

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΔΕ**

**«Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού σε αλιεύματα με
αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης»**



ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Ι.Σ. Μποζιάρης, Αν. Καθηγητής Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2016

[1]



Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

*Η επιστήμη και η τέχνη ανήκουν σε όλο τον κόσμο, και
μπροστά τους εξαφανίζονται όλα τα σύνορα.*

«Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού σε αλιεύματα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης»

«Determination of fisheries microbiota with polymerase reaction chain method»

Δημήτριος Α. Αναγνωστόπουλος (2016), Μεταπτυχιακή Διπλωματική

Διερεύνηση μικροβιακού πληθυσμού σε αλιεύματα με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων : 10

Συνολικός αριθμός σελίδων της διατριβής : 80

Αριθμός Πινάκων : 6

Αριθμός Σχημάτων : 7

Αριθμός Εικόνων : 16

Αριθμός Βιβλιογραφικών Αναφορών : 80

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.

- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος (Ph.D.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

- 3) **Μαδέσης Παναγιώτης (Δρ.)**, Ερευνητής Γ' Βαθμίδας, Εφαρμογές της σύγχρονης γενετικής, γονιδιωματικής, πρωτεομικής και μεταβολικής τεχνολογίας στην παραγωγή και τον έλεγχο τροφίμων, προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και οργανισμών και την μοριακή διαγνωστική, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB), Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α.), *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής και μακροχρόνιας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, τον Δρ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του και τον Δρ. Παναγιώτη Μαδέση τόσο για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθώς και την φιλοξενία στο εργαστήριο του.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Φωτεινή Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύντροφό μου Μαρίνα Νεοφύτου, τόσο για την αμέριστη συμπαράστασή της, όσο και για την πολύτιμη βοήθειά της σε όλα τα στάδια της συγκεκριμένης έρευνας.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τη χρήση της Real Time PCR μπορεί να ενισχυθεί ώστε να ανιχνευθεί, και να ποσοτικοποιηθεί μια αλληλουχία-στόχος με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα σε σχέση με τη συμβατική PCR, ενώ ταυτόχρονα προσφέρεται η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της. Σκοπός της παρούσης διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού σάρκας ιχθύων με χρήση qPCR κατά την αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού πραγματοποιήθηκε αρχικά η δημιουργία πρότυπης καμπύλης μεταξύ των τιμών Ct που προκύπτουν από την qPCR με το επίπεδο πληθυσμού σε λογαρίθμους από καθαρές καλλιέργειες. Επίσης πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση των ιχθύων, προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφυλης Χλωρίδας των ιχθύων και των καθαρών καλλιεργειών χρησιμοποιώντας την μέθοδο των τρυβλίων και θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης, καθώς και απομόνωση DNA από τους ιχθύες και τις καθαρές καλλιέργειες και χρήση qPCR για προσδιορισμός των τιμών Ct.

Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ($R^2 = 0.917$), πράγμα το οποίο συνεπάγεται πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων Ct και πληθυσμού μικροοργανισμών σε logs. Η ποιοτική κατάσταση/στάδιο αλλοίωσης του κάθε ιχθύος (15 δείγματα από σύνολο 20) βάσει της εκτιμώμενης OMX (σύμφωνα με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης) προσδιορίστηκε επιτυχώς, με πολύ μικρές αποκλίσεις των εκτιμώμενων αποτελεσμάτων σε σχέση με τις πραγματικές τιμές (απόκλιση της τάξης <0.5-1,5 logs), ενώ ίδιος (π.χ. άριστο vs άριστο) ή παρόμοιος (π.χ. άριστο vs πολύ καλό) ήταν ο χαρακτηρισμός της οργανοληπτικής κατάστασης των ιχθύων (άριστο, πολύ καλό, μέτριο κτλ.) μεταξύ της πραγματικής και της εκτιμώμενης οργανοληπτικής

αξιολόγησης. Τα υπόλοιπα πέντε δείγματα (10,12, 16,17, 23), βάση της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης, έδωσαν εκτιμώμενα αποτελέσματα που απέκλιναν αρκετά από τις πραγματικές μετρήσεις (απόκλιση της τάξης $> 2,5 \log$ s). Αν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν να είναι πολύ ενθαρρυντικά, ωστόσο η μεγάλη απόκλιση που έδειξαν ορισμένα δείγματα δείχνει ότι οι τεχνικές δειγματοληψίας ιστού ή/και εξαγωγής DNA θα πρέπει να βελτιωθούν περαιτέρω έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η λήψη ποσότητας DNA που να αντικατοπτρίζει την πραγματική συγκέντρωση κυττάρων πράγμα που θα οδηγεί αναμбивσβήτητα με ακρίβεια στην εκτίμηση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού και κατ' επέκταση στην ορθή εκτίμηση της ποιότητας/σταδίου αλλοίωσης των ιχθύων. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου θα βοηθήσει τη βιομηχανία αλιευτικών προϊόντων/τροφίμων να διεξάγει τον προσδιορισμό της OMX σε 2-3 ώρες σε σχέση με τις 2-3 ημέρες που απαιτεί η κλασσική μικροβιολογία.με αποτέλεσμα τον γρήγορο προσδιορισμό της ποιοτικής κατάστασης-φρεσκότητας των αλιευμάτων.

Λέξεις κλειδιά: Real time PCR, ολικός μικροβιακός πληθυσμός, φρεσκότητα, τσιπούρα, λαβράκι

ABSTRACT

By using the Real Time PCR can be strengthened in order to detect and quantify a target sequence with greater speed and efficiency compared to conventional PCR, while providing the ability to monitor the progress of the reaction at any stage. The aim of this diploma thesis was the enumeration of bacterial populations of fish flesh using qPCR upon storage at low temperatures. To achieve this purpose, a standard curve was performed between Ct values obtained from the qPCR and the population levels in logarithms obtained from pure cultures. For this purpose, isolation of bacterial DNA from fish and pure cultures was performed, while using qPCR the Ct values were derived. Sensory evaluation of stored fish was also performed, in addition to the determination of TVC using the plate count method.

The creation of the standard calibration curve was successful ($R^2 = 0.917$), which implies a very good correlation between the two parameters Ct and bacteria population in logs. The qualitative condition / deterioration stage of each fish (15 samples out of 20) based on the estimated TVC (according to the equation of the standard curve) was determined successfully, with very slight variations of estimated results in relation to the actual values (gap of about $< 0.5-1.5$ logs), while itself (eg excellent vs excellent) or similar (eg excellent vs very good) was the characterization of the sensory state of fish (excellent, very good, moderate, etc.) between the actual and estimated sensory evaluation. The remaining five samples (10,12, 16,17, 23), based on the equation of the standard curve gave estimated results diverged considerably from the actual measurements (gap of about > 2.5 logs). Although the results of this study seem to be very promising, but the large gap that showed some samples shows that the tissue and / or extraction DNA sampling techniques should be further improved in order to guarantee that the amount of DNA reflects the actual cell concentration which would

accurately leads anamvisvitita to estimate the total microbial population and consequently a proper assessment of the quality / fish spoilage stage. The use of this method will help industry fishery product / food to carry out the determination of TVC in 2-3 hours compared to 2-3 days required by classical methods effect the rapid determination of the quality state of freshness.

Keywords: Real time PCR, total microbial population, freshness, sea bream, sea bass

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Υδατοκαλλιέργειες	14
1.2 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	15
1.3 Στοιχεία βιολογίας τσιπούρας και λαυρακιού	16
1.4 Διατροφική αξία ιχθύων	20
1.5 Τεχνολογία της PCR	26
1.6 Τεχνολογία της Real Time PCR	30
1.8 Ποσοτική PCR και οι διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται	33
1.8.1 SYBR Green I	34
1.9 Διαφορές μεταξύ PCR και Real Time PCR	35
1.10 ΣΚΟΠΟΣ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1 Προέλευση δειγμάτων και δειγματοληψίες	38
2.2 Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης	38
2.3 Συμβατική μέθοδος	39
2.3.1 Tryptone Soy Agar (TSA)	40
2.3.2 Iron Agar (IA)	40
2.3.3 Plate Count Agar (PCA)	41
2.3.4 Μικροβιολογική ανάλυση	42
2.4 Μέθοδος qPCR	43
2.4.1 Συλλογή βακτηρίων από σάρκα τσιπούρας	43
2.4.2 Συλλογή βακτηρίων από καθαρές καλλιέργειες	43
2.4.3 Απομόνωση DNA από σάρκα ιχθύων	45
2.4.4 Απομόνωση DNA από καθαρές καλλιέργειες	46
2.4.5 Μέτρηση των συγκεντρώσεων προϊόντων των απομονώσεων DNA με Nanodrop	46
2.4.6 Real time PCR απευθείας στα DNA για αξιολόγηση του βακτηριακού DNA	48
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
3.1 Οργανοληπτική ανάλυση	50
3.2 Μικροβιολογική ανάλυση	53
3.3 Μέτρηση DNA από σάρκα ιχθύων	54
3.4 Μέτρηση DNA από καθαρές καλλιέργειες	56
3.5 Αξιολόγηση του βακτηριακού DNA με Real time PCR	57

3.6 Δημιουργία καμπύλης αναφοράς (Standard curve)	60
3.7 Τιμές Ct vs logs από δείγματα ιχθύων	61
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατοκαλλιέργειες

Ο όρος υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, κατά την οποία διατηρείται ο έλεγχος ολόκληρου ή μέρους του κύκλου ζωής τους. Ο έλεγχος αυτός διακρίνει τις υδατοκαλλιέργειες από τις συμβατικές μεθόδους αλιείας, στις οποίες οι οργανισμοί συλλέγονται από φυσικά αποθέματα (Martin, 1990).

Σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνούς Οργάνισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιεργειών παρουσίασε σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, από λιγότερο από 10^6 tn το 1950 σε $59,4 \times 10^6$ tn το 2004, αύξηση που αντιστοιχεί σε US \$ $70,3 \times 10^9$. Οι σημαντικότερες αιτίες της εντυπωσιακής αυτής ανάπτυξης είναι οι εξής:

- Η διαφαινόμενη αδυναμία της φυτικής και ζωικής παραγωγής να καλύψουν τις ανάγκες σε τρόφιμα του παγκόσμιου πληθυσμού που αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς.
- Η βαθμιαία μείωση της προσφοράς αλιευμάτων που προέρχονται από τη συλλεκτική και ελεύθερη αλιεία των θαλασσών και των εσωτερικών νερών (λιμνών, ποταμών) λόγω υπεραλίευσης ή/και περιβαλλοντικής υποβάθμισης των βιοτόπων τους
- Η συνεχής αύξηση της ζήτησης σε αλιεύματα.

Το 69,6% ($41,3 \cdot 10^6$ tn) της παγκόσμιας παραγωγής ιχθύων πραγματοποιείται στην Κίνα και το 21,9% στην υπόλοιπη Ασία και την περιοχή του Ειρηνικού Ωκεανού. Το 2004 η δυτική Ευρώπη συνεισέφερε κατά 3,5% στην παγκόσμια παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών με $2,1 \cdot 10^6$ tn (US \$ $5,4 \cdot 10^9$) καθώς η κεντρική και ανατολική Ευρώπη παράγει το 0,4% της παγκόσμιας παραγωγής (250000 tn). Η

Λατινική Αμερική, η περιοχή της Καραϊβικής και της Νότιας Αμερικής και η Αφρική συνεισέφεραν κατά 2,3%, 1,3% και 1,1%, αντίστοιχα, το 2004 (FAO, 2007a, b).

1.2 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών στη χώρα μας παρουσιάζει ιδιαίτερη ανάπτυξη, με υψηλές παραγωγικές επιδόσεις. Η παραγωγή από υδατοκαλλιέργειες στα εσωτερικά νερά το έτος 2007 ανήλθε στους 113.188 τόνους (αύξηση 16,5% σε σχέση με το 2004), καλύπτοντας το 54,3% της συνολικής παραγωγής ιχθύων. Η Ελλάδα αποτελεί το μεγαλύτερο εξαγωγέα τσιπούρας και λαβρακίου σε παγκόσμιο επίπεδο, με το σύνολο των εξαγωγών της να σημειώνει την περίοδο 2006-2010 μέσο ετήσιο ρυθμό μεγέθυνσης 11%. Η Τουρκία με συνολικές εξαγωγές το 1/5 των ελληνικών, ακολουθεί στη δεύτερη θέση. Οι ελληνικές εξαγωγές κατευθύνονται στην πλειονότητά τους (46% περίπου) στην ιταλική αγορά. Οι επόμενες σε σημαντικότητα αγορές για τις ελληνικές εξαγωγές είναι η ισπανική και η γαλλική. Οι επιχειρήσεις του κλάδου απασχολούν περίπου 10.000 άτομα. Λόγω της εξωστρεφούς ανάπτυξης που χαρακτηρίζει τον κλάδο, η συνεισφορά της ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελληνική οικονομία είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η αξία των εξαγωγών αντιστοιχεί στο 23% της συνολικής αξίας εξαγωγών ειδών διατροφής, καθιστώντας τον κλάδο το 2ο μεγαλύτερο εξαγωγικό τομέα στα είδη διατροφής. Σε σύγκριση με το σύνολο της αξίας των ελληνικών εξαγωγών, οι ιχθυοκαλλιέργειες καταγράφουν αξιοσημείωτο μερίδιο της τάξης του 2,3%.

