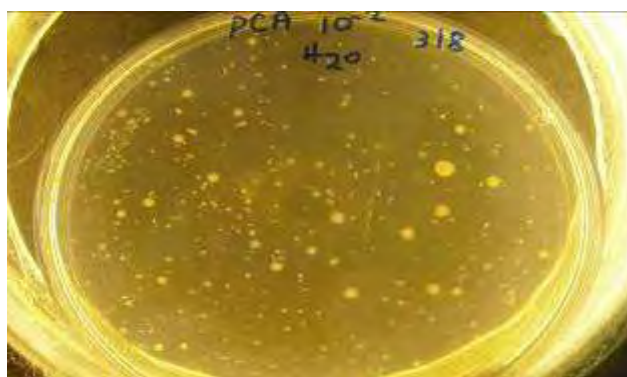
**Εικόνα 28:** Αποικίες ψυχρότροφων σε αραιώση  $10^{-3}$  στις 96h (ομάδα μάρτυρα Α)



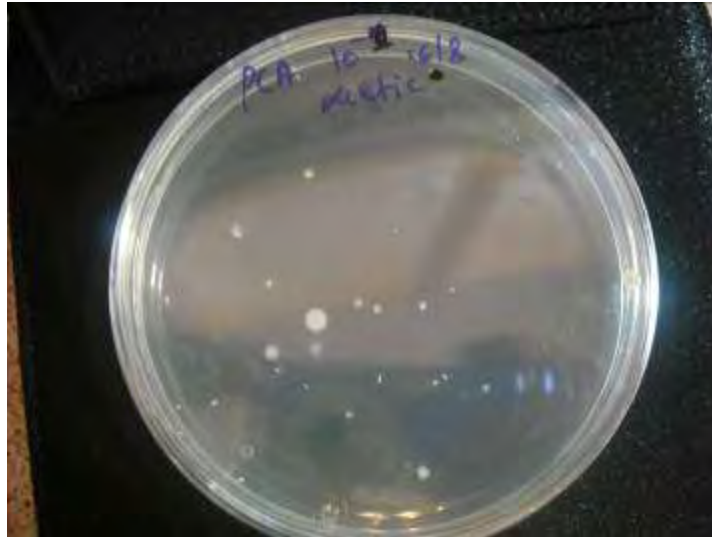
**Εικόνα 29:** Αποικίες ψυχρότροφων ( $10^{-3}$ ) στις 96h (ομάδα μάρτυρα Β)



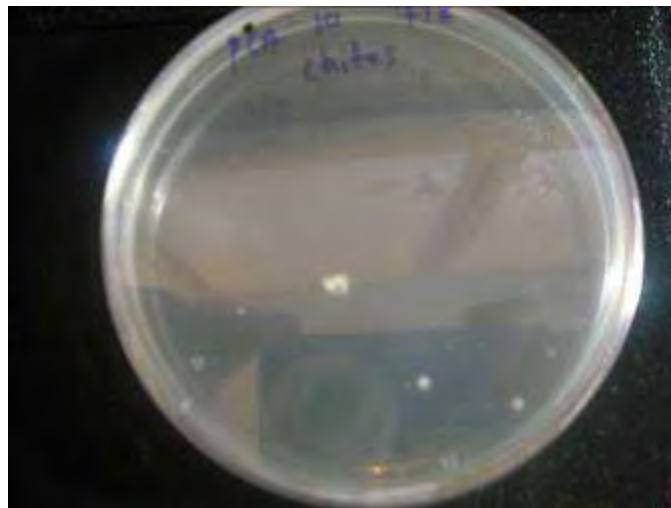
**Εικόνα 30:** Αποικίες ψυχρότροφων ( $10^{-2}$ ) στις 72h (ομάδα μάρτυρα Β)



**Εικόνα 31:** Αποικίες ψυχρότροφων ( $10^{-2}$ ) στις 72h (ομάδα μάρτυρα Α)



**Εικόνα 32:** Αποικίες ψυχρότροφων (οξικού οξέος) αραιώση  $10^{-1}$  (96h)



**Εικόνα 33:** Αποικίες ψυχρότροφων (χιτοζάνης) αραιώσης  $10^{-1}$  (144h)



**Εικόνα 34:** Αποικίες ψυχρότροφων (χιτοζάνης) αραιώσης  $10^{-1}$  (96h)

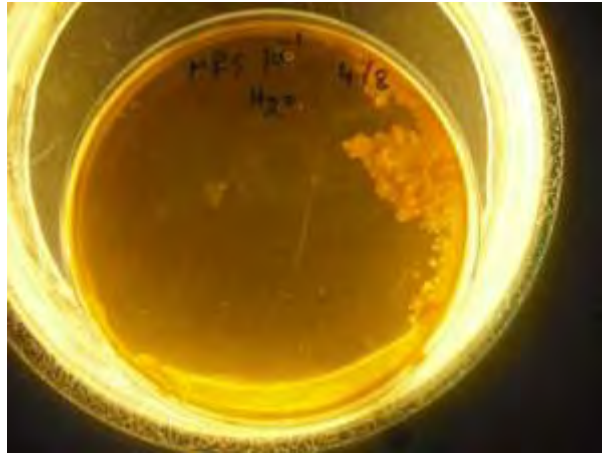
### 3.3 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Κατά την αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων μέσω των αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά την περίοδο επώασης των 72 ωρών στο καλλιεργητικό υπόστρωμα MRS στους τρεις πληθυσμούς μυδιών που διατηρήθηκαν στα τρία υλικά (νερό, χιτοζάνη, οξικό οξύ) για 30 min, βρέθηκαν οι τιμές που παρατίθενται στον πίνακα 9 .

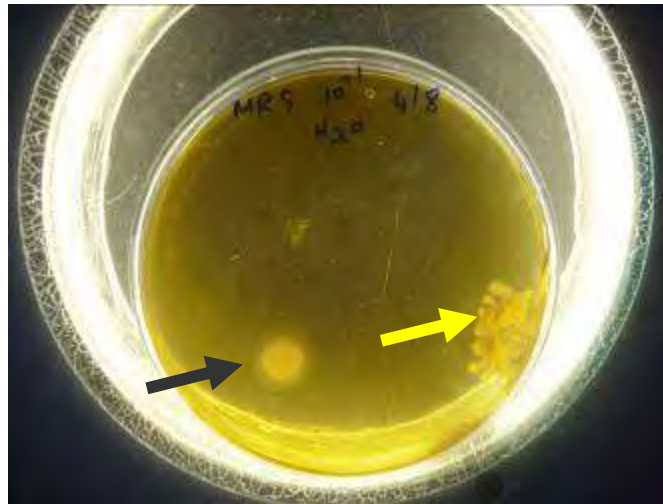
**ΠΙΝΑΚΑΣ 9:** Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδιών. Οι εκθέτες α, β δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία.

	0 h	48 h	96 h	144 h
	Οξυγαλακτικά cfu/ml	Οξυγαλακτικά cfu/ml	Οξυγαλακτικά cfu/ml	Οξυγαλακτικά cfu/ml
<b>νερό</b>	$2.78 \times 10^2 \pm 203^a$	$1 \times 10^1 \pm 0^a$	$2.5 \times 10^1 \pm 25^a$	$2 \times 10^1 \pm 0^a$
<b>χιτοζάνη</b>	$1.5 \times 10^1 \pm 5^b$	$0 \pm 0^b$	$0 \pm 0^a$	$0.5 \times 10^1 \pm 5^b$
<b>Οξικό οξύ</b>	$9.1 \times 10^1 \pm 53^a$	$0 \pm 0^b$	$1 \times 10^1 \pm 10^a$	$0 \pm 0^b$

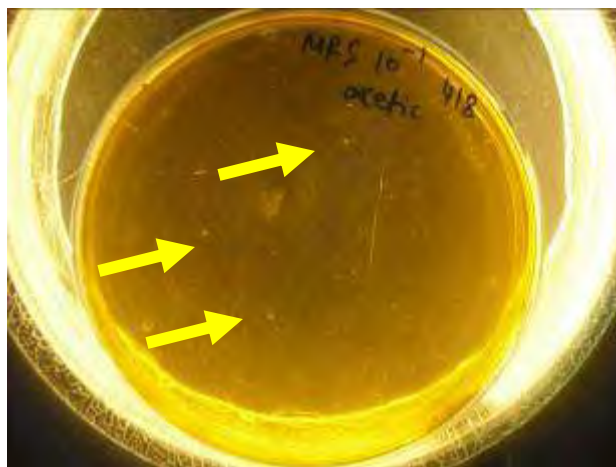
Οι εικόνες Εικ.35-37 δείχνουν χαρακτηριστικές αποικίες που αριθμήθηκαν στις διάφορες δειγματοληψίες με τη βοήθεια ειδικού οργάνου αρίθμησης αποικιών μικροβίων με φωτεινή πηγή. Οι αποικίες στο υπόστρωμα MRS δεν αναπτύχθηκαν ιδιαίτερα εκτός από την πρώτη ημέρα (0h) και είχαν στο δείγμα μάρτυρα (μύδια σε νερό) επιπλοκή από μύκητες.