Το φυσικό περιβάλλον της χώρας, η ισχυρή παραγωγική βάση του κλάδου και το υψηλό επίπεδο διεύθυνσης στις διεθνείς αγορές καθιστούν την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια μια από τις δραστηριότητες με στρατηγική σημασία για το νέο

αναπτυξιακό πρότυπο της εγχώριας οικονομίας. Η στροφή προς τον υγιεινό τρόπο ζωής και η τάση αύξησης της κατά κεφαλήν κατανάλωσης ψαριού, σε συνδυασμό με τη σταθεροποίηση ή πτώση της αλιείας, προοιωνίζουν ότι οι συνθήκες που θα αντιμετωπίζει ο κλάδος στο μέλλον θα είναι αρκετά ευνοϊκές.

Σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Εταιρίας Στατιστικών και Οικονομικών Πληροφοριών (Hellastat A.E.) οι προοπτικές για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές με προβλεπόμενη ετήσια αύξηση της παραγωγής κατά 5%. Κύριοι λόγοι στους οποίους βασίζονται οι θετικές αυτές προβλέψεις είναι η μείωση των αλιευμάτων, λόγω ρυθμιστικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, η αυξανόμενη έμφαση για την υγιεινή διατροφή, η όλο και μεγαλύτερη εξοικείωση του καταναλωτικού κοινού με τους ιχθύες ιχθυοκαλλιέργειας, οι πιο έντονες διαφημιστικές ενέργειες των εταιρειών, η διείσδυση των αλιευμάτων σε νέες αγορές του εξωτερικού, η ανάπτυξη καλλιέργειας νέων ειδών και η υψηλή τεχνογνωσία και η μακροχρόνια εμπειρία των εταιρειών του κλάδου. Σε γενικές γραμμές, η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα επικεντρώνεται στην παραγωγή γόνου και ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού, ενώ γίνονται συνεχείς προσπάθειες και έρευνα από τις εταιρείες του κλάδου, με στόχο την ανάπτυξη της καλλιέργειας νέων ειδών (μυτάκι, λυθρίνι, φαγκρί, σαργός, συναγρίδα κ.α.).

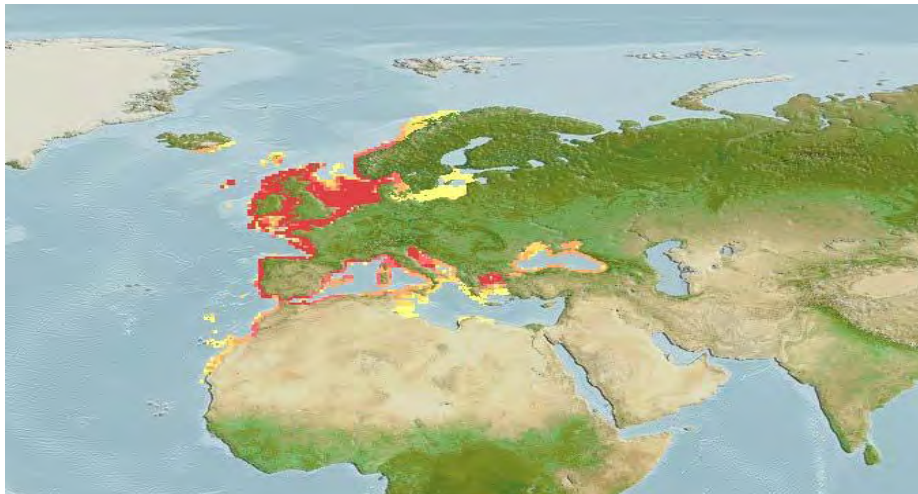
1.3 Στοιχεία βιολογίας τσιπούρας και λαυρακιού

Το λαβράκι (**Εικόνα 1**), *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα είδη της Μεσογειακής θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας. Είναι ακτινοπετερόγιοις ιχθύς της οικογένειας των Moronidae (Κασπίρης 2000), με γεωγραφική κατανομή στις ανατολικές περιοχές του Ατλαντικού Ωκεανού (από τη

Νορβηγία μέχρι το Μαρόκο, τα Κανάρια νησιά και τη Σενεγάλη), τη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα (Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)



Εικόνα 2. Γεωγραφική κατανομή του λαβρακιού (www.fishbase.com)

Πρόκειται για βενθοπελαγικό είδος που απαντάται στην παράκτια ζώνη καθώς και σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Στο φυσικό περιβάλλον τα ιχθύδια μεταναστεύουν σε λιμνοθάλασσες και μικρούς κόλπους το χειμώνα, ενώ στο τέλος της άνοιξης επιστρέφουν στη θάλασσα (www.fishbase.com).

Έχει επίμηκες σχήμα σώματος, με D9-11, XI-XII τύπο ραχιαίου και A3, X-XII τύπο εδρικού πτερυγίου, μικρά λέπια, ελαφρώς διχαλωτό ουραίο πτερύγιο και ασημί-γκρι χρώμα. Η πλευρική γραμμή είναι ευδιάκριτη και σκουρόχρωμη με 62-80

κυκλοειδή λέπια (Moretti et al. 1999). Το μέγιστο βάρος και ολικό μήκος που έχει αναφερθεί είναι 12 Kg και 103 cm αντίστοιχα (www.fishbase.com).

Είναι γονοχωριστικό είδος με εξωτερική γονιμοποίηση και ισχυρό θερμοεξαρτώμενο φυλοκαθορισμό (Koumoundouros et al. 2002a). Στους φυσικούς πληθυσμούς της λεκάνης της Μεσογείου η αναπαραγωγική ωρίμανση λαμβάνει χώρα τους μήνες Σεπτέμβριο-Μάρτιο όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 11-15 °C (Mananos et al. 1997). Εντούτοις, η εμβρυική ανάπτυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγαλύτερο θερμοκρασιακό εύρος (8-20 °C) (Jennings & Pawson, 1992). Είναι είδος ευρύθερμο και ευρύαλο (Moretti et al. 1999). Οι διατροφικές συνήθειες του είδους περιλαμβάνουν μικρά ψάρια, κεφαλόποδα και καρκινοειδή. Πρόκειται για ενεργό θηρευτή και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη της θαλάσσιας μεσογειακής καλλιέργειας (Moretti et al. 1999).

Η τσιπούρα (**Εικόνα 3**) *Sparus aurata* (Σπάρος ο χρυσόχρους) είναι ψάρι της οικογένειας των Σπαρίδων που απαντά στην Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού. Η τσιπούρα μαζί με το λαβράκι από πλευράς διατροφικής αξίας ανήκουν στα πιο πολύτιμα ψάρια της Μεσογείου, καθώς είναι πλούσια στα λιπαρά οξέα ω-3. Είναι ένα από τα κύρια ψάρια για τις ιχθυοκαλλιέργειες και το πιο εκτροφεύσιμο είδος της Μεσογείου.



Εικόνα 3. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Έχει συνήθως μήκος 35 εκατοστά, αν και έχουν καταγραφεί ψάρια με μήκος 70 εκατοστά. Η βαρύτερη τσιπούρα που έχει αλιευθεί είχε βάρος 17,2 κιλά. Η μεγαλύτερη καταγεγραμμένη ηλικία τσιπούρας είναι 11 έτη (σε αιχμαλωσία). Έχει ασημένιο χρώμα με μια χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος. Επίσης, χαρακτηριστικό είναι και το χρυσό τόξο που ενώνει τα μάτια, πιο έντονο στα ενήλικα ψάρια, και έδωσε στην τσιπούρα το όνομα «χρυσόφρυς». Υπάρχει μια κόκκινη γραμμή στο όριο του κάτω μισού του βραγχο-καλύμματος. Η τσιπούρα έχει έντονα κυρτό προφίλ, οβάλ και ψηλό σώμα.

Είναι ψάρι ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Έτσι μπορεί να ζήσει τόσο στην ανοικτή θάλασσα όσο και στις εκβολές ποταμών και σε λιμνοθάλασσες. Πέρα από τους αμμώδεις πυθμένες και τα λιβάδια ποσειδωνίας, όπου βρίσκει εύκολα τη τροφή της, η τσιπούρα απαντάται σε βραχώδεις πυθμένες που συνορεύουν με τα προαναφερθέντα οικοσυστήματα ενώ τσιπούρες έχουν βρεθεί και μέσα σε υποθαλάσσια σπήλαια.

Είναι ένα είδος κοινό στη Μεσόγειο και στην ακτή του Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία ως τη Σενεγάλη (**Εικόνα 4**). Συναντάται πάνω από αμμώδεις πυθμένες ή πυθμένες με θαλάσσια φανερόγαμα, σε βάθη έως 30 μέτρα, αν και έχουν παρατηρηθεί ενήλικες τσιπούρες σε βάθος 150 μέτρων. Την άνοιξη πλησιάζει σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Είναι κυρίως σαρκοφάγα, ενώ περιστασιακά τρέφεται και από φυτά. Τρέφονται με μαλάκια, συμπεριλαμβανομένων των μυδιών και των στρειδιών. Η τσιπούρα σχηματίζει κοπάδια πολυμελή ή ολιγομελή, ενώ κάποιες φορές, μεγάλα θηλυκά άτομα μπορεί να βρεθούν να κυνηγούν μόνα τους για μια περίοδο.



Εικόνα 4. Γεωγραφική κατανομή της τσιπούρας (www.fishbase.com)

1.4 Διατροφική αξία ιχθύων

Η πλούσια διατροφική αξία των ψαριών είναι αναμφισβήτητη. Η περιεκτικότητά τους σε πολύτιμα συστατικά έχει καθιερώσει την κατανάλωση ψαριών σε μία από τις πιο υγιεινές διατροφικές συνήθειες με ευεργετικά αποτελέσματα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα ψάρια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα, βιταμίνες (A, B, E, D, και K), πρωτεΐνες μεγάλης βιολογικής αξίας (έως και 25%), ανόργανα άλατα όπως το ασβέστιο, το νάτριο, το κάλιο, ο φώσφορος, ο χαλκός, ο σίδηρος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, το μαγνήσιο και το ιώδιο. Επίσης, τα ψάρια είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, γνωστά και ως ω-3 ([http 1](#)).

Τα θαλασσινά είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, περιέχουν αξιοσημείωτες ποσότητες βιταμινών (A, B, D), ιχνοστοιχείων και μετάλλων (ασβέστιο, κάλιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό, ιώδιο, σελήνιο), ενώ η περιεκτικότητά τους σε λίπη και υδατάνθρακες είναι χαμηλή έως και μηδενική ([http 1](#)). Τα θαλασσινά περιέχουν υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, με όλα τα αμινοξέα που δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του ο οργανισμός, και μάλιστα σε ποσότητες που σε κάποια είδη υπερβαίνουν

αυτές του κρέατος. Τα θαλασσινά ενισχύουν την πνευματική απόδοση, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις τη βελτιώνουν αισθητά ([http 2](#)). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι παρέχουν στον εγκέφαλο μεγάλες ποσότητες τυροσίνης- αμινοξέα που αυξάνει την εγρήγορση και την πνευματική διαύγεια ([http 3](#)). Επίσης, η υψηλή περιεκτικότητα των θαλασσινών σε αμινοξέα, βιταμίνες Β και ψευδάργυρο διευκολύνει την καλή αιμάτωση και τη διαστολή των γεννητικών οργάνων, την ενδογενή παραγωγή νευροδιαβιβαστών και τη σύνθεση διαφόρων ορμονών, όπως η τεστοστερόνη ([http 4](#)).