**Εικόνα 35:** Αποικίες οξυγαλακτικών (σχηματισμός δεξιά) σε ομάδα μάρτυρα στην αραιώση  $10^{-1}$



**Εικόνα 36:** Αποικίες οξυγαλακτικών (κίτρινο βέλος) σε ομάδα μάρτυρα στην  $10^{-1}$  με ανάπτυξη μύκητα (μαύρο βέλος)



**Εικόνα 37:** Αποικίες οξυγαλακτικών (κίτρινα βέλη) σε ομάδα οξικού οξέος

### 3.4 Αρίθμηση εντεροβακτηριοειδών

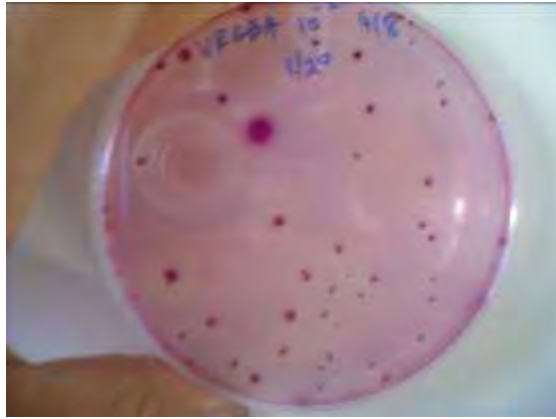
Για την αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών χρησιμοποιήθηκε και πάλι η μέθοδος της ενσωμάτωσης και δημιουργήθηκαν οι χαρακτηριστικές κόκκινες αποικίες (περιβαλλόμενες από ερυθρωπή ζώνη) των εντεροβακτηριοειδών στο εκλεκτικό υπόστρωμα VRGBA agar που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο του πειράματος που περιγράφεται στην παρούσα εργασία. Το θρεπτικό υλικό VRGBA δεν αποστειρωνόταν όπως όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα. Μετά την προετοιμασία των καλλιεργειών, τα έτοιμα petri αφέθηκαν να επωαστούν στον ίδιο επωαστικό θάλαμο με τα οξυγαλακτικά βακτήρια στους 37<sup>0</sup> C για διάρκεια 24 ωρών. Στον πίνακα 10 που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές των εντεροβακτηριοειδών που ανευρέθηκαν στο πείραμα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10:** Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδιών. Οι εκθέτες α, β δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία..

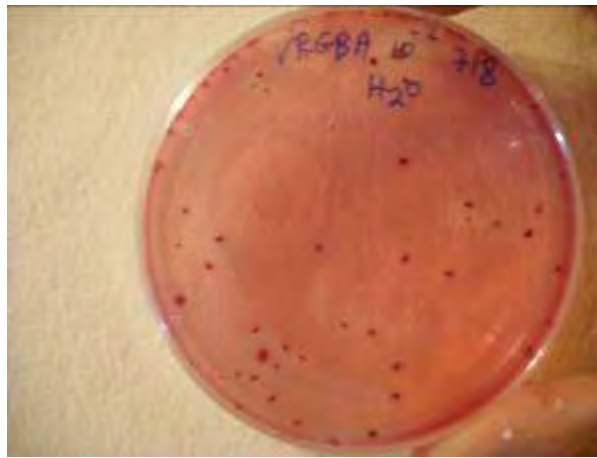
	0 h	48 h	96 h	144 h
	Εντεροβακτηριοειδή cfu/ml	Εντεροβακτηριοειδή cfu/ml	Εντεροβακτηριοειδή cfu/ml	Εντεροβακτηριοειδή cfu/ml
νερό	$1.45 \times 10^2 \pm 5^a$	$1.9 \times 10^2 \pm 52.5^a$	$1.7 \times 10^3 \pm 1.3^a$	$1.05 \times 10^4 \pm 0.1^a$
χιτοζάνη	$2 \times 10^1 \pm 0^b$	$0.75 \times 10^1 \pm 2.5^b$	$3 \times 10^1 \pm 20^b$	$3.25 \times 10^1 \pm 17.5^b$
Οξικό οξύ	$3.75 \times 10^1 \pm 32.5^b$	$0.5 \times 10^1 \pm 5^b$	$1 \times 10^1 \pm 0^b$	$3 \times 10^1 \pm 20^b$

Οι εικόνες Εικ. 38-46 δείχνουν χαρακτηριστικές αποικίες που αριθμήθηκαν στις διάφορες δειγματοληψίες με τη βοήθεια ειδικού οργάνου αρίθμησης αποικιών μικροβίων με φωτεινή πηγή.





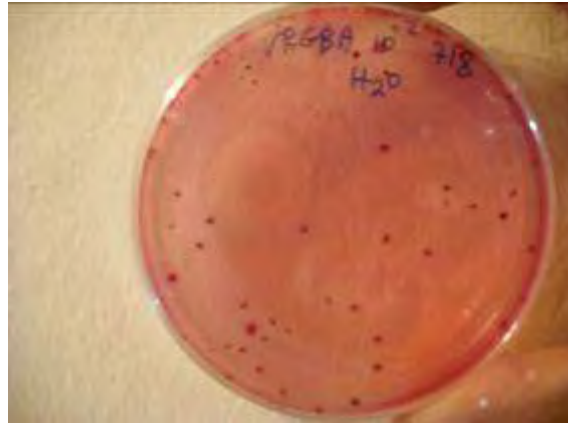
**Εικόνα 38:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην αραιώση  $10^{-2}$  (96h)



**Εικόνα 39:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην  $10^{-2}$  (144h)



**Εικόνα 40:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην  $10^{-2}$  (144h)



**Εικόνα 41:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην  $10^{-2}$  (144h)



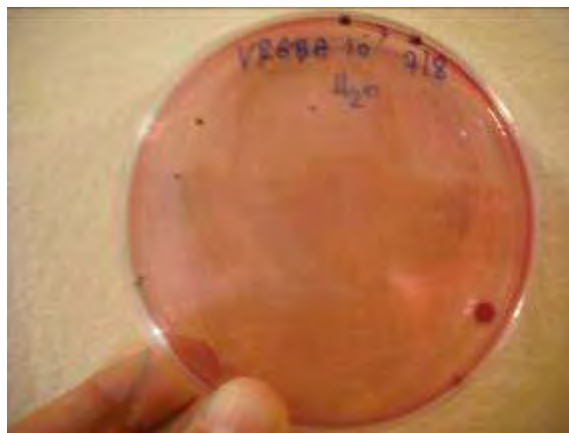
**Εικόνα 42:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην  $10^{-2}$  (96h)



**Εικόνα 43:** Απουσία αποικιών εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα οξικού οξέος στην  $10^{-1}$  (96h)



**Εικόνα 44:** Απουσία αποικιών εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα χιτοζάνης στην  $10^{-2}$  (96h)



**Εικόνα 45:** Αποικίες εντεροβακτηριοειδών σε ομάδα μάρτυρα στην αραιώση  $10^{-3}$  (144h)



**Εικόνα 46:** Μία αποικία εντεροβακτηριοειδούς σε ομάδα οξικού οξέος στην  $10^{-1}$  (96h)

### 3.5 Αρίθμηση των θειοαναγωγικών βακτηρίων

Για την αρίθμηση των θειοαναγωγικών βακτηρίων, τα οποία παράγουν υδρόθειο όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκε η γνωστή μέθοδος της ενσωμάτωσης και το θρεπτικό ειδικό υπόστρωμα Iron agar παρασκευάστηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με ειδική συνταγή που επίσης έχει αναλυτικά προαναφερθεί.

Στην επιστιβάδευση του συγκεκριμένου άγαρ χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα (5ml) σε σχέση με το VRGBA και MRS που επιστιβαδεύονται σε ποσότητα 10ml.

Μετά το πέρας της επώασης και την αρίθμηση των σχηματιζόμενων αποικιών, οι τιμές των θειοαναγωγικών βακτηρίων και της OMX(που απεικονίζει το σύνολο των αερόβιων βακτηρίων) φαίνονται στους πίνακες 11 και 12 που ακολουθούν.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11:** Αρίθμηση των θειοαναγωγικών. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδιών. Οι εκθέτες α, β δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία..

	0 h	48 h	96 h	144 h
	Θειοαναγωγικά cfu/ml	Θειοαναγωγικά cfu/ml	Θειοαναγωγικά cfu/ml	Θειοαναγωγικά cfu/ml
<b>νερό</b>	$2.7 \times 10^2 \pm 1.4^a$	$3.5 \times 10^2 \pm 1.5^a$	$5.3 \times 10^3 \pm 4.5^a$	$8.5 \times 10^4 \pm 3^a$
<b>χιτοζάνη</b>	$3 \times 10^1 \pm 0^b$	$5.6 \times 10^1 \pm 30^a$	$1.5 \times 10^2 \pm 50^b$	$2 \times 10^1 \pm 10^b$
<b>Οξικό οξύ</b>	$5.6 \times 10^1 \pm 41^b$	$0 \pm 0^b$	$5.1 \times 10^1 \pm 47^b$	$1.43 \times 10^2 \pm 128^b$

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12:** Αρίθμηση OMX (ολική αερόβια μικροβιακή χλωρίδα) σε iron agar στους 25 °C. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδιών. Οι εκθέτες α, β δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία..

	0 h	48 h	96 h	144 h
	OMX cfu/ml	OMX cfu/ml	OMX cfu/ml	OMX cfu/ml
<b>νερό</b>	$1 \times 10^3 \pm 1.5^a$	$1.3 \times 10^3 \pm 0.4^a$	$1 \times 10^4 \pm 0.7^a$	$5.6 \times 10^5 \pm 0^a$
<b>χιτοζάνη</b>	$2.15 \times 10^2 \pm 65^b$	$1.93 \times 10^2 \pm 167^b$	$3 \times 10^2 \pm 100^b$	$9.5 \times 10^1 \pm 15^b$
<b>Οξικό οξύ</b>	$3.31 \times 10^2 \pm 246^b$	$2 \times 10^1 \pm 10^b$	$1.16 \times 10^2 \pm 76^b$	$2.36 \times 10^2 \pm 173^b$

Οι εικόνες Εικ. 47-54 δείχνουν χαρακτηριστικές αποικίες που καταμετρήθηκαν στις διάφορες δειγματοληψίες με τη βοήθεια ειδικού οργάνου καταμέτρησης αποικιών μικροβίων με φωτεινή πηγή. Οι αποικίες που παρουσιάζονται είναι δύο ειδών: α) μαύρες που απεικονίζουν τον πληθυσμό των θειοαναγωγικών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στους 25<sup>0</sup> C και β) άσπρες, οι οποίες αθροίζονται με τις μαύρες και στο σύνολό τους απεικονίζουν την ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) που επίσης αναπτύσσεται στους 25<sup>0</sup> C και όχι στους 7<sup>0</sup> C όπως στο PCA άγαρ (εκεί αναπτύσσονται τα ψυχρότροφα βακτήρια).



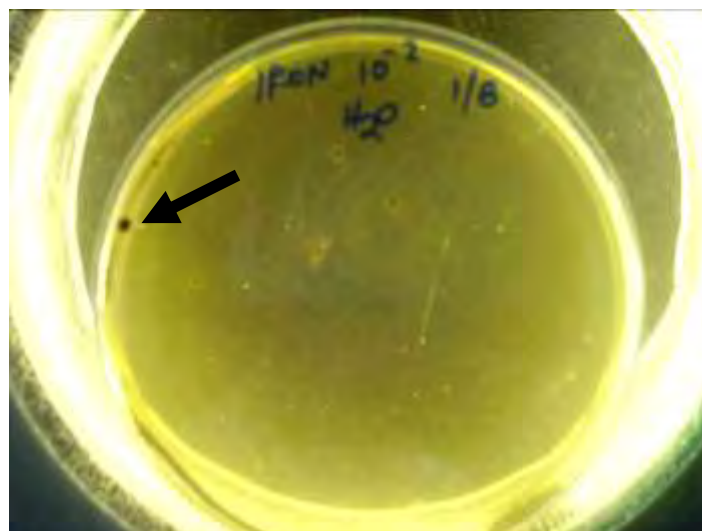
**Εικόνα 47:** Αποικίες θειοαναγωγικών και OMX σε ομάδα μάρτυρα Α στην αραιώση 10<sup>-3</sup> (96h)



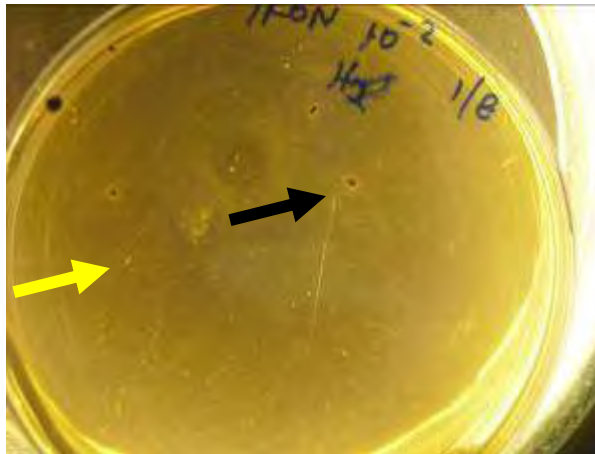
**Εικόνα 48:** Αποικίες θειοαναγωγικών και OMX σε ομάδα μάρτυρα Β στην  $10^{-3}$  (96h)



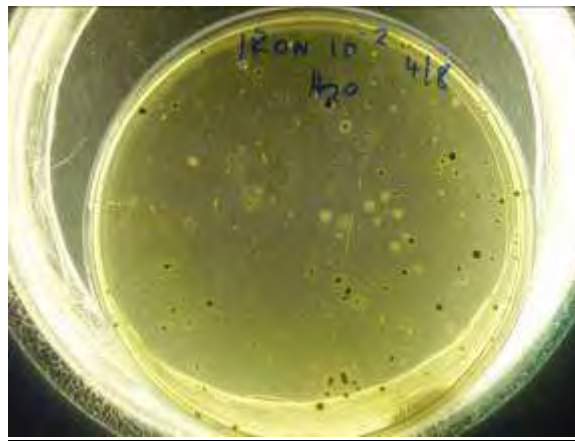
**Εικόνα 49:** Αποικίες θειοαναγωγικών μυδίων σε ομάδα μάρτυρα



**Εικόνα 50:** Αποικίες θειοαναγωγικών(μαύρο βέλος) και OMX σε ομάδα μάρτυρα Β στη  $10^{-2}$  (48h)



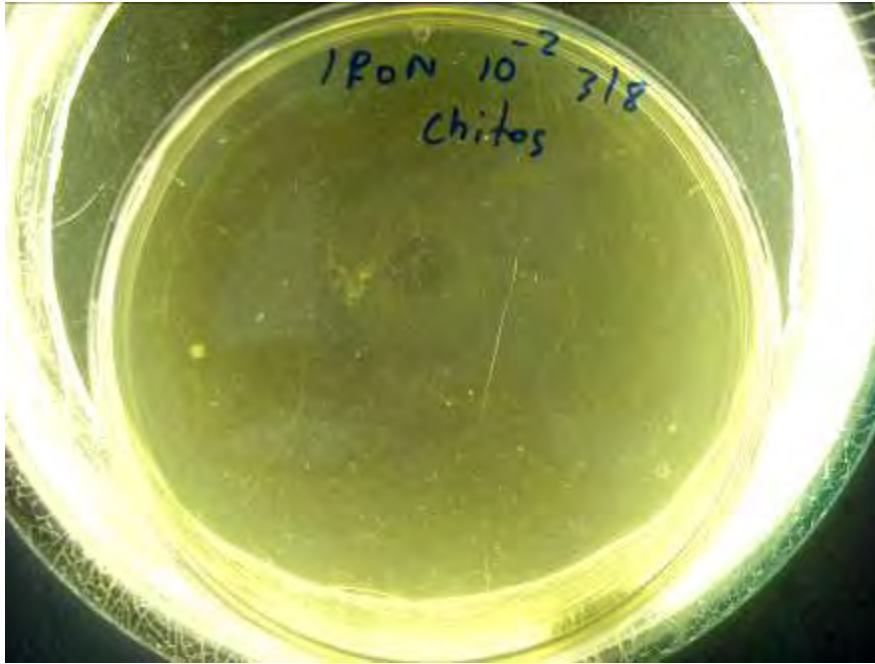
**Εικόνα 51:** Αποικίες θειοαναγωγικών (μαύρο βέλος) και άλλων βακτηριακών ειδών (κίτρινο βέλος) σε ομάδα μάρτυρα B αραιώσης  $10^{-2}$  (48h)



**Εικόνα 52:** Αποικίες θειοαναγωγικών και OMX σε ομάδα μάρτυρα σε αραιώση  $10^{-2}$  στις 48ώρες



**Εικόνα 53:** Αποικίες θειοαναγωγικών και OMX σε οξικό οξύ ( καμία αποικία) στην  $10^{-2}$  (48h)



**Εικόνα 54:** Απουσία αποικιών θειοαναγωγικών και παρουσία αποικιών OMX (ουσιαστικά μία αποικία) σε χιτοζάνη στην  $10^{-2}$  (48h)

### **3.6 Αρίθμηση ψευδομονάδων**

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp* αναπτύσσονται κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και προκαλούν γρήγορα την αλλοίωση του προϊόντος, γιατί και κρίνεται απαραίτητος ο υπολογισμός του αριθμού τους για την εξασφάλιση του χρόνου συντήρησης του εκάστοτε αλιεύματος ώστε να είναι ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση.