Το λίπος των ψαριών αποτελείται από ω-3 λιπαρά οξέα – συστατικά τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για τον οργανισμό μας καθώς προλαμβάνουν και αντιμετωπίζουν αρκετές ασθένειες όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ορισμένες ανωμαλίες του ανοσοποιητικού συστήματος, τη νόσο του Crohn, τον καρκίνο του μαστού ή του προστάτη. Επίσης, τα ω-3 λιπαρά έχουν σπουδαίες αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες, εμποδίζουν την εμφάνιση αρρυθμιών και της αθηροσκλήρωσης, ενώ παράλληλα παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες οι οποίες σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων ([http 2](#)). Ταυτόχρονα, τα ω-3 λιπαρά είναι απαραίτητα για τον οργανισμό μας σε περιόδους πνευματικής καταπόνησης καθώς τροφοδοτούν τον εγκέφαλο, αυξάνουν τη συγκέντρωση και την ψυχοκινητική εξέλιξη, βοηθούν στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και οξύνουν τα αντανακλαστικά. Η κατανάλωση επαρκούς ποσότητας λιπαρών οξέων οδηγεί παράλληλα στην ελάττωση της πηκτικότητας του αίματος, στη μείωση της κακής χοληστερόλης (LDL) και στην αύξηση της καλής χοληστερόλης (HDL) δημιουργώντας μία «ασπίδα» κατά της στεφανιαίας νόσου ([http 1](#)).

Τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα συστήματα - μίγματα θρεπτικών συστατικών τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από τα δομικά

συστατικά που παρέχουν για τον μυϊκό ιστό και τα απαραίτητα προϊόντα για το μεταβολισμό, εξυπηρετούν τον άνθρωπο είτε βοηθώντας στην ανάπτυξη του οργανισμού και τη διατήρηση της κατάστασης της υγείας του, είτε προμηθεύοντας την απαιτούμενη ενέργεια για τις λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος.

Επειδή τα τρόφιμα περιέχουν θρεπτικά συστατικά πρέπει να διαφυλάσσεται η θρεπτικότητα και να επιδιώκεται η βελτίωση της θρεπτικής αξίας αυτών, λαμβάνοντας πρόνοια για τις μικρότερες δυνατές αλλοιώσεις και για τη μείωση στο ελάχιστο των παραγόντων μόλυνσης. Οι επεξεργασίες παραγωγής και συντήρησης των τροφίμων πρέπει να είναι κατάλληλες, ώστε να παρέχουν προϊόντα ασφαλή με υψηλό βαθμό αποδοχής από τον καταναλωτή. Η καταλληλότητα ενός τροφίμου είναι τόσο υποκειμενική όσο και αντικειμενική και αξιολογείται από τον καταναλωτή με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτού (εμφάνιση, οσμή, γεύση, χρώμα, υφή) αλλά βέβαια ισχύει και σχετική νομοθεσία. Η ποιότητα του τροφίμου ορίζεται ως ο βαθμός προσαρμογής στις απαιτήσεις του καταναλωτή, οι οποίες έχουν σχέση με τη θρεπτικότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Εξαρτάται από την ποιότητα των πρώτων υλών και από την τεχνολογία παραγωγής, εκφράζεται δε με τα χαρακτηριστικά του γνωρίσματα όπως είναι το άρωμα, η γεύση, η σύσταση κ.ά. Έτσι η ποιότητα ενός τροφίμου αποτελεί την οριακή «συνισταμένη των επί μέρους ποιοτήτων» των υλικών και των μεθόδων τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του συγκεκριμένου προϊόντος (http 1,2,3).

Ως αλλοίωση των τροφίμων θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld 1996). Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης όπως το βοδινό και το χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, κλπ. Για το λόγο αυτό απαιτείται πολύ προσεκτικός χειρισμός κατά την αποθήκευσή τους. Η

υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (τάγγιση) (Ashie et al. 1996, Gram et al. 1996). Ωστόσο για τα νωπά αλιευτικά προϊόντα υπό ψύξη, ο κυριότερος μηχανισμός υποβάθμισης της ποιότητας τους και ειδικότερα της ‘φρεσκότητας’ του είναι η μικροβιολογική δραστηριότητα (Gram & Dalgaard 2002; Parlapani et al. 2014).

Η μικροβιακή αλλοίωση που αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard 2002) εκδηλώνεται με αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (οσμή, γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill 1986). Οι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα προέρχονται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσης των ιχθύων - αρχική μικροβιακή σύνθεση (*Pseudomonas*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix*) και από επιμόλυνση π.χ. άνθρωπο, εργαλεία, σκεύη, επιφάνειες εργασίας, δεξαμενές-βούτες, μέσα μεταφοράς/κιβώτια, πάγος κτλ (Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).

Κατά τη συντήρηση των ιχθύων, τα *Pseudomonas* είναι οι μικροοργανισμοί που φθάνουν στους υψηλότερους πληθυσμούς (από περίπου τα μέσα του χρόνου συντήρησης) και επικρατούν μέχρι το χρόνο απόρριψης, ενώ τα *Shewanella* (υδροθειούχα βακτήρια) αποτελούν τους επόμενους πιο επικρατέστερους μικροοργανισμούς στα αλιεύματα της Μεσογείου σε θερμοκρασίες ψύξης (Koutsoumanis & Nychas 2000, Parlapani et al. 2013, 2014) ενώ το αντίθετο παρατηρείται στους ιχθύες της Β. Ευρώπης – επικρατούν τα *Shewanella* έναντι των *Pseudomonas* (Gram et al. 1987, Dalgaard et al. 1993, Dalgaard 1995). Οι

μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ), παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη (Parlapani et al 2014, 2015a,b). Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003). Έχει αναφερθεί ότι ακόμα και μικρές αλλαγές στις συνθήκες συντήρησης (π.χ. θερμοκρασία) πιθανόν να προκαλέσουν την επιλογή διαφορετικών μικροοργανισμών και κατά συνέπεια έναν διαφορετικό τύπο αλλοίωσης με σημαντικές διαφορές στην ποιότητα και τον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος (Koutsoumanis & Nychas, 1999, Parlapani *et al.* 2016).

Επιπλέον, μία ακόμα κύρια αιτία για την επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν τους ΕΑΜ είναι η γεωγραφική προέλευση του ιχθύος (Parlapani et al. 2016). Οι Parlapani et al. (2016) με την εφαρμογή της αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing-Illumina MiSeq) έδειξαν ότι οι ιχθύες οι οποίοι προέρχονταν από τα νερά του Ιονίου παρουσίασαν μία διαφορετική εικόνα αρχικής μικροβιακής σύνθεσης σε σχέση με αυτούς που προέρχονταν από τα νερά του Αιγαίου. Μετά από συντήρηση των ιχθύων αυτών σε θερμοκρασίες ψύξης, το *Pseudomonas* βρέθηκε να είναι το επικρατέστερο γένος μικροοργανισμών στις τσιπούρες που προέρχονταν από τις υδατοκαλλιέργειες του Ιονίου, ενώ το *Psychrobacter* βρέθηκε να είναι το επικρατέστερο γένος μικροοργανισμών στις τσιπούρες που προέρχονταν από τις υδατοκαλλιέργειες του Αιγαίου. Η συνολική εικόνα που αφορούσε την αλλοιογόνο μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων μεταξύ των δύο θαλασσών ήταν διαφορετική (Parlapani et al. 2016).

1.6 Εκτίμηση του σταδίου αλλοίωσης/ποιότητας των ιχθύων

Κατά καιρούς, διάφορες μεθοδολογίες, μικροβιολογικές (απαρίθμηση πληθυσμού της OMX και κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε τρυβλία) και χημικές (ολικό πτητικό βασικό άζωτο/TVB-N, τριμεθυλαμίνη/TMA ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης/TMA-N, βιογενείς αμίνες, οργανικά οξέα, πτητικοί μεταβολίτες), έχουν χρησιμοποιηθεί (απαρίθμηση OMX, TVB-N, TMA-N) ή προταθεί (απαρίθμηση αλλοιογόνων, βιογενείς αμίνες, οργανικά οξέα, πτητικοί μεταβολίτες) για τον προσδιορισμό του σταδίου αλλοίωσης των ιχθύων και γενικότερα για αυτό που λέμε 'φρεσκότητα' (freshness) (Joffraud et al. 2001, Malle et al. 1989, Mietz & Karmas 1977, Olafsdottir et al. 1997, Parlapani et al. 2014; 2015a,c). Ωστόσο, οι μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού ενός τροφίμου (απαρίθμηση των μικροοργανισμών) στηρίζονται στη χρήση εκλεκτικών ή γενικής χρήσης τεχνητών υποστρωμάτων (θρεπτικά υλικά), η αξιοπιστία των οποίων περιορίζεται κυρίως εξαιτίας της δυνατότητας μέτρησης μόνο των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες είτε γενικά ή στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (Broekaert et al. 2011). Επιπλέον, η επώαση των μικροοργανισμών με σκοπό την απαρίθμησή τους απαιτεί χρόνο π.χ. η απαρίθμηση της OMX πραγματοποιείται έπειτα από επώαση των υποστρωμάτων στους 25°C τουλάχιστον για 48 ώρες. Έτσι, οι κλασσικές τεχνικές χαρακτηρίζονται χρονοβόρες. Από την άλλη, η χρήση του TVB-N αντικατοπτρίζει μόνο τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης (Oehlerschläger 1992, 1997a,b). Επίσης, το TMA-N δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ποιότητας/σταδίου αλλοίωσης διότι η συγκέντρωσή του είναι πολύ χαμηλή έως μηδαμινή στα ελληνικά αλιεύματα

(Drosinos & Nychas 1996, Drosinos et al. 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, 2000). Τέλος, η χρήση των υπολοίπων ουσιών (βιογενείς αμίνες, οργανικά οξέα και πτητικοί μεταβολίτες) για την εκτίμηση της ποιότητας/σταδίου αλλοίωσης των ιχθύων βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο.

Οι μοριακές μη καλλιεργητικές τεχνικές φαίνεται να αποτελούν την εναλλακτική λύση για τον γρήγορο προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού που είναι όπως προαναφέρθηκε και το αίτιο της υποβάθμισης της ποιότητας-φρεσκότητας. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του προκαρυωτικού DNA το οποίο προκύπτει απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων είναι δυνατό να δώσει σημαντική πληροφόρηση σχετικά με την ποσότητα του βακτηριακού DNA που υπάρχει σε ένα δείγμα ιχθύος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής του (Parlapani et al. 2016). Η βελτίωση των πρωτοκόλλων εκχύλισης του προκαρυωτικού DNA απευθείας από τη σάρκα των αλιευμάτων έχει συμβάλλει ουσιαστικά στην εξαγωγή, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του (Parlapani et al., 2016-under submission). Η συσχέτιση του πληθυσμού των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε θρεπτικά υποστρώματα με τον κύκλο κατά τη διάρκεια του οποίου το δείγμα φθάσει τη γραμμή threshold (PCR cycle threshold values-CT) στη ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) έχει διεξαχθεί επιτυχώς από άλλους ερευνητές (Reynisson et al., 2008, Douflos et al., 2010, Mamlouk et al., 2012, Macé et al., 2013, Lee & Levin, 2007).