Στο συγκεκριμένο πείραμα μετρήθηκε ο πληθυσμός των ψευδομονάδων κατά την συντήρηση των εξεταζόμενων δειγμάτων μυδιών στην ψύξη των  $4^{\circ}$  C μέσω των αποικιών τους που αναπτύχθηκαν στο ειδικό καλλιεργητικό υπόστρωμα *Pseudomonas agar*, με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης.



Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα petri μετά την επώαση αυτών στους 25 °C για 48 ώρες , μετρήθηκαν με προσοχή και τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στον ακόλουθο πίνακα 13.

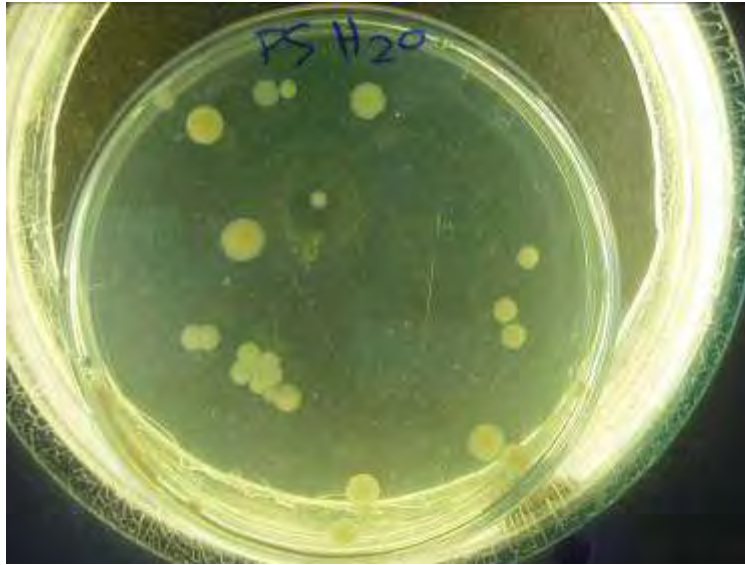
**ΠΙΝΑΚΑΣ 13:** Αρίθμηση ψευδομονάδων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (M.O. ± SD) από τους τρεις πληθυσμούς μυδίων. Οι εκθέτες α, β δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κάθε δειγματοληψία..

	0 h	48 h	96 h	144 h
	Ψευδομονάδες cfu/ml	Ψευδομονάδες cfu/ml	Ψευδομονάδες cfu/ml	Ψευδομονάδες cfu/ml
<b>νερό</b>	$6.03 \times 10^2 \pm 404^a$	$2 \times 10^2 \pm 100^a$	$8.1 \times 10^3 \pm 1.8^a$	$1.9 \times 10^6 \pm 0.3^a$
<b>χιτοζάνη</b>	$1.15 \times 10^2 \pm 75^b$	$0 \pm 0^b$	$2 \times 10^1 \pm 10^b$	$1 \times 10^1 \pm 0^b$
<b>Οξικό οξύ</b>	$1 \times 10^2 \pm 50^b$	$0 \pm 0^b$	$0.5 \times 10^1 \pm 5^b$	$1 \times 10^1 \pm 10^b$

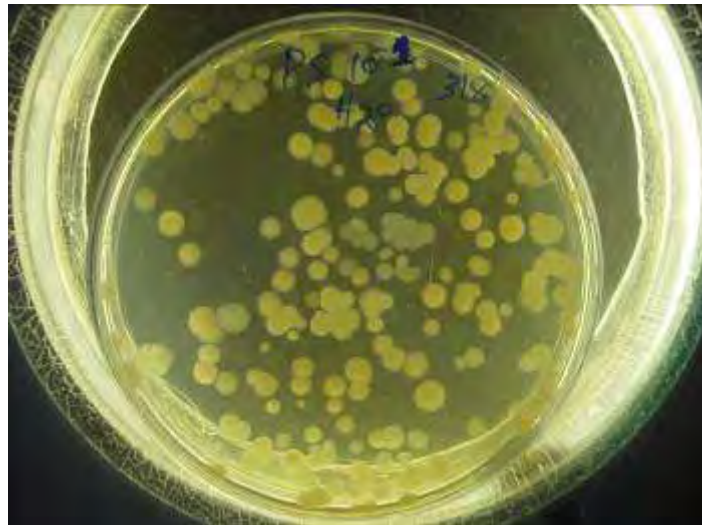
Οι παρακάτω εικόνες (Εικ. 55-62) παρουσιάζουν αποικίες των ψευδομονάδων που αναπτύχθηκαν. Οι αποικίες των ψευδομονάδων είναι πολύ μεγαλύτερες των προηγούμενων βακτηρίων και πολύ χαρακτηριστικές.



**Εικόνα 55:** Αποικίες ψευδομονάδων σε ομάδα μάρτυρα Α (αραίωση  $10^{-3}$ )



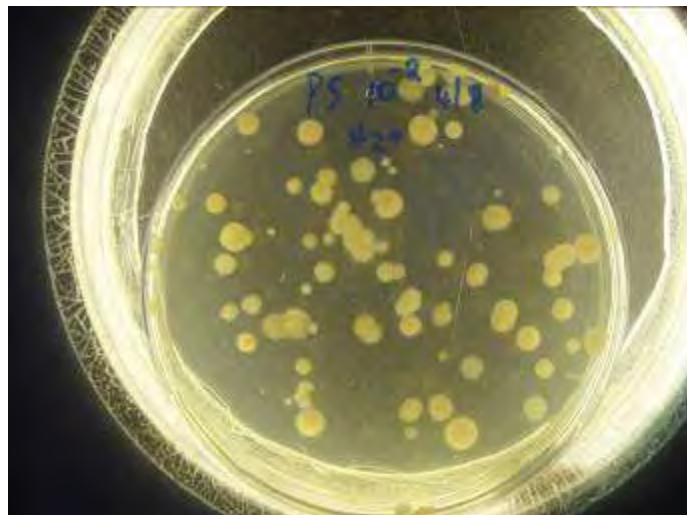
**Εικόνα 56:** Αποικίες ψευδομονάδων σε ομάδα μάρτυρα Β (αραίωση  $10^{-3}$ )



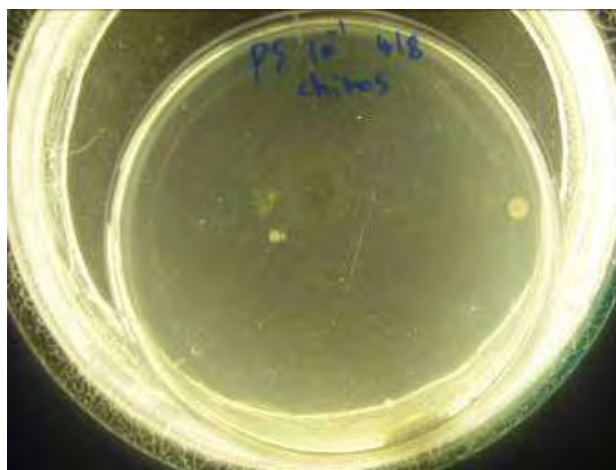
**Εικόνα 57:** Αποικίες ψευδομονάδων σε ομάδα μάρτυρα Β (αραίωση  $10^{-1}$ ) στις 48 ώρες



**Εικόνα 58:** Αποικίες ψευδομονάδων σε ομάδα μάρτυρα Β στην  $10^{-1}$  στις 48 ώρες(μη μετρήσιμες)



**Εικόνα 59:** Αποικίες ψευδομονάδων σε ομάδα μάρτυρα Β στην  $10^{-2}$  στις 48 ώρες



**Εικόνα 60:** Αποικίες ψευδομονάδων σε χιτοζάνη σε αραιώση  $10^{-1}$  στις 48 ώρες δείγματος Β



**Εικόνα 61:** Απουσία αποικιών ψευδομονάδων σε οξικό οξύ στην  $10^{-2}$  στις 48 ώρες



**Εικόνα 62:** Αποικίες ψευδομονάδων σε χιτοζάνη στην  $10^{-1}$  στις 48 ώρες

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Lund et al, 2000) η μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών και οστρακοειδών των εύκρατων νερών κυριαρχείται από ψυχρότροφα ή ψυχρόφιλα αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια που ανήκουν κυρίως στα γένη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Shewanella* και *Flavobacterium*. Επίσης υπάρχουν είδη της οικογένειας Vibrionaceae (*Vibrio* spp. και *Photobacterium* spp.) καθώς και κάποια θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* και οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactic acid bacteria*). Τα τελευταία είναι σπάνια μέλη της κυρίαρχης χλωρίδας, αλλά είναι παρόντα σε επίπεδα  $10-10^3$  cfu/gr.

Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας αυτής όμως, αλλάζει δραματικά κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Έτσι, κατά την αερόβια συντήρηση υπό ψύξη, επικρατούν σχεδόν αποκλειστικά τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas* spp. και *Shewanella putrefaciens*. Αυτό ισχύει για όλα τα ψάρια και οστρακοειδή των εύκρατων, υποτροπικών και τροπικών νερών. Η *S. putrefaciens* μαζί με κάποια είδη του γένους *Vibrio* παράγουν υδρόθειο από το θειώδες αμινοξύ L-κυστεΐνη, γι' αυτό και λέγονται θειοαναγωγικά. Η *S. putrefaciens* είναι ένα από τα σπουδαιότερα βακτήρια που αποτελεί ειδικό μικροοργανισμό αλλοίωσης των αλιευμάτων (SSO), το οποίο αποτελεί λιγότερο από το 1% της μικροχλωρίδας των φρέσκων αλιευμάτων, ενώ αυξάνεται δραματικά κατά τη στιγμή της αλλοίωσης καταλαμβάνοντας το 30-90% της μικροχλωρίδας. Παράλληλα τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. αποτελούν ειδικούς μικροοργανισμούς που προκαλούν σε μεγάλο βαθμό αλλοίωση των αλιευμάτων.

Κατά την αλλοίωση των οστρακοειδών (Roberts et al, 1998) είναι ενεργά και πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια (σακχαρολυτικά), τα οποία προκαλούν ζύμωση του γλυκογόνου στους ιστούς μετατρέποντάς το σε διάφορα οργανικά οξέα, κυρίως γαλακτικό οξύ. Τα βακτήρια αυτά κυριαρχούνται από είδη του γένους *Lactobacillus* spp., τα οποία προκαλούν επίσης ειδικούς μικροοργανισμούς αλλοίωσης των αλιευμάτων και ταυτοποιήθηκαν ως οργανισμοί ζύμωσης (Shiflett et al, 1996). Όμως οι λακτοβάκιλλοι δεν υπάρχουν πάντα στα θαλάσσια προϊόντα και όταν προστέθηκαν σε συσκευασία κενού σε πίνες δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Vibrio* spp. (Bremner et al, 1983). Παρόλα αυτά, το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται πειραματικά για να καθυστερήσει την εγκατάσταση της αλλοίωσης στα αλιεύματα (Kator et al, 1995). Βιοχημικά η αλλοίωση περιλαμβάνει πρωτεολυτική (*Pseudomonas* και *Vibrio*) και σακχαρολυτική δραστηριότητα (*Lactobacillus* spp.).

Στην παρούσα μελέτη οι μικροβιακές μεταβολές στην ομάδα μάρτυρα μυδιών *Mytilus galloprovincialis* που εξετάστηκαν στο Α.Π.Θ, απέδειξαν πως όσον αφορά τον πληθυσμό των ψυχρότροφων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στο PCA άγαρ, ο οποίος είναι παρόμοιος με τον πληθυσμό της OMX των αερόβιων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στο IRON άγαρ στους 25 °C, τα εξεταζόμενα μύδια ήταν καλής ποιότητας και ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση μέχρι και την τρίτη δειγματοληψία (τέταρτη ημέρα-96h), διότι οι ποσότητες των βακτηρίων ήταν της λογαριθμικής τάξης  $10^4$  (αποδεκτά), ενώ στην τελευταία δειγματοληψία (144h) οι μετρήσεις της OMX έφτασαν τα λογαριθμικά επίπεδα  $10^5$  και θεωρήθηκαν απορριπτέα, διότι το ανώτερο επιτρεπτό όριο της OMX στα μύδια είναι το  $1,0 \times 10^5$  cfu/gr (ICMSF, 1992).

Σε σχέση με τις επιμέρους μικροβιακές παραμέτρους των ψευδομονάδων, των θειοαναγωγικών και οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και των εντεροβακτηριοειδών παρατηρήθηκαν τα εξής: τα εξεταζόμενα μύδια ήταν καλής ποιότητας

(συγκεντρώσεις βακτηρίων  $\leq 10^4$ ) έως και την 6<sup>η</sup> ημέρα όσον αφορά τα εντεροβακτηριοειδή, τα οξυγαλακτικά και τα θειοαναγωγικά, ενώ τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ψευδομονάδων συμφωνούν με εκείνα των OMX και απορρίπτουν το εξεταζόμενο δείγμα μυδιών μετά την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στην ψύξη.

Ακριβώς επειδή όμως τα μύδια επιβάλλεται να θεωρούνται ασφαλή σύμφωνα με όλες τις μικροβιακές παραμέτρους τους και κυρίως με την OMX, που είναι διεθνώς καθιερωμένος δείκτης νοπότητας για τα αλιεύματα, ευλόγως εξάγεται το συμπέρασμα πως το εν λόγω πείραμα επιβεβαίωσε το shelf-life των 4 ημερών που έχει επιτευχθεί και σε μελέτες του παρελθόντος (Kastanidou-Monousou et al, 1982, Gokoglou, 2002, Pastoriza et al, 2004, Erkan et al, 2005)

Οι ομάδες των μυδιών όμως που εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη και οξικό οξύ παρουσίασαν στατιστικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τις ομάδες μάρτυρα, αλλά όχι μεταξύ τους. Συγκεκριμένα τα μύδια που εμβαπτίστηκαν στη χιτοζάνη και το οξικό οξύ για 30 λεπτά εμφάνισαν αποτελέσματα μετρήσεων των αποικιών σε όλα τα καλλιεργητικά υλικά της τάξης των  $10^1 - 10^2$  cfu/ml , γεγονός που επιτρέπει το χαρακτηρισμό των εξεταζόμενων μυδιών ως καλής ποιότητας (κατάλληλα προς βρώση) μέχρι και το τέλος του πειράματος (πετυχαίνοντας shelf-life που ξεπερνά την 6<sup>η</sup> ημέρα).

Με άλλα λόγια, ο στόχος επιμήκυνσης του χρόνου συντήρησης των μυδιών με τη χρησιμοποίηση της χιτοζάνης και του οξικού οξέος, πάντα σε σχέση με τα μικροβιολογικά κριτήρια, επιτεύχθηκε. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι δεν εξετάστηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εν λόγω μυδιών, γεγονός που θα πρέπει οπωσδήποτε να προηγηθεί πριν τη χρησιμοποίηση των αντιβακτηριακών αυτών ουσιών για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των μυδιών.

Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει στο παρελθόν (Chung et al, 2004 ) με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης της χιτοζάνης σε μία σειρά βακτηρίων (*Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*) και αποδείχθηκε πως η χιτοζάνη είχε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση κατά των τριών πρώτων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε σχέση με τα ακόλουθα δύο θετικά κατά Gram βακτήρια.

Έχει αναφερθεί επίσης αξιοσημείωτη επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης σε διάφορα είδη τροφίμων μετά την προσθήκη οργανικών οξέων (Kim et al, 1995).

Για παράδειγμα, ο ψεκάσμος φιλέτων γατόψαρου με οξικό, γαλακτικό και προπιονικά οξέα παρεμπόδισε την ανάπτυξη μικροβίων σε αυτά (Fernandes et al, 1998), ενώ το γαλακτικό νάτριο 1,8-4,8% καθυστέρησε την τοξινογένεση από το *Clostridium botulinum* σε σολομό (Meng et al, 1994).

Όσον αφορά τα οστρακοειδή, σε πείραμα των (Masniyom et al, 2007) στο πράσινο μύδι *Perna viridis*, παρατηρήθηκε χαρακτηριστική μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά τη συντήρηση στην ψύξη μετά τη χρησιμοποίηση γαλακτικού, οξικού και κιτρικού οξέος. Συγκεκριμένα, τα δείγματα των μυδιών που εμβαπτίστηκαν σε γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 0,2M, συντηρήθηκαν καλύτερα από ότι με τα άλλα οξέα σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης των 27 ημερών, ενώ το δείγμα μάρτυρα (στο οποίο δεν έγινε εφαρμογή των οργανικών οξέων) συντηρήθηκε μόνο για 6 ημέρες. Και πάλι τα δείγματα των μυδιών που εμποτίστηκαν με γαλακτικό οξύ 0,2M είχαν χαμηλότερα ποσά ψυχρόφιλης χλωρίδας από εκείνα των άλλων οξέων.

Τα οργανικά οξέα λοιπόν σύμφωνα με πειραματισμούς του παρελθόντος αποδείχθηκε πως έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση κατά τη συντήρηση των οστράκων στην ψύξη των 4 °C, όπως και επίσης η χιτοζάνη μόνη της ή σε συνδυασμό με όζον ή διάφορα οργανικά οξέα.

Στην παρούσα εργασία, η παρατηρούμενη μειωμένη μικροβιακή ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στην ομάδα της χιτοζάνης φαίνεται όμως ότι οφείλεται στο διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,5% που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυσή της



(σύμφωνα με τους Fan et al, 2009) και όχι στη δράση της χιτοζάνης, μιας και δεν παρατηρήθηκε συνεργατική δράση, σε σχέση με τα αποτελέσματα της ομάδας acetic. Η χρήση υδατοδιαλυτής χιτοζάνης, ή η χρήση ακόμη υψηλότερων συγκεντρώσεων ή χρόνου εμφάνισης θα μπορεί ενδεχομένως να δώσει καλύτερη εικόνα της επίδρασης αυτής στο χρόνο συντήρησης της σάρκας των μυδιών.