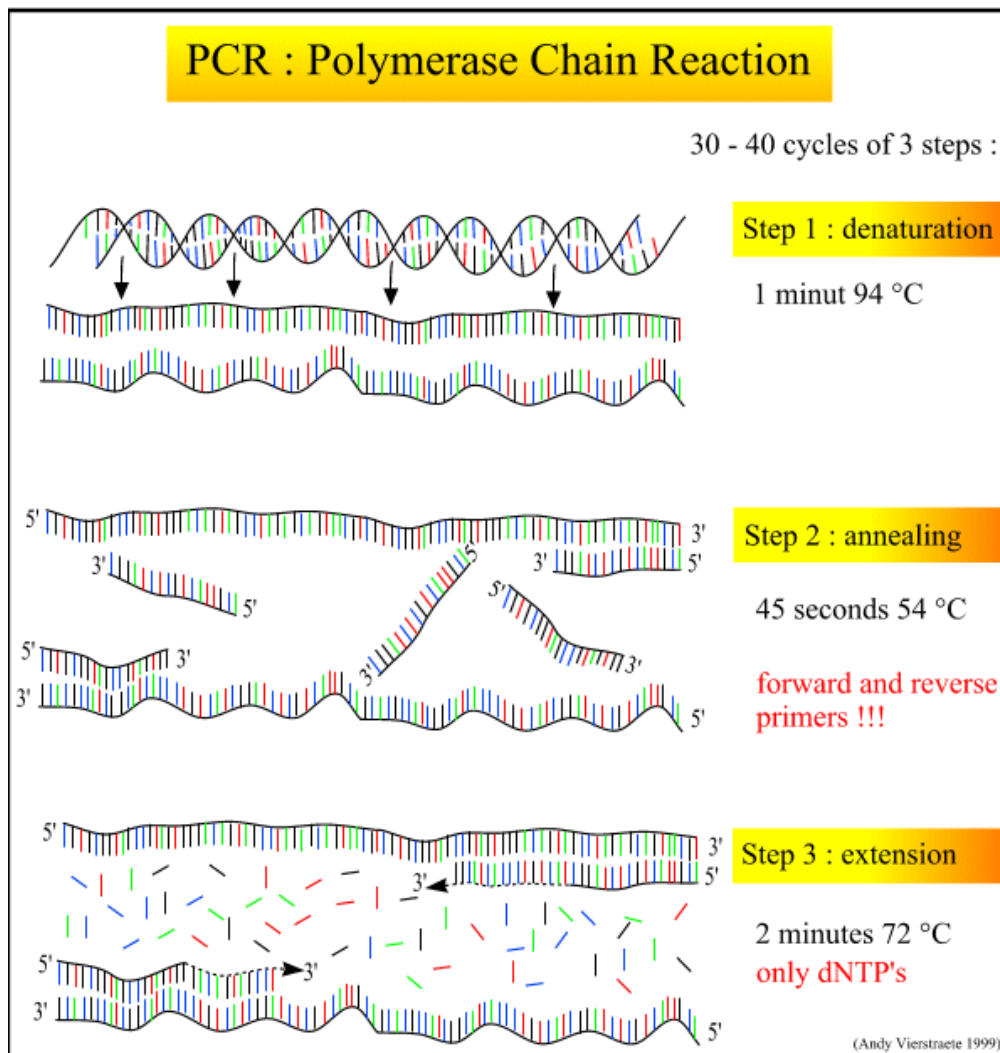
1.5 Τεχνολογία της PCR

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο (Le Dréan et al., 2010). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και

δύο ειδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στην αλληλουχία των ακρών του επιθυμητού τμήματος DNA. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια στάδια (**Εικόνα 5**) τα οποία επαναλαμβάνονται σε 20 έως 40 κύκλους (*Malorny et al., 2008*). Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

- ❖ Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95 °C (denaturation)
- ❖ Αναδιάταξη στους 50 – 60 °C (annealing)
- ❖ Επιμήκυνση στους 72 °C (extension)

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation,). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C (το εύρος είναι ενδεικτικό και εξαρτάται από το ζευγάρι των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην κάθε αντίδραση) και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing,). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (*Masco et al., 2007, (Βερβερίδης κ.α., 2003)*).

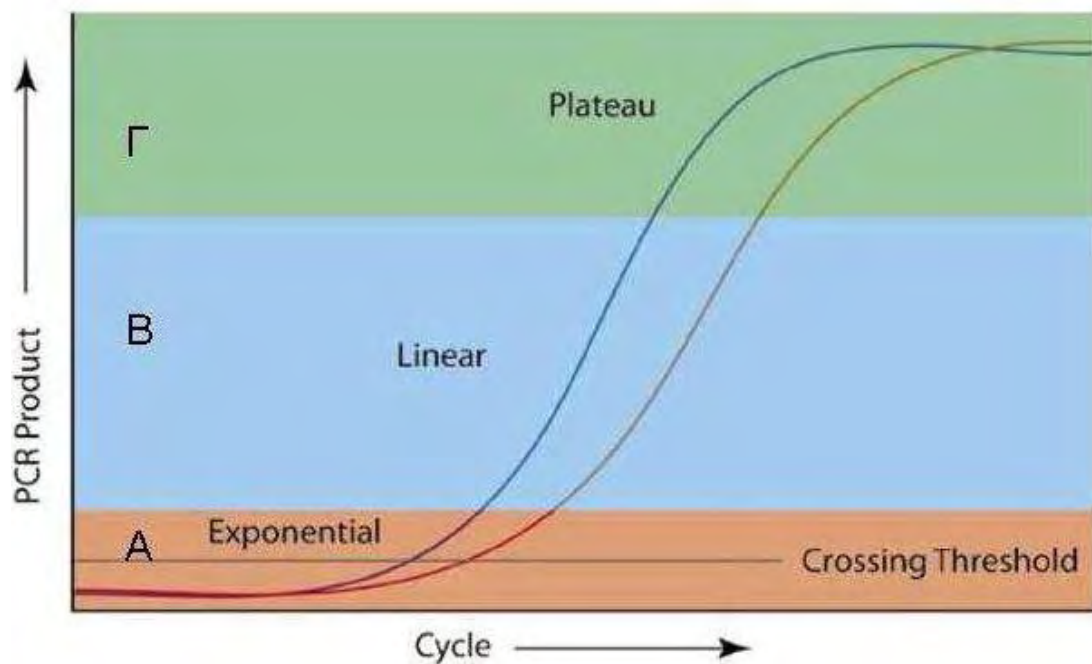


Εικόνα 5. Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension) (Vierstraete, 1999).

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- ❖ Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (**Εικόνα 6Α**).

- ❖ Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων (**Εικόνα 6B**).
- ❖ Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (**Εικόνα 2Γ**) (Applied Biosystems, XX).



Εικόνα 6. Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (VanGuilder *et al*, 2008).

Η επιτυχία μιας αντίδρασης PCR κρίνεται από πολλές παραμέτρους. Η αλληλουχία και η συγκέντρωση των εκκινητών συσχετίζεται άμεσα με την επιτυχία της δοκιμής (Hunt, 2006). Οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν μήκος 18-24bp, να μην περιέχουν καμία δευτερεύουσα δομή, η αναλογία γουανίνης προς κυτοσίνη να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%, και να υπάρχει ισόρροπη κατανομή αδερίνης, θυμίνης και γουανίνης, κυτοσίνης (Berg *et al*, 2002). Η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m , melting temperature), θα πρέπει να είναι ίδια για το ζεύγος των εκκινητών και να έχει τιμή μεταξύ 55°-65 °C ώστε να επιτρέπεται ο υβριδισμός τους

στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου. Η συγκέντρωση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,5-2,5 u/μl, διαφορετικά η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου οδηγεί σε μείωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων της αντίδρασης (Roche, 1999).

Το διάλυμα των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) αποτελείται από τα νουκλεοτίδια ATP, TTP, CTP, GTP, τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων κλώνων. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να περιέχει ίσες ποσότητες από κάθε νουκλεοτίδιο, ώστε να μην επηρεάζεται η δράση του ενζύμου (Davidson, 2002). . Αυξημένη συγκέντρωση του διαλύματος των dNTPs σε μια αντίδραση PCR, οδηγεί σε μείωση των ελευθέρων ιόντων Mg²⁺ και συνεπώς επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του επιθυμητού τμήματος DNA μπορεί να μειωθεί, με την χρήση αυξημένης συγκέντρωσης διαλύματος dNTPs (Roche, 1999, Mackay, 2004).

1.6 Τεχνολογία της Real Time PCR

Η Real Time PCR αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR, αλλά υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο (Mumford et al., 2006). Συχνά αναφέρεται και με άλλες ονομασίες όπως Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) ή Kinetic PCR, ενώ πολύ συχνά συγχέεται με την μέθοδο της Αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription PCR) εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR.

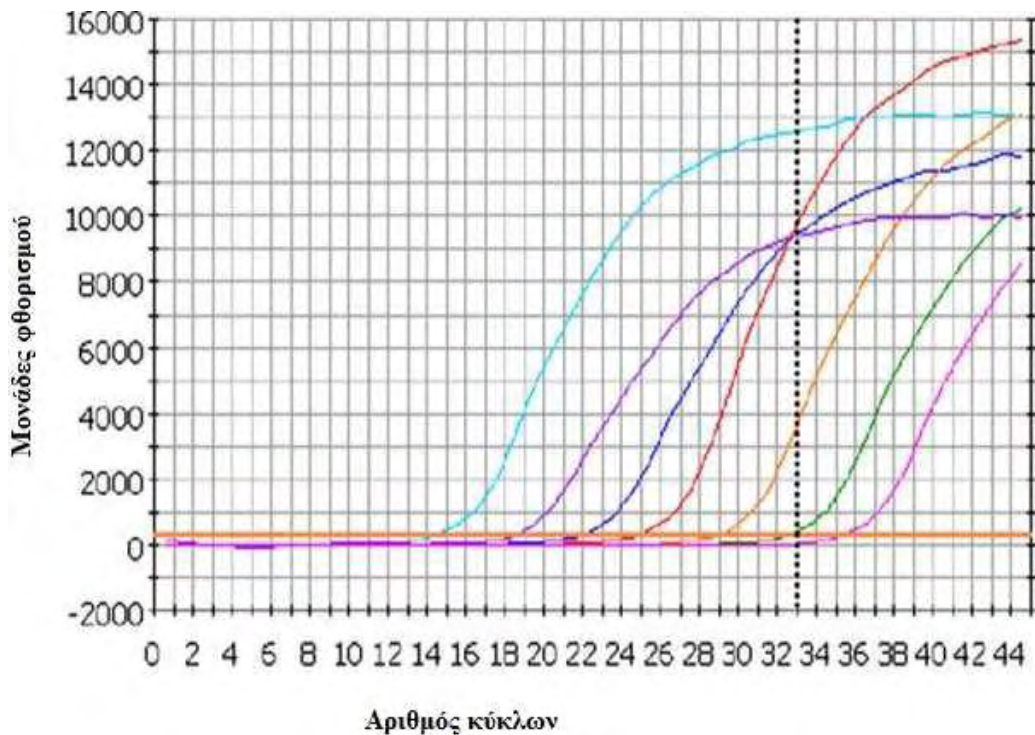
Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και σε μικρότερο χρόνο απ'

ότι η PCR και δίδει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, γεγονός που αποτελεί κι το βασικό πλεονέκτημα έναντι της συμβατικής PCR (**Εικόνα 7**) (Houghton et al, 2006). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από μηχανισμούς αντίχενυσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών, κάτι που δεν υφίσταται στην συμβατική μέθοδο (Houghton et al, 2006).



Εικόνα 7. Η διαδικασία της μεθόδου Real Time PCR. Ξεκινάει από την απομόνωση του DNA, συνεχίζει στην αντίδραση της Real Time PCR και τελειώνει με την ανίχνευση των προϊόντων (AppliedBiosystems, XX).

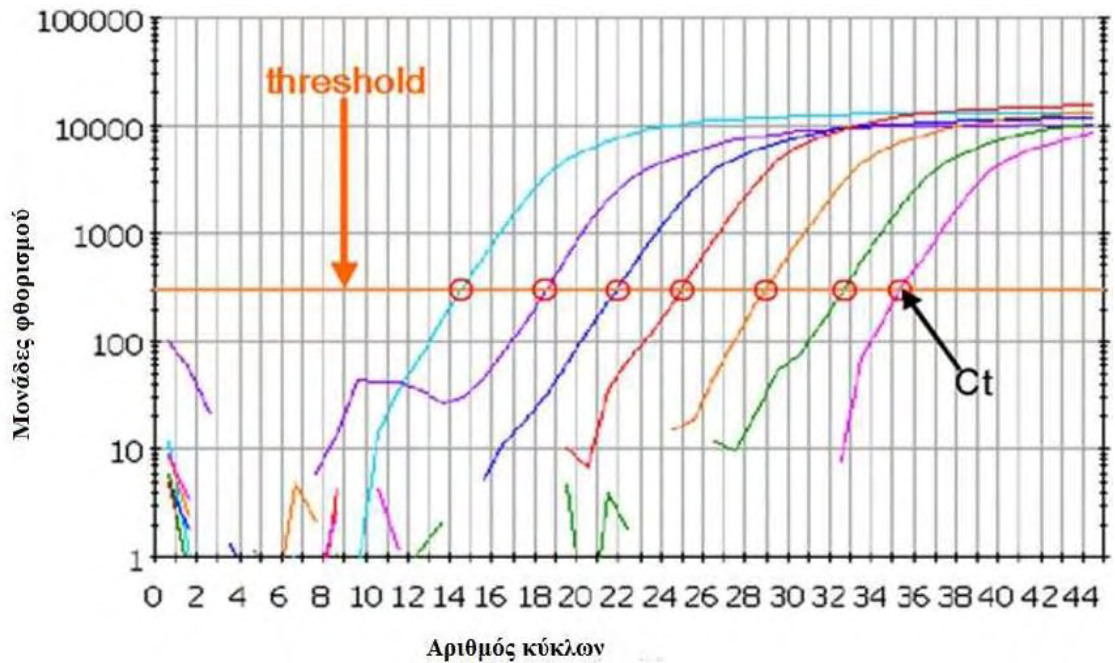
Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του φθορίζοντος σήματος ανίχενυσης που εκπέμπουν σε κάθε κύκλο αντίδρασης τα μόρια του DNA (**Εικόνα 7, 8**).