Λόγω του οξικού οξέος, το pH των ομάδων μυδιών της χιτοζάνης και του οξικού οξέος που εξετάστηκαν στο εν λόγω πείραμα ξεκίνησε από την αρχή από τιμές χαμηλότερες εκείνων των ομάδων νερού-μάρτυρα, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να αξιολογηθούν από αυτές τις χαμηλές τιμές οι ανάλογες εξεταζόμενες ομάδες μυδιών ως αποδεκτής ποιότητας ή απορριπτέας.

Όσον αφορά λοιπόν το pH, που αποτελεί έναν από τους βιοχημικούς δείκτες νωπότητας των αλιευμάτων παγκοσμίως, επισημαίνεται ότι αυτό ακολουθεί πτωτική πορεία κατά τη συντήρηση των οστρακοειδών, ενώ αντίθετα στα ψάρια και τα καρκινοειδή το pH αυξάνεται κατά τη διαδικασία της αλλοίωσής τους. (Roberts et al, 1998).

Η πτωτική πορεία του pH των μυδιών κατά τη συντήρηση αποδείχθηκε και στο πείραμα της παρούσας εργασίας και μάλιστα και στους τρεις εξεταζόμενους πληθυσμούς αυτών (χιτοζάνης pH=5.75-5.38, οξικού οξέος pH=5.10-4.90, νερού-μάρτυρα pH=6.50-6.30).

Πτώση του pH έχει παρατηρηθεί επίσης κατά την εκπόνηση αρκετών επιστημονικών εργασιών στο παρελθόν που αξίζει να αναφερθούν.

Σε πειραματισμό των Erkan et al, (2005) έχει βρεθεί πως κατά τη συντήρηση των μυδιών *M. galloprovincialis* στην ψύξη το pH ήταν αρχικά 5,96 και μειώθηκε στο 5,89 την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης. Αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P > 0.05$ ). Ο Pottinger το 1948 πρότεινε μία κλίμακα του pH σαν βάση για τον καθορισμό της νωπότητας των οστρακοειδών, η οποία ισχύει μέχρι σήμερα.

Σύμφωνα με αυτήν  $pH\ 6.2-5.9 =$  καλής ποιότητας,  $pH\ 5.8 =$  υποδεέστερης ποιότητας,  $pH\ 5.7-5.5 =$  μουχλιασμένο ή μαγαιάτικο προϊόν,  $pH \leq 5.2 =$  ξινισμένο ή σαπισμένο προϊόν .

Το  $pH$  των τελικών ζωντανών μυδιών ανέβηκε από το 5,6 στο 6,3. Τα νεκρά μύδια κατά το τέλος του πειράματος είχαν  $pH\ 5,2-5,4$ .

Συνοψίζοντας τονίζεται πως κρίνοντας την τιμή του  $pH$  των διατηρημένων υπό ψύξη μυδιών, φρέσκα και καλής ποιότητας θεωρούνται εκείνα με  $pH\ 6-7$ , δηλαδή εκείνα της ημέρας 0 από τη συλλογή τους. Από την επόμενη ημέρα, οι βακτηριακές ζυμώσεις των υδατανθράκων οδηγούν στην παραγωγή οργανικών οξέων, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν μείωση του  $pH$  και κατά συνέπεια πτώση της ποιότητας του προϊόντος (Colby et al, 1995). Ενδεχόμενη πρόσκαιρη αύξηση του  $pH$  μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή αλκαλικών προϊόντων λόγω πρωτεολυτικής δραστηριότητας ή στους βακτηριακούς αλκαλικούς μεταβολίτες που παράγονται από το μεταβολισμό των ψυχρότροφων βακτηρίων που αναπτύσσονται στην ψύξη (Kyra et al, 1997).

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων σε μύδια προερχόμενα από μυδοκαλλιέργεια της περιοχής του Μακρυγάλου Πιερίας (Manousaridis et al, 2004), οι τιμές του  $pH$  της σάρκας των μυδιών που καταγράφηκαν ξεκινούσαν από  $pH\ 6.3$  και κατέληγαν στο  $pH\ 6.0$ , οι οποίες τιμές σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης κατά Pottinger (1948) που ισχύει μέχρι σήμερα για την αξιολόγηση των αλιευμάτων κατά την συντήρησή τους στην ψύξη, χαρακτήρισαν τα εξεταζόμενα δείγματα των μυδιών(τα οποία βρισκόνταν σε συσκευασία κενού) ως καλής ποιότητας σε όλη τη διάρκεια της περιόδου συντήρησης (8-9 ημέρες), επιτεύχθηκε δηλαδή shelf-life 8-9 ημερών.

Ανάλογα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και στο πείραμα που διεξήχθη στο Α.Π.Θ και παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία. Οι τιμές του  $pH$  της ομάδας μυδιών

μάρτυρα ξεκίνησαν από 6,49 και έφτασαν στο 6,30 κατά μέσο όρο, εξασφαλίζοντας χρόνο συντήρησης της σάρκας των μυδιών 6 ημερών και άνω.

Το pH όμως των ομάδων μυδιών που εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη και οξικό οξύ ήταν από τις αρχικές ώρες διεξαγωγής του πειράματος πιο χαμηλές από το μάρτυρα, ξεκινούσαν από 5,75 κατά μέσο όρο στην ομάδα της χιτοζάνης και 5,10 αντίστοιχα στην ομάδα του οξικού οξέος. Οι χαμηλές τιμές pH στην ομάδα της χιτοζάνης οφείλονται στη διάλυση της χιτοζάνης σε οξικό οξύ στην αρχή του πειράματος, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ως τώρα σε προηγούμενες μελέτες δεν έχει γίνει εφικτή η συσχέτιση της μεταβολής του pH με τη μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Για το λόγο αυτό, αλλά επίσης επειδή δεν διεξήχθη οργανοληπτικός έλεγχος στα εξεταζόμενα μύδια δεν μπορεί να προταθεί η μέθοδος ως εφαρμόσιμη για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των μυδιών, αν πρώτα δεν εξεταστούν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μυδιών που εμβαπτίζονται σε διαλύματα οξέων.

Σύμφωνα με όλες τις μέχρι σήμερα υπάρχουσες μελέτες, τιμές  $OMX > 10^5$  cfu  $gr^{-1}$  θεωρούνται ότι αντιπροσωπεύουν δείγματα ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση. Έχει βρεθεί ότι μύδια *Mytilus galloprovincialis* μπορούν να συντηρηθούν υπό ψύξη (4 °C) μέχρι συνήθως την 4<sup>η</sup> ημέρα από την αλίευσή τους (χρόνος συντήρησης 4 ημερών), διότι μέχρι τότε η OMX δεν ξεπερνά την τιμή  $10^4$  cfu  $gr^{-1}$  (Erkan et al, 2005).

Στο πείραμα του Α.Π.Θ βρέθηκαν τιμές OMX κατά μέσο όρο που ξεκινούσαν από  $2,1 \times 10^3$  cfu  $gr^{-1}$  έως  $5,2 \times 10^5$  cfu  $gr^{-1}$ , με αποτέλεσμα τα δείγματα μυδιών που εξετάστηκαν να θεωρούνται αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση μέχρι και την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στο ψυγείο, διότι από την 5<sup>η</sup> ημέρα και μετά οι τιμές της OMX έφταναν σε επίπεδα απαγορευτικά ( $10^5$ ) για τον καταναλωτή.

Αντίθετα τα δείγματα που εμβαιπίστηκαν σε χιτοζάνη και οξικό οξύ είχαν τέτοιο πληθυσμό αποικιών( της τάξης  $10^1-10^2$ ) που τους επέτρεπε να χαρακτηριστούν ως καλής ποιότητας μέχρι ακόμα και την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης.

Σύμφωνα με τους πληθυσμούς των ψυχρότροφων βακτηρίων, της OMX των αερόβιων βακτηρίων καθώς και των ψευδομονάδων, τα δείγματα μάρτυρα αποδείχθηκαν καλά μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης, ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα ήταν απορριπτέα. Και εδώ τα δείγματα της χιτοζάνης και του οξικού οξέος ήταν καλά μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν ιδιαίτερα σε κανένα μέσο (νερό, χιτοζάνη, οξικό οξύ), οπότε δεν θεωρούνται αξιόπιστο κριτήριο.

Τέλος τα εντεροβακτηριοειδή αναπτύχθηκαν πολύ καλά σε όλα τα μέσα, αλλά μέχρι πληθυσμό της τάξης των  $10^4$  cfu/ml , οπότε τα εξεταζόμενα μύδια σύμφωνα με αυτή τη μικροβιακή παράμετρο ήταν καλής ποιότητας μέχρι και την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης.