Εικόνα 8. Καταγραφή τιμών φθορισμού της χρωστικής SYBR Green που απεικονίζει την σταδιακή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο (Hunt, 2006).

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, μόνο όταν προσδεθούν στο δίκλωνο μόρι του DNA, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος (**Εικόνα 8**). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006).

Η γραμμή Threshold (**Εικόνα 9**) ορίζεται στο σημείο εκείνο το οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct) ή τιμή Ct (Applied Biosystems, XX).



Εικόνα 9. Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct, (Hunt, 2006).

Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA-στόχου στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή **Ct** για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong et al, 2005).

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al, 2001).

1.8 Ποσοτική PCR και οι διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται.

Η quantitative PCR (qPCR) ή αλλιώς ποσοτική PCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας της αλληλουχίας DNA μέσα στο δείγμα. Η ποσότητα προϊόντος που ανιχνεύεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στόχου μέσα στο δείγμα. Με την μέθοδο αυτή

είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν ποσότητες DNA ή RNA. Στην qPCR υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για την σήμανση των προϊόντων της Real time PCR (Levin et al. 2007). Η μια μέθοδος βασίζεται στην χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (DNA binding dyes) π.χ. SYBR Green I, και η άλλη στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηλατών (probes) (Houghton et al, 2006).

1.8.1 SYBR Green I

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR Green I. Η ουσία αυτή δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα ενώ όταν ενσωματώνεται στο DNA, κατά την σύνθεσή του παράγει φθορισμό (**Εικόνα 10**). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Wong et al, 2005).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών, γεγονός που την καθιστά πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ιχνηλατών. Ωστόσο με αυτή την μέθοδο, λόγω της πρόσδεσης της χρωστικής σε όλα τα παραγόμενα δίκλιωνα μόρια DNA μπορεί εύκολα προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα, καθώς μπορεί να συμπεριληφθούν και μη ειδικά προϊόντα που παράγονται αλλά και διμερή εκκινητών (Stratagene, 2006). Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών καθώς και με την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το τέλος της αντίδρασης δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας από τους φθορισμούς που οφείλονται σε διμερή εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα (Lee et al, 2009).



Εικόνα 10. Τρόπος λειτουργίας της μεθόδου Real Time PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I (Lee et al, 2009).

Ένα μειονέκτημα της SYBR Green I είναι ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση και μπορεί να δεθεί με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA, ακόμα και σε τμήμα που δημιουργήθηκε από ένωση των εκκινητών μεταξύ τους (εσφαλμένος διμερισμός εκκινητών, primer-dimer artifacts). Έτσι δεν είναι δυνατόν η χρήση της SYBR Green I να πιστοποιήσει ότι το σήμα που εκπέμπεται αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει (Houghton et al, 2006).

1.9 Διαφορές μεταξύ PCR και Real Time PCR

Παρόλο που η Real Time PCR είναι παραλλαγή της PCR υπάρχουν ορισμένες βασικές διαφορές στον τρόπο που λειτουργούν οι δύο μέθοδοι. Η PCR είναι μια κυρίως ποιοτική μέθοδος που δεν μπορεί να εκφράσει τα αποτελέσματα της αντίδρασης με συγκεκριμένα νούμερα, ενώ με την Real Time PCR μπορεί να γίνει ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR μπορούν να ελεγχθούν μόνο μετά το τέλος της διαδικασίας και αφού πρώτα γίνει ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων σε πηκτή αгарόζης (Hunt, 2006). Ενώ η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των προϊόντων οποιαδήποτε στιγμή μέσω αισθητήρα που διαθέτει η συσκευή της Real Time PCR, κάνοντας επισπεύδοντας την διαδικασία. Ο αισθητήρας αυτός καταγράφει τον φθορισμό που εκπέμπουν τα προϊόντα που σχηματίζονται και στην συνέχεια δίδει τα

δεδομένα στον υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένη η συσκευή (Houghton et al, 2006). Άλλη μια διαφορά είναι η φάση κατά την οποία γίνεται η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης.

Στην PCR η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται στην φάση του plateau, όταν δηλαδή η αντίδραση βρίσκεται στο τέλος της διαδικασίας και έχει αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αντιγράφων, λόγω ελάττωσης των αντιδραστηρίων και μειωμένης δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης. Αντίθετα στην Real Time PCR τα προϊόντα ανιχνεύονται κατά την διάρκεια της εκθετικής (exponential) φάσης, όπου τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή (Gachon et al., 2004). Ακόμα στο διάλυμα της Real Time PCR προστίθεται συγκεκριμένη χρωστική ουσία όπως π.χ. (SYBR Green I ή probes) που αποτελεί και τον μηχανισμό ανίχνευσης για την παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω κατάλληλου ανιχνευτή της ακτινοβολίας της χρωστικής, ενώ στην PCR η ανίχνευση προϊόντων γίνεται με την προσθήκη του Ethidium bromide στη πηκτική αгарόζη, μετά δηλαδή την ολοκλήρωση της αντίδρασης (Hunt, 2006). Μια τελευταία διαφορά είναι ότι με την Real Time PCR είναι δυνατό να μπορούμε να αξιολογίσουμε αν τα προϊόντα της αντίδρασης προέρχονται όντως από το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος, με την βοήθεια της Melting curve, ενώ η PCR δεν έχει τέτοια δυνατότητα (Houghton et al, 2006).

1.10 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού σάρκας ιχθύων με χρήση qPCR. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού ήταν αναγκαίο να γίνει η συσχέτιση των τιμών Ct που προκύπτουν από την qPCR με τις τιμές των λογαρίθμων που προκύπτουν από καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά, για τον προσδιορισμό του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (ή Ολική Μεσόφιλη

Χλωρίδα-OMX) μέσω qPCR, κατά τη διάρκεια συντήρησης ιχθύων ελληνικής υδατοκαλλιέργειας: τσιπούρας και λαβρακιού.

Επίσης πραγματοποιήθηκε α) παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (ή ολικής μεσόφιλης χλωρίδας – OMX) με απαρίθμηση σε θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης (κλασσικές καλλιεργητικές μέθοδοι), β) απομόνωση DNA απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων (τυχαία δείγματα) προς ενίσχυση και αξιολόγηση του βακτηριακού DNA με Real time PCR, γ) απομόνωση DNA καθαρών καλλιεργείων από ταυτοποιημένους στο παρελθόν μικροοργανισμούς με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2015b, c, Parlapani & Boziaris 2016) και δ) συσχέτιση του πληθυσμού της OMX και των κύκλων της Real time PCR (C_T), σε δείγματα ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού κατά τη συντήρησή τους σε διάφορες θερμοκρασίες, ε) οργανοληπτική ανάλυση και προσδιορισμός του εμπορικού χρόνου ζωής σε δείγματα ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού κατά τη συντήρησή τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προέλευση δειγμάτων και δειγματοληψίες

Ολόκληροι ιχθύες βάρους περίπου 400 g από την ελληνική υδατοκαλλιέργεια ΔΙΑΣ (Αιγαίο) και τα Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς (Ιόνιο), τοποθετήθηκαν μέσα σε πολυεστερικά κιβώτια με πάγο και μεταφέρθηκαν εντός 8-12 ωρών στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο. Τα κιβώτια με τους ιχθύες (20 άτομα) και τον πάγο τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 0 °C για 20 ημέρες. Από τους υπόλοιπους ιχθύες (20 άτομα) αφαιρέθηκε ο πάγος και αποθηκεύθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους στους 1°C και 4 °C για 20 και 12 ημέρες, αντίστοιχα.

2.2 Προσδιορισμός του χρόνου απόρριψης

Η οργανοληπτική αξιολόγηση για τους ολόκληρους ιχθύες έγινε βάση των κριτηρίων που περιγράφονται στο Multilingual Guide to EU Freshness Grades for Fishery Products (Howgate et al. 1992) (Πίνακας 1). Η οργανοληπτική εξέταση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Οι κριτές (panel) αποτελούνταν από πέντε (5) άτομα . Κάθε προϊόν απορρίπτονταν όταν οι τρεις (3) από τους πέντε (5) κριτές το αξιολογούσαν ως ακατάλληλο (υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό) για κατανάλωση με βαθμολογία 1. Η βαθμολογία για κάθε χαρακτηριστικό προέκυψε από τους μέσους όρους των πέντε (5) κριτών.

Πίνακας 1 Κριτήρια αξιολόγησης της ποιότητας με τις αισθήσεις σε ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας και λαβρακιού.

	Άριστο (5)	Πολύ καλό (4)	Μέτριο (3)	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό (2)	Υποβαθμισμέν ο και μη αποδεκτό (1)
Δέρμα	Λαμπερό, στιλπνό, δέρμα με ιριδισμούς, χωρίς αποχρωματισμούς	Λαμπερό δέρμα με ελαφρά απώλεια λαμπρότητας, ελαφρά ιριδίζον	Απώλεια λαμπρότητας δέρματος, ιριδίζον	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας μερικώς αποχρωματισμένο	Δέρμα αρκετά Θαμπό, αποχρωματισμένο
Εξωτερική βλέννα	Διαφανής ή υδαρής λευκή	Γαλακτώδης	Αρκετά γαλακτώδης	Γκριζοκιτρινωπή ελαφρά κολλώδης	Καφέ – κιτρινωπή, έντονα κολλώδης και παχύρρευστη
Μάτια	Κυρτά, μαύρη κόρη, διαφανής κερατοειδής	Επίπεδα, κόρη ελαφρά θαμπή, κερατοειδής ελαφρά οπαλίζων	Επίπεδα, κόρη αρκετά θαμπή, κερατοειδής αρκετά οπαλίζων	Ελαφρά κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός κερατοειδής	Κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός ελαφρά αποχρωματισμένος κερατοειδής
Εμφάνιση βραγχίων	Κόκκινα λαμπερά, διαφανής βλέννα	Ρόδινα ελαφρά, ελαφρά θολή βλέννα	Ρόδινα αρκετά, πολύ θολή βλέννα	Γκριζα – καφέ, αποχρωματισμένα, βλέννα θολή	Καφέ, βλέννα θολή και παχύρρευστη
Οσμή βραγχίων και Εσωτερικές Οσμές	Έντονα θαλασσινή	Ελαφρά θαλασσινή	Ελάχιστα θαλασσινή	Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη	Δυσάρεστη

2.3 Συμβατική μέθοδος

Μικροβιολογικά υλικά

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK) και ήταν τα παρακάτω:

2.3.1 Tryptone Soy Agar (TSA)

Το TSA (LAB011) είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της οσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής

Σε φιάλη των 500 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 18.5 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (LAB M). Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια μικρή ποσότητα ≈ 15 ml μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.3.2 Iron Agar (IA)

Το Iron Agar χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών που παράγουν υδρόθειο (H_2S , αποικίες με μαύρο χρώμα). Ωστόσο, το σύνολο μαύρων και μη αποικιών αποτελεί την OMX. Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες (H/C) αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_2$) ανάγεται προς

υδρόθειο (H₂S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου Fe και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

Συστατικά: g/1000 ml (Gram et al. 1987)

Beef Extract	3.0
Yeast Extract	3.0
Peptone	20.0
Sodium Chloride	5.0
Ferric citrate	0.3
L-cysteine	0.6
Sodium Thiosulphate	0.3
Phenol Red	0.025
Agar	14.0

Διαδικασία παρασκευής

Σύμφωνα με τους Gram et al. (1987), σε φιάλη των 500 ml προστέθηκε ξεχωριστά το κάθε συστατικό, 500 ml απιονισμένου νερού και το pH ρυθμίστηκε στο 7.4,. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Αφού το θρεπτικό απέκτησε την ιδανική θερμοκρασία (47 °C), μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

2.3.3 Plate Count Agar (PCA)

Το PCA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχτούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων.

Συστατικά: g/1000 ml

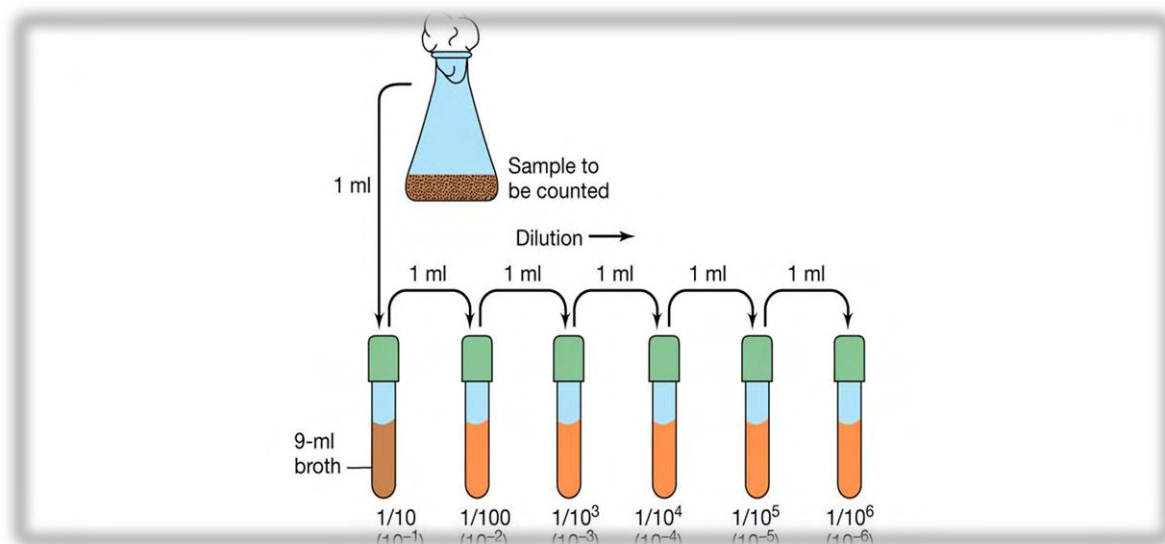
Yeast Extract	0.25
<u>glucose</u>	0.1
<u>peptone</u>	0.5
Agar N° 2	1.5

Διαδικασία παρασκευής

Σε φιάλη των 500 ml προστέθηκαν 10.25 g υλικού και 500 ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού, όπου γίνεται διαυγές και έπειτα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

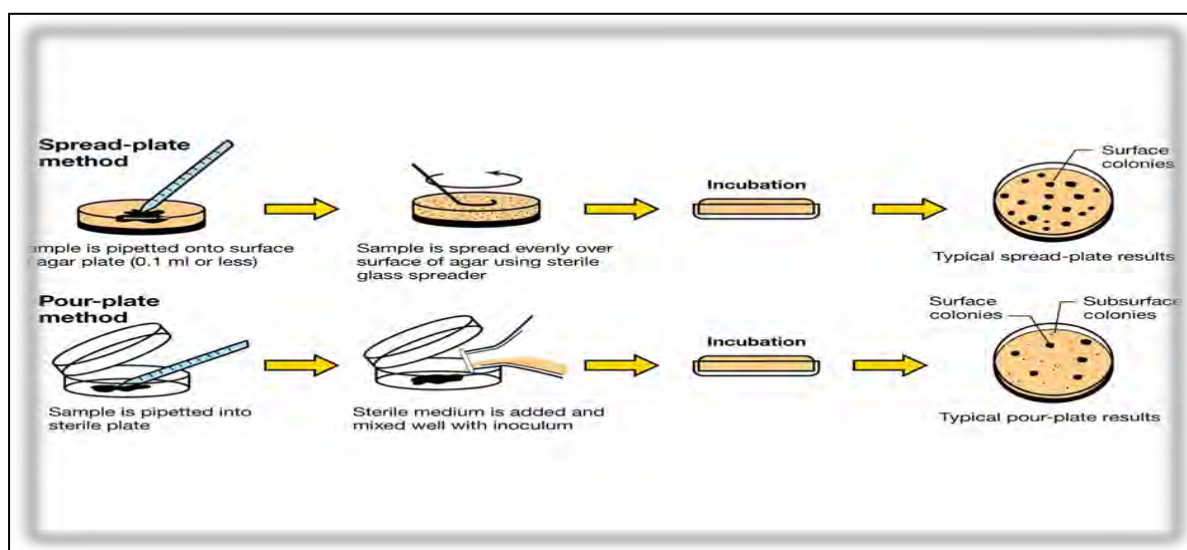
2.3.4 Μικροβιολογική ανάλυση

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 10g, από δύο διαφορετικούς ιχθύες ($n=2 \times 2=4$), μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 90 ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NACL 0,85% και 0,1% Peptone) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Διαδοχικές αραιώσεις

Ο Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός απαριθμήθηκε σε α) TSA (Tryptone Soy Agar), β) IA (Iron Agar), με καταμέτρηση όλων των αποικιών, γ) PCA (Plate Count Agar), μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στο IA και PCA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ εκείνη του TSA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της επίστρωσης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Μέθοδος επίστρωσης και ενσωμάτωσης σε τρυβλίο

2.4 Μέθοδος qPCR

2.4.1 Συλλογή βακτηρίων από σάρκα τσιπούρας

Η συλλογή των βακτηρίων από τη σάρκα των ιχθύων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο των Parlapani et al. (2016, υπό δημοσίευση). Η συλλογή των βακτηρίων πραγματοποιούνταν απευθείας από σάρκα ιχθύος βάρους 25 g (από δύο ιχθύες ανά δειγματοληψία).

2.4.2 Συλλογή βακτηρίων από καθαρές καλλιέργειες

Η συλλογή των βακτηρίων από καθαρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο των Parlapani et al (2016, υπό δημοσίευση).

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε μεταφορά ταυτοποιημένων μικροοργανισμών (Πίνακας 2) υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες (καθαρές καλλιέργειες) που περιείχαν 9ml TSB (tryptone soy broth) και ακολούθησε επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Έπειτα, ακολούθησε μεταφορά 1ml από κάθε καθαρή καλλιέργεια σε έναν νέο αποστειρωμένο άδειο δοκιμαστικό σωλήνα ώστε να δημιουργηθεί μίγμα μικροοργανισμών (mix culture). Ακολούθως το μίγμα μεταφέρθηκε σε ειδικούς σωλήνες (falcon), ώστε να γίνει φυγοκέντριση στις 4750 rpm για 15 min, με σκοπό την καθίζηση των βακτηρίων (pellet). Τέλος έγινε επαναδιαλυτοποίηση του μίγματος με 3ml αποστειρωμένο ύδωρ.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του μείγματος, ώστε να επιτευχθεί η μείωση των λογαρίθμων (από 10 log σε 2 log) με μεταφορά 100μl δείγματος σε 900 μl αραιωτικού μέσου MRD σε αποστειρωμένα tubes του 1.5 ml. Επιπλέον, από τις παραπάνω αραιώσεις έγινε μεταφορά 200 μl σε tubes που περιείχαν 400 μl αραιωτικού μέσου MRD για τη δημιουργία και των ενδιάμεσων λογαρίθμων (9,5 log, 8,5 log κλπ). Μετά την ολοκλήρωση των διαδοχικών αραιώσεων, πραγματοποιούνταν μεταφορά 100 μl από την κάθε αραιώση σε τρυβλία TSA με σκοπό την απαρίθμηση του πληθυσμού ανά περίπτωση, μετά από επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες.

Πίνακας 2. Ταυτοποιημένοι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν (Parlapani et al. 2015b, c, Parlapani & Boziaris 2016)

Μικροοργανισμός

Psychrobacter cryohalolentis strain KOPRI22219 (EU090718)

Psychrobacter maritimus strain CAIM 952 (HM584045)

Pseudomonas fluorescens strain DF41TB (JN642252)

Pseudomonas fluorescens LMG (GU198122)

Pseudomonas fragi strain: JCM 5396 (AB685609)

Pseudomonas fragi strain: JCM 5435 (AB685646)

Pseudomonas fragi strain:MA07(AB609073)

Shewanella putrefaciens ATCC 8071 Dalgaard Denmark B 66

2.4.3 Απομόνωση DNA από σάρκα ιχθύων

Το DNA απομονώθηκε μετά από εκχύλιση 200 μl επαναδιαλυτοποιημένου βακτηριακού pellet με τη χρήση του ZR Soil Microbe DNA MicroPrep (ZYMO RESEARCH CORP, California, USA) σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Ακολούθησε προσθήκη 750 μl Lysis Solution και προσεκτικό ανακάτεμα (pipeting) για 1min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε vortex στο μίγμα για 5 min και φυγοκέντριση στα 10000g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της φυγοκέντρισης έγινε μεταφορά 400 μl από το υπερκείμενο σε φίλτρο Zymo Spin-IV, το οποίο και φυγοκεντρίστηκε στα 7000g για 1 min. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 1200 μl buffer στο φιλτραρισμένο πλέον tube, ώστε να ακολουθήσει μεταφορά των 1600 μl σε δύο φάσεις (800x2), σε φίλτρο Zymo-Spin IC, στο οποίο

έγινε φυγοκέντριση στα 10000g για 1min. Τέλος, έγινε προσθήκη 200 μl DNA Pre-Wash Buffer και φυγοκέντριση στα 10000g για 1min και προσθήκη 500 μl Soil DNA Wash Buffer και φυγοκέντριση στα 10000g. Κλείνοντας την διαδικασία, το φίλτρο IC μεταφέρθηκε σε καινούργιο tube 1,5 ml, ώστε να προστεθούν 20 μl DNA Elution Buffer, και φυγοκέντριση στα 10000g για 30 sec.

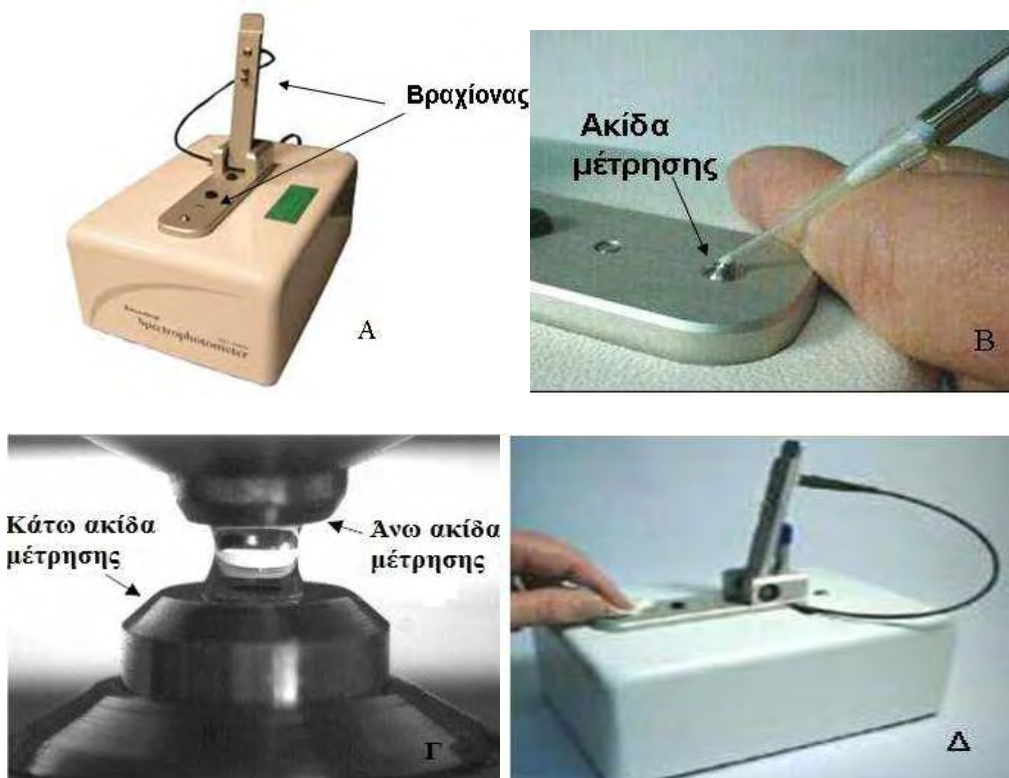
Στη συνέχεια, ακολούθησε έλεγχος του ολικού DNA με τη χρήση του nanodrop.

2.4.4 Απομόνωση DNA από καθαρές καλλιέργειες

Το DNA απομονώθηκε μετά από εκχύλιση 200 μl επαναδιαλυτοποιημένου βακτηριακού pellet με τη χρήση του ZR Soil Microbe DNA MicroPrep (ZYMO RESEARCH CORP, California, USA) σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του nanodrop (Illumina, USA).