Πιθανότατα τα εντεροβακτηριοειδή είναι πιο ανθεκτικά στο όξινο pH(επειδή το περιβάλλον του εντέρου στο οποίο επιβιώνουν είναι αρκετά όξινο) σε σχέση με τα οξυγαλακτικά, τα οποία είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το βέλτιστο pH για την ανάπτυξή τους είναι το 6.5-7.

Τα αποτελέσματα του πειράματος κατέληξαν στα συμπεράσματα που παρατίθενται στη συνέχεια και που αποτελούν την ουσία της όλης προσπάθειας να επιμηκυνθεί ο χρόνος συντήρησης των μυδιών *Mytilus galloprovincialis* που είναι τόσο σημαντικό μέρος της αλιείας της χώρας μας με σαφές οικονομικό ενδιαφέρον για τον Έλληνα παραγωγό και καταναλωτή.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά από προσεχτική μελέτη των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου πειράματος εξάγονται τα εξής συμπεράσματα :

- Στατιστικές διαφορές παρουσιάστηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων μυδιών *Mytilus galloprovincialis* που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 5% και οξικού οξέος 0,5% και των ομάδων νερού-μάρτυρα.
- Αντίθετα δεν υπήρξε στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων χιτοζάνης και οξικού οξέος (και στις δύο έδρασε το οξικό οξύ).
- Οι χρόνοι συντήρησης των μυδιών στην ψύξη στις ομάδες μάρτυρα έφτασαν τις 4 ημέρες σύμφωνα με το pH και τις μικροβιολογικές τους παραμέτρους, ενώ στις ομάδες χιτοζάνης και οξικού οξέος σύμφωνα με τους πληθυσμούς των SSOs τους, έφτασαν και στην 6<sup>η</sup> ημέρα, διότι το pH σ' αυτές ξεκίνησε από χαμηλότερες τιμές.
- Το γεγονός ότι δεν συμπεριλήφθηκε στο πείραμα η εξέταση και η μέτρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μυδιών δεν μας επιτρέπει να θεωρήσουμε τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των ομάδων χιτοζάνης και οξικού οξέος ως οριστικά και εφαρμόσιμα στην καθημερινή επεξεργασία και διακίνηση των μυδιών.
- Εκτός από την εξέταση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μυδιών, θα πρέπει επίσης να επιχειρηθεί η χρησιμοποίηση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων χιτοζάνης, ίσως υδατοδιαλυτής, για να αποδειχθεί καλύτερα η αντιβακτηριακή δράση της χωρίς τη συμμετοχή οξέος.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΕΝΗ

- Anang D.M., Rusul G., Bakar J., Ling F.H. (2007). Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* 0157: H7 in chicken breast stored at 4<sup>0</sup> C, Food Control (18) p: 961-969.
- Arial O. (1997). Growth of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamark,1819) on Ropers in the Black Sea, Veterinary and Animal Sciences(ed) 23 p:183-189.
- Bassi R, Prasher SO, Simpson BK (1999). Effects of organic acids on the absorption on heavy metal ions by chitosan flakes. Journal Environment Science Health A (34) p: 289-294.
- Bremner H.A, Statham J.A (1983). Spoilage of vacuum packed chill-stored scallops with added lactobaccili, Food Technology, Australia (35) p: 284-287.
- Brody A.L (1989). Modified atmosphere packaging of sea foods, Food and Nutrition Press Inc, Connecticut USA, Brody (ed) p: 59-65
- CDC (1998). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters, Pacific Northwest (1997), MMWR Morbidity Mortality Weekly Report. (47) p: 457-462.
- Ceccherelli V.U, Rossi R. (1984). Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Marine Ecology Progress Series. Published February 29, 1984 vol.16 p: 173-184.

- Chen C, Lian W, Isai G (1998). Antimicrobial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzyl chitosan and application to oyster preservation, *Journal of Food Protection* (61) p: 1124-1128.
- Chen YM, Chung YC, Wang LW, Chen KT, Li SY (2002). Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen, *Journal Environment Science Health A* (37) p: 1379-1390.
- Cheong L, Lee H.B (1984).Mussel farming. *Statis Extension Manual Series No.5 Southern Asian Fisheries Development Centre, Bangkok.*
- Cherrington C, Hinton M, Mead G.C, Chopra I (1991). *Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications.* Cited by Canibe M.
- Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria, *International Journal of Food Microbiology* (75) p: 235-244.
- Choo S.E, Ng C.S (1990). Enzymic hydrolysis of greek mussel (*Perna viridis*) to produce an enhanced taste extract. *Singapore J. Primary Indication* (18) p: 48-53.
- Chung Y, Su Y, Chen C, Jia G, Wang H, Wu JCG, Lin J (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica* (7) p: 932-936.
- Chythanya R., Karunasagar I, (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain , *Aquaculture* (208) p: 1-10.
- Erkan N (2005). Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis* ) and selected chemical decomposition indicators, *Science Food Agriculture* (85) p:2625-2630.
- Eurostat (2006). *Statistics in focus, Agriculture and Fisheries, European Community,* FAO (2000-2006), *Fishery Statistics, FIGIS* , pp.7.

- Fan W, Sun J, Chen Y, Qiu J, Zhang Y, Chi Y (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage, *Food Chemistry* (115) p: 66-70.
- Farid M, Bal. A.A, Marshall D.L (1998). Organic acid dipping of catfish fillets: effect on color, microbial load and *Listeria monocytogenes* , *Journal Food Protection* (61) p: 1470-1474.
- Fernandes C.F, Flick G.J, Cohen J, Thomas T.B (1998). Role of organic acids during processing to improve quality of channel catfish fillets, *Journal Food Protection* (61) p: 495-498.
- Freese E, Sheu C.W, Galliers E (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives, *Nature* (241) p: 321-325.
- Gaglak E (2007). Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis* )stored under modified atmosphere packaging, *European Food Research and Technology* (226) p:1293-1299.
- Gokoglou N.A. (2002). Descriptive method for sensory evaluation of mussels. *Lebensm Wiss Technology* (35) p: 563-567.
- Gosling E (1992). Genetics Of *Mytilus* 'The mussel : ecology, physiology, genetics and culture ' E.Gosling (ed) Elsevier Amsterdam p: 309-382.
- Gosling E.M (2003). Fisheries and Management of Natural Populations, *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture – Blackwell Oxford*, 6, 439pp.
- Goulas A.E, Chouliara I, Nessi E, Kontominas M.G, Savvaidis I.N (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere, *Journal of Applied Microbiology* (98) p: 752-760



- Guzel-Seydim Z, Bever P.I, Jr, Grene A.K (2004). Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components, *Food Microbiology* (21) p: 475-479.
- Helander I.M, Nurmiäho-Lassila E.L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S (2001).
- Hobbs G (1991). Fish: microbiological spoilage and safety, *Food Science Technology Today* (5) p: 166-173.
- ICMSF (1992). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications* (editions), University of Toronto Press, Toronto.
- Inglis G.J, Hayden B.J, Ross A.H (2000). An overview of factors affecting the carrying capacity of coastal embayments for mussel culture. Client Report: CHCOO/69 Project No.MFE00505, Ministry for Environment, 31pp.
- Janda J.M, Powers C, Bryant R.G, Abbott S.L (1998). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio sp.* *Clinical Microbiology Review* (1) p: 245-267.
- Jay J. (2005). *Modern Food Microbiology*, 4<sup>th</sup> edition, Chapman & Hill, New York.
- Jeon YJ. Park P.J., Kim S.K (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate Polymers* (44) p: 71-76.
- Kastanidou-Monousou C, Karaioanoglou P, Koidis (1982). Keeping quality of shucked mussels stored at refrigerating temperatures, *Hellenic Veterinary Medical Society* (25) 200.
- Kator H, Fisher R.A (1995). Bacterial spoilage of processed sea scallop ( *Placopecten magellanicus* ) meats, *Journal of Food Protection* (58) p: 1351-1356.

- Khan A.M, Parrish C.C, Shahidi F (2005). Quality Indicators of Cultured Newfoundland Blue Mussels(*Mytilus edulis*) during Storage on Ice: Microbial Growth, pH, Lipid Oxidation, Chemical Composition Characteristics and Microbial Fatty Acid Contents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(53) p: 7067-7073.
- Kim C.R.H, Hearnberger J.O, Vichery A.R, White C.H, Marshall D.L (1995). Extending shelf-life of refrigerated catfish fillets using sodium acetate and monopotassium phosphate, *Journal Food Protection* (58) p: 644-647.
- King I, Childs M.T, Dorsett C, Ostrander J.G, Monsen E.R (1990). Shellfish. Proximate composition, minerals, fatty acid and sterols, *Journal American Diet Association* 90:677.
- Koehn R.K (1991). The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture* (94) p: 125-140.
- Kromhout D, Bosschieter E.B, Lesenne CC (1985). The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New England Journal of Medicine* (312) p:1205-1209.
- Kurita K (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan, *Polymer Degradation and Stability* (59) p: 117-120.
- Lakshmanan R, Shakila R.J, Jeyasekaran G (2002). Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp, *Food Microbiology* (19) p: 617-625.
- Liu N, Chen X.G, Park H.J, Liu C.G, Liu C.S, Meng X.H, Yu L.J (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*, *Carbohydrate Polymers* (64) p: 60-65.
- Lund B.M, Baird-Parker T.C, Gould G.W (2000). The microbiological safety and quality of food, Vol.1, Aspen Publishers Inc., U.S.A, pp.972.