2.4.5 Μέτρηση των συγκεντρώσεων προϊόντων των απομονώσεων DNA με Nanodrop

Πριν γίνει αντίδραση της Real Time PCR έπρεπε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του προϊόντος του γενετικού υλικού από τις απομονώσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η μέτρηση αυτή έγινε με την βοήθεια της συσκευής Nanodrop (στο τμήμα Ιχθυολογίας στο εργαστήριο Γενετικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Η συσκευή Nanodrop παρέχει την δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρών ποσοτήτων (1μl) DNA ή RNA σε ελάχιστο χρόνο (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Τα μέρη της συσκευής Nanodrop και ο τρόπος χρήσης της: Α) Ο βραχίονας που φέρει τις ακίδες μέτρησης, Β) Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ακίδα, Γ) Άνω και κάτω ακίδα μέτρησης και Δ) Καθαρισμός ακίδας (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

Η λειτουργία της συσκευής στηρίζεται στην τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την συγκράτηση του δείγματος κατά την διάρκεια της μέτρησης χωρίς την χρήση κυψελίδας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσω ενός προγράμματος στον υπολογιστή με τον οποίο συνδέεται το μηχάνημα. Η συσκευή αποτελείται από βραχίονα που στο κάθε άκρο του διαθέτει από μια ακίδα δειγματολειτουργίας. Για να γίνει η μέτρηση τοποθετήθηκε 1 μl από το υπό ανάλυση δείγμα στην ακίδα του κάτω άκρου και όταν έκλεισε ο βραχίονας και ήρθε σε επαφή η πάνω ακίδα με την κάτω έγινε η μέτρηση του δείγματος. Μετά το τέλος της μέτρησης καθαρίστηκαν οι ακίδες στα δύο άκρα για να την επόμενη μέτρηση (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

2.4.6 Real time PCR απευθείας στα DNA για αξιολόγηση του βακτηριακού DNA

Αμέσως μετά τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού DNA με το nanodrop, ακολούθησε ενίσχυση και αξιολόγηση (σχετική ποσοτικοποίηση) του βακτηριακού DNA με Real time PCR. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), με έδρα την Θέρμη Θεσσαλονίκης.

Στη Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράχθηκε στην αντίδραση έγινε με τη σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετρήθηκε σε κάθε κύκλο και βοήθησε στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε ήταν το Rotor-Gene Q Series Software. Η ένταση του φθορισμού αυξάνονταν σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονταν σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η γραμμή Threshold είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά τη διάρκεια του οποίου το δείγμα φτάσει τη γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct) ή τιμή Ct (Applied Biosystems).

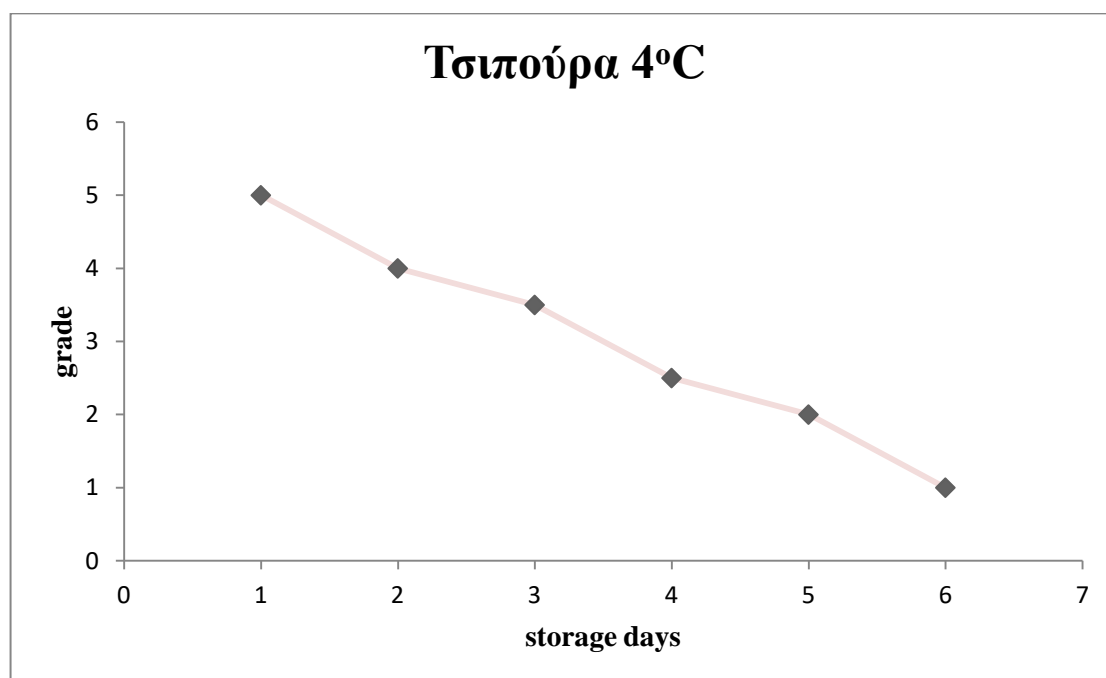
Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της περιοχής V3-V₄ σύμφωνα με τους Klindworth et al. (2013), του γονιδίου 16S rRNA με τους εκκινητές 16S_F: 5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' και 16S_R: 5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν περίπου 400 . Το μείγμα της Real time PCR, τελικού όγκου 20 μl, περιείχε 2μl KAPA 10x buffer, 0,4 μl dNTPS 10 mM, 0,4 μl από τους δύο εκκινητές 10 μM, 0,6 μl Syb g 1,5μM, 0,2 μl polymerase 1M, 14 μl αποστειρωμένο νερό και 2 μl DNA. Επιπλέον,

στην αντίδραση έλαβαν χώρα ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιούνταν στους 95°C για 5 min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ήταν: αποδιάταξη στους 95°C για 20sec, υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 73°C για 30sec, σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια του ενζύμου KAPA στους 72°C για 20sec. Τα στάδια αυτά επαναλήφθηκαν για 40 κύκλους και ακολουθούσε ένα επιπλέον στάδιο τελικής επιμήκυνσης του DNA στους 72°C για 5min. Η θερμοκρασία κατά τη διαδικασία της αποδιάταξης/τήξης (melting) κυμαίνονταν μεταξύ 72-95°C.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτική ανάλυση

Όλα τα προϊόντα αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως άριστα με βαθμό 5, την πρώτη ημέρα που το καθένα εισήχθη σε συνθήκες συντήρησης. Στους 4°C, οι τσιπούρες παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση έως την 2^η ημέρα (βαθμός 4), σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την 4^η ημέρα (βαθμός 3-2) και σε κατάσταση 'υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό' έως την 5^η ημέρα (βαθμός 2), ενώ έφτασε σε κατάσταση 'απορριπτόμενο' την 6^η ημέρα (βαθμός 1). Από την 7^η ημέρα το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως πλήρες αλλοιωμένο (Σχήμα 1).

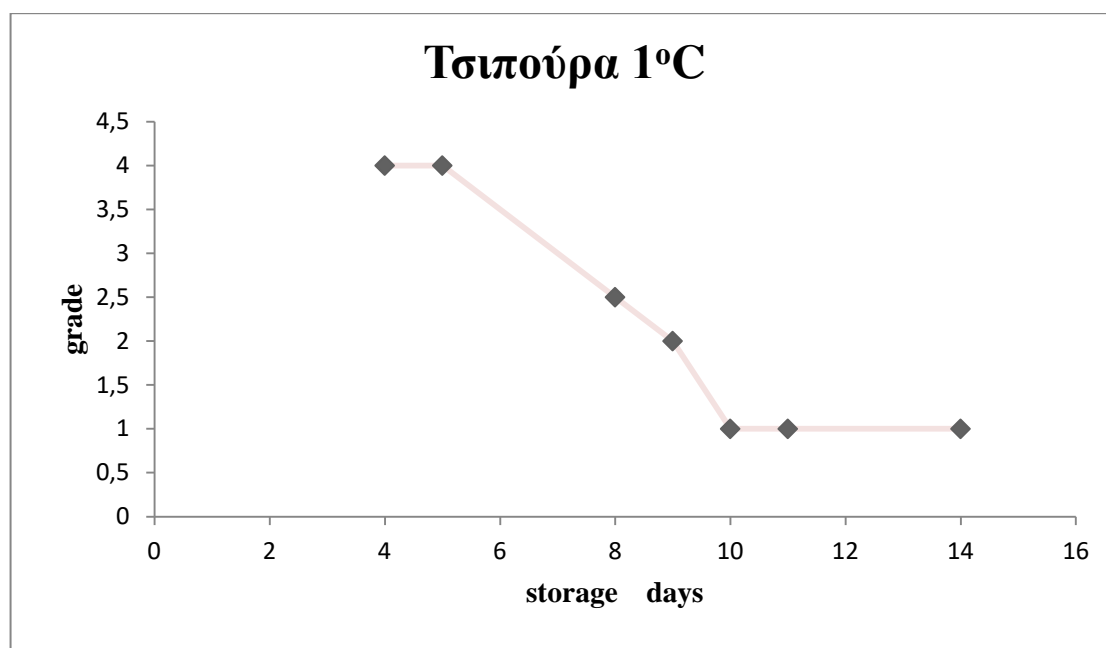


Σχήμα 1. Οργανοληπτική αξιολόγηση της τσιπούρας υπό συνθήκες 4°C.

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων τσιπούρας αποθηκευμένων στους 4 °C προσδιορίστηκε στις 6 ημέρες (144 h).

Αντίστοιχα, για τις τσιπούρες που αποθηκεύτηκαν στον 1 °C παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση έως την 4^η ημέρα (βαθμός 4), σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την

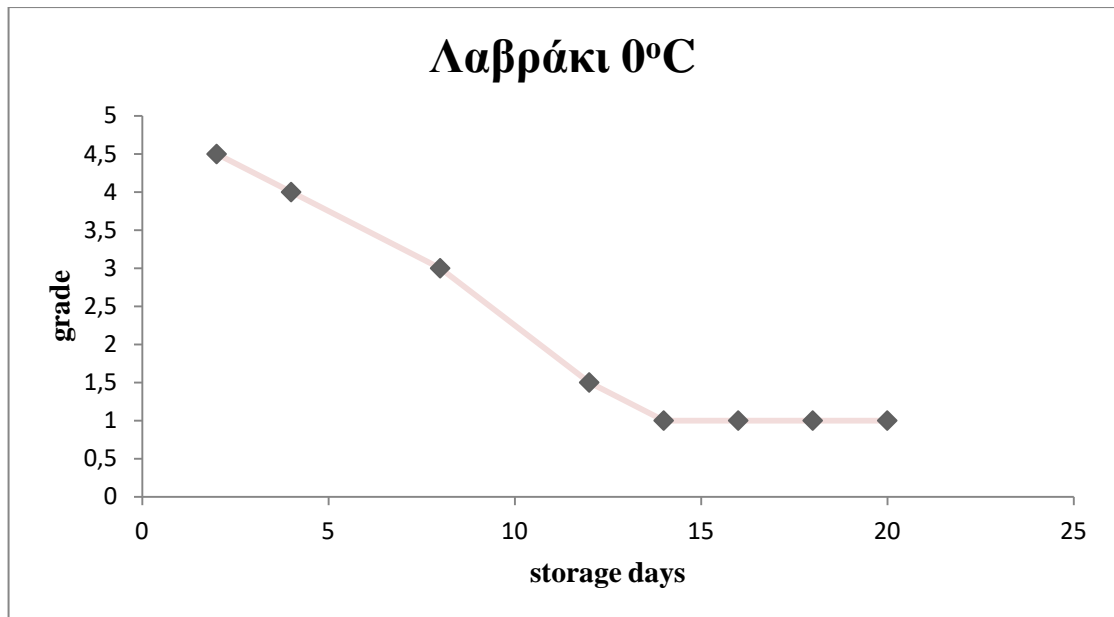
8^η ημέρα (βαθμός 3-2) και σε κατάσταση ‘υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό’ έως την 9^η ημέρα (βαθμός 2), ενώ έφτασε σε κατάσταση ‘απορριπτόμενο’ την 10^η ημέρα (βαθμός 1). Από την 11^η ημέρα το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως πλήρες αλλοιωμένο (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Οργανοληπτική αξιολόγηση τσιπούρας αποθηκευμένη στους 1°C.

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων τσιπούρας αποθηκευμένων στον 1 °C προσδιορίστηκε στις 10 ημέρες (240 h).

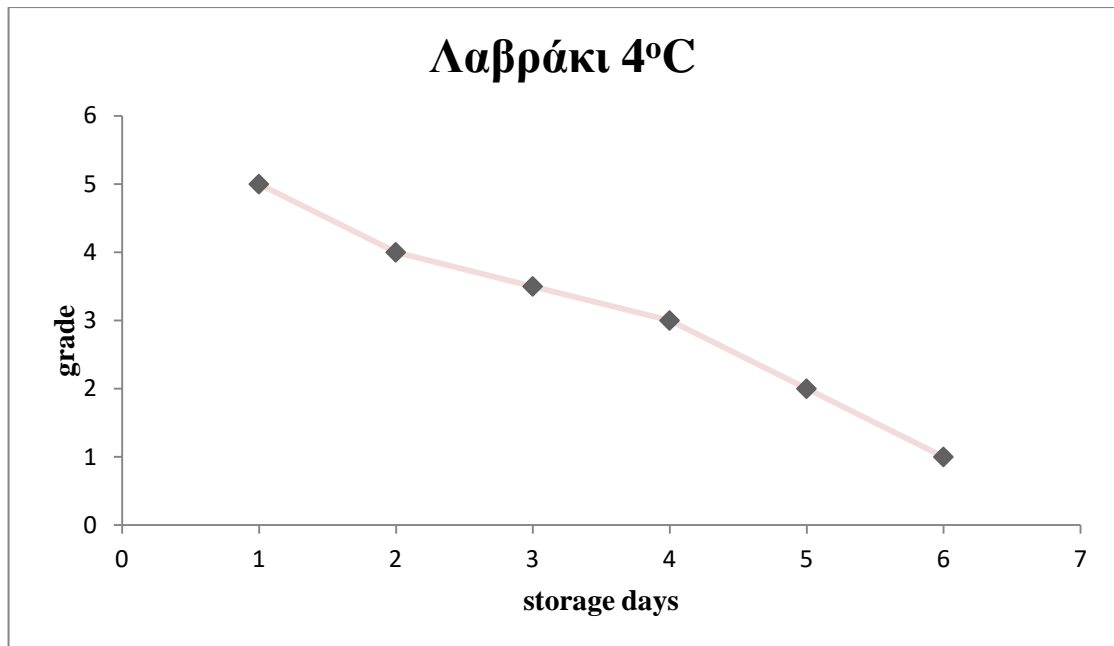
Εν συνεχεία, τα λαυράκια που αποθηκεύτηκαν στους 0 °C παρέμειναν σε ‘άριστη’ κατάσταση έως την 4^η ημέρα (βαθμός 4), σε κατάσταση ‘πολύ καλή’ έως την 8^η ημέρα (βαθμός 3-2) και σε κατάσταση ‘υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό’ έως την 12^η ημέρα (βαθμός 2), ενώ έφτασε σε κατάσταση ‘απορριπτόμενο’ την 14^η ημέρα (βαθμός 1). Από την 15^η ημέρα το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως πλήρες αλλοιωμένο (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Οργανοληπτική αξιολόγηση του λαυρακιού αποθηκευμένου στον πάγο (0oC) .

Έτσι, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων λαυρακιού αποθηκευμένων στον πάγο προσδιορίστηκε στις 14 ημέρες (336 h).

Τέλος, τα λαυράκια που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρέμειναν σε ‘άριστη’ κατάσταση έως την 2^η ημέρα (βαθμός 4), σε κατάσταση ‘πολύ καλή’ έως την 4^η ημέρα (βαθμός 3-2) και σε κατάσταση ‘υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό’ έως την 5^η ημέρα (βαθμός 2), ενώ έφτασε σε κατάσταση ‘απορριπτόμενο’ την 6^η ημέρα (βαθμός 1). Από την 7^η ημέρα το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως πλήρες αλλοιωμένο (**Σχήμα 4**).

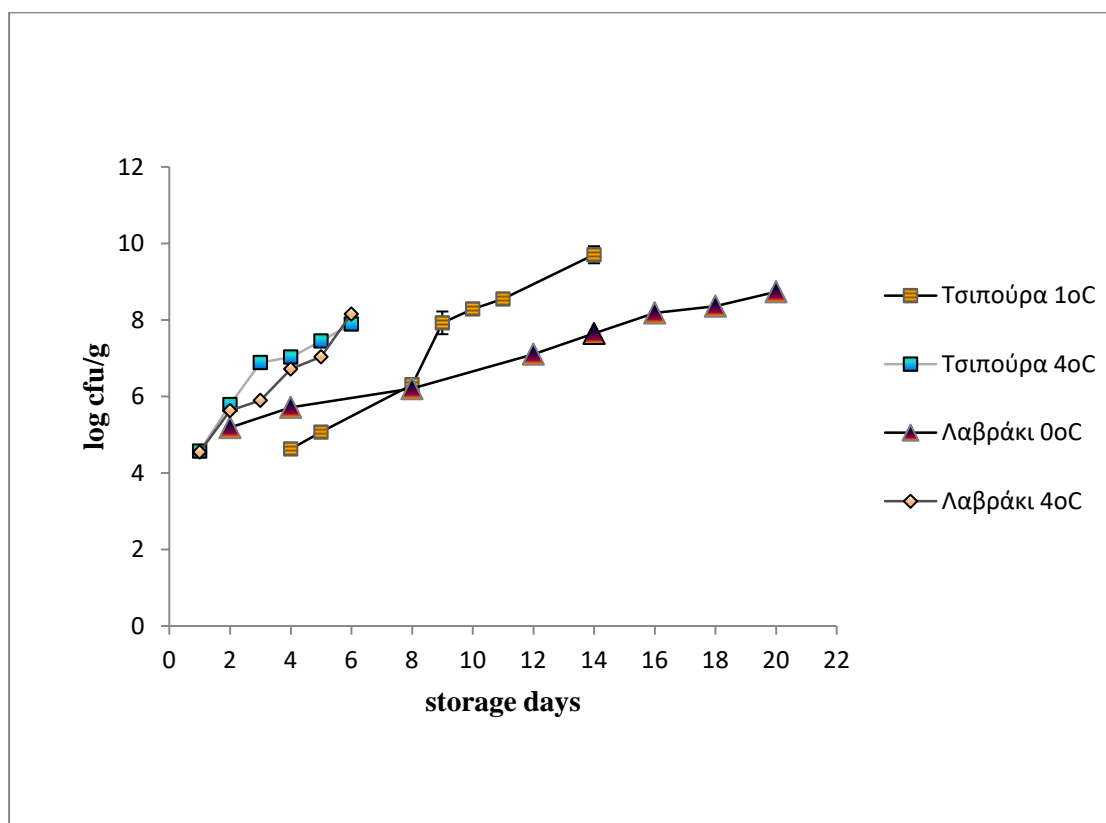


Σχήμα 4. Οργανοληπτική αξιολόγηση του λαυρακιού αποθηκευμένου στους 4°C.

3.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Η απαρίθμηση του πληθυσμού σε TSA έδωσε ποσοτικά καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τους πληθυσμούς που απαριθμήθηκαν στα άλλα δύο υλικά (IA, PCA). Για το λόγο αυτό, ελήφθησαν υπόψη οι πληθυσμοί της OMX οι οποίοι απαριθμήθηκαν στο θρεπτικό υλικό TSA. Στο **Σχήμα 5** παρουσιάζονται οι μεταβολές της OMX στη σάρκα των ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες συντήρησης. Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, υπάρχει υψηλότερη τιμή της OMX και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, στους ιχθύες που αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Στη μεν τσιπούρα η τιμή της OMX στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζώης άγγιξε τους 7,9 log cfu/g, στο μεν λαυράκι η τιμή ξεπέρασε τους 8 log cfu/g στο τέλος του εμπορικού χρόνου. Επιπλέον, για τους ιχθύες τσιπούρας που αποθηκεύτηκαν στον 1 °C η τιμή της OMX έφτασε τους 8 log cfu/g

την 10¹¹ ημέρα, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το λαυράκι αποθηκευμένο στον πάγο ήταν 7 log cfu/g στο πέρας του εμπορικού χρόνου ζωής.



Σχήμα 5. Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX σε θρεπτικό υλικό TSA σε τσιπούρες αποθηκευμένες στους 1 & 4 °C και λαυράκια αποθηκευμένα στους 0 & 4 °C).

3.3 Μέτρηση DNA από σάρκα ιχθύων

Μετά την εξαγωγή του DNA μετρήθηκε τόσο η ποσότητα (ng/μl) όσο και η καθαρότητα (260/280) με τη χρήση του nanodrop. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακα 3. Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητα ολικού DNA από σάρκα ιχθύων

Δείγματα ιστών - Zymo Kit		
N. Δειγματα	ng/μl	260/280
1	11,1	2,06
2	46,7	1,96
3	27,3	1,86
4	31,8	2,1
5	30,6	1,95
6	45,9	1,9
7	62,3	1,73
8	43,9	1,82
9	31	2,06
10	43,6	1,74
11	43,6	1,79
12	30,6	1,77
13	4,3	2,63
14	43,3	1,72
15	4,2	2,22
16	65,7	1,81
17	5,5	1,44
18	13,7	1,24
14'	30,1	1,8
15'	9,7	1,4
16'	31,1	1,37
17'	13,6	1,25
18'	33,3	1,62
19	39,8	1,89
20	23,6	1,86
21	51,2	1,97
22	53,9	1,86
23	43,1	1,88

3.4 Μέτρηση DNA από καθαρές καλλιέργειες

Μετά την εξαγωγή DNA μετρήθηκε τόσο η ποσότητα (ng/μl) όσο και η καθαρότητα του (260/280) με τη χρήση του nanodrop. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.























Πίνακα 4. Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητα ολικού DNA από καθαρές καλλιέργειες

Δείγματα καθαρών καλλιεργειών - Zymo Kit		
N. Δειγματα	ng/μl	260/280
2''	4,1	2,4
3''	6,8	1,8
4''	6,3	1,7
5''	9,5	1,8
6''	8	2,2
7''	12,4	1,9
8''	10,2	2,1
9''	5,1	1,75
2'	5,4	1,69
3'	4,9	2,19
4'	9,7	1,93
5'	5,3	1,14
6'	7,4	1,87
7'	13	1,16
8'	5	1,8
9'	29,3	1,7
Mix	53,6	1,8

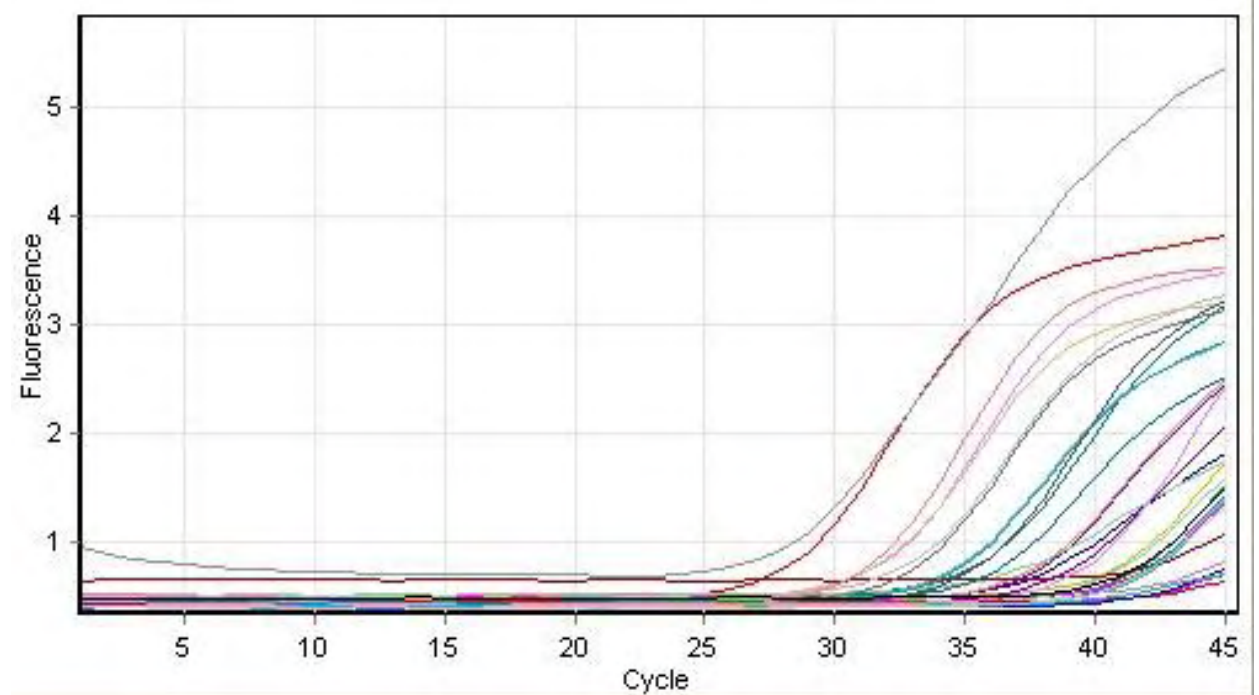
3.5 Αξιολόγηση του βακτηριακού DNA με Real time PCR

Στον **πίνακα 5** και στις **εικόνες 15-16** παρουσιάζονται οι τιμές Ct (ο κύκλος κατά τον οποίο το προϊόν τέμνει το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο - γραμμή Threshold) οι οποίες