- Manousaridis G, Nerantzaki A, Paleologos E.K, Tsiotsias A, Savvaidis I.N, Kontominas M.G (2004). Effect of ozon on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels, *Food Microbiology* (22) p:1-9.
- Masniyom P, Benjama O (2007). Effect of lactic, acetic and citric acids on quality changes of refrigerated green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758), Songklanakarin, *Journal Science Technology* 29(4) p: 1123-1134.
- Meng J, Genigeorgis C.A (1994). Delaying toxinogenesis of *Clostridium botulinum* by sodium lactate in “sous vide” products, *Letters in Applied Microbiology* (19) p: 20-23.
- Metaxatou A. (1998). The mussels, ‘Proceedings of 1st Balkan Congress on Aquacultures’ Thessaloniki, Greece 12-15 September , 87p
- Nam KS (2001). Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide, Rec Ames and Umu tests, *Biotechnology Letters* (23) p: 971-975.
- Orban E, Di Lena G, Navigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry* 77(1) p: 57-65.
- Ortigosa M, Garay E, Pujalte M.J (1994). Numerical taxonomy of aerobic Gram- negative bacteria associated with oysters and surrounding seawater of the Mediterranean coast, *Systematic & Applied Microbiology* 17(4) p: 589-600.
- Ouattara B, Simard R.E, Holley R.A, Piette G.J.P, Begin A (1997). Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria, *Journal Food Protection* (60) p: 246-253.

- Pastoriza L, Bernandez M, Sampedro G, Gabo M.L, Herrera J.J.R (2004). Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussels stored refrigerated, *European Food Research and Technology* (218) p: 415-419.
- Pastoriza L, Sampedro G, Herrera J.J, Cabo M.L (1996). Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life of iced fresh hake slices, *Journal Science Food Agriculture* (71) p: 541-547.
- Peter MG (1997). Introductory Remarks. *Carbohydrate Europe* (19), p : 9-15.
- Puchenkova S.G (1991). Sanitary-microbiological Investigation of oysters and water from the North Caucasus region of the Black Sea, *Gigiena i Sanitariia* (3) p: 22-24.
- Ramirez A.J, Acuff G.R, Lucia L.M, Savell J.W (2001). Lactic acid and trisodium phosphate treatment of lamp breast to reduce bacterial contamination, *Journal Food Protection* (64) p: 1439-1441.
- Ransom J.R, Belk K.E, Sofos J.N, Stopforth J.D, Scanga J.A, Smith G.C (2003). Comparison of intervention technologies for reducing *Escherichia coli* 0157:H7 on beef cuts and trimmings, *Food Protection Trends* (23) p: 24-34.
- Roberts T.A, Pitt J.I, Farkas J, Grau F.H (1998). *Microorganisms in Foods 6, Microbial Ecology of Food Commodities*, Blackie Academic & Professional, U.K, pp.615.
- Rollex Australasia Ltd (1999). Leaflet on ozon P.O Box 13655, Johnsonville, Nigaurangua, Wellington, New Zealand.
- Rong C, Qi L, Bang-zhong Y, Lan-lan Z (2010). Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (11) p: 108-112.
- Samelis J, Sofos J.N, Kendall P.A, Smith G (2002). Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in meat decontamination washing fluids and

- potential effects of organic acid interventions on the microbial ecology of the meat plant environment, *Journal Food Protection* (65) p: 33-40.
- Schulz PC, Rodriguez MS, Del Blanco LF, Pistonesi M, Agullo E (1998). Emulsification properties of chitosan, *Colloid Polymer Science* (276) p: 1159-1165.
- Seed R., Suchanek T.H (1992). Population and community ecology of *Mytilus edulis*
- Shahidi FJ, Arachchi KV, Jeon YJ (1999). Food applications of chitin and chitosans, *Trends Food Science Technology* (10) p: 37-51.
- Shiflett M.A, Lee J.S, Sinnhuber R.O. (1996). Microbial flora of irradiated Dungeness crabmeat and Pacific oysters, *Applied Microbiology* (14) p: 411-415.
- Somashekar D, Joseph R (1996). Chitosanases properties and application: a review. *Bioresource technology* (55) p: 35-45.
- Spencer B.E (2002). Criteria for selecting a site for bivalve cultivation. *Molluscan shellfish farming* p: 226-244.
- Terzi G, Gucukoglou A (2010). Effects of Lactic acid and Chitosan on the Survival of *V.parahaemolyticus* in Mussel Samples, *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (6) p: 990-994.
- The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture, E.M Gosling (ed) Elsevier, Amsterdam, 87-169pp.
- Vareltzis K (1996). Mussels as Food, *Fishing News* (11) p:38-47.
- Vasakou A, Vareltzis K, Bloukas J.G (2003). Effect of sodium lactate and potassium sorbate on quality characteristics and shelf-life of Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* meat during chilled storage in pouches with water, *Italian Journal Food Science* (15), p: 359-360.

- Venugopal V, Alur M.P, Lewis N.F (1983). Extracellular protease from *Pseudomonas marinoglutinosa*: some properties and its action on fish actomyosin, *Journal Food Science* (48) p: 671-675.
- Walters T.H (2008). *Mytilus edulis* Common mussel, Marine life Information Network, Biology and Sensitivity Key Information Sub Programme (on line).
- Xiong H, Yanbin L, Slavik M.F, Walker J.T (1998). Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached *Salmonella*, *Journal Food Protection* (61) p: 272-275.
- Young K.M, Foegding P.M (1993). Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH, *Journal Applied Microbiology* (75) p: 515-520.
- Zheng L.Y, Zhu J.F (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers* (54) p: 527-530.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Αθανασούλη Α. (2009). Η παραγωγή του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στην Ελλάδα και η αξιοποίησή του, Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης-Ν.Μουδανιά, Πτυχιακή εργασία (73 σελίδες).
- Αντωνιάδου Χ. (2003). Δομή των συννευρέσεων του σκληρού υποστρώματος της κατώτερης υποπαραλιακής ζώνης στο Β.Αιγαίο. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ – 274 σελίδες.
- Γαληνού-Μητσούδη Σ. (1999). Οι μυδοκαλλιέργειες του νομού Θεσσαλονίκης- Πρακτικά ημερίδας, Χαλάστρα 19 Ιουνίου 1999, Κέντρο Πληροφόρησης Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα-Γαλλικού και Αλυκής Κίτρους, 18-31 σελίδες.
- Γαληνού-Μητσούδη Σ. (2002). Σημειώσεις Αλιείας και Διαχείρισης Οστράκων, Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης-Ν.Μουδανιά, 103 σελίδες.
- Γαληνού-Μητσούδη Σ. (2003). Σημειώσεις Εκτροφής Οστράκων, Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης –Ν.Μουδανιά, 110 σελίδες.
- Μπόκος Π. (2008). Έρευνα για την οξεοδεσμευτική ικανότητα σιτηρεσίων χοίρων χοιροτροφικών μονάδων της βορείου Ελλάδος και εργοστασίων ζωοτροφών. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονική Σχολή Α.Π.Θ – 48 σελίδες.

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ

http1: [www.dfompo.gc.ca/aquaculture/multimedia/fig9.jpg](http://www.dfompo.gc.ca/aquaculture/multimedia/fig9.jpg)-προσπελάστηκε 05-10-11

http2: [www.fao.org/fishery\\_species/3529/en](http://www.fao.org/fishery_species/3529/en)-προσπελάστηκε 14-10-11

http3: [www.ciencia15.blogalia.com/historias/4734](http://www.ciencia15.blogalia.com/historias/4734)-προσπελάστηκε 03-11-11

http4: [www.terresdeau.gr](http://www.terresdeau.gr) – προσπελάστηκε 01-11-11

http5: [www.nzfsa.govt.nz](http://www.nzfsa.govt.nz)- προσπελάστηκε 20-10-11

http6: [www.seafood.ucdavis.edu/.../qualitysafety.doc](http://www.seafood.ucdavis.edu/.../qualitysafety.doc)-προσπελάστηκε 10-11-11

http7: [www.en.wikipedia.org/wiki/file](http://www.en.wikipedia.org/wiki/file) - προσπελάστηκε 10-11-11

http8: [www.foodsafety.hubpages.com](http://www.foodsafety.hubpages.com) – προσπελάστηκε 20-12-11

http9: [www.marronebioinnovations.com](http://www.marronebioinnovations.com)- προσπελάστηκε 28-12-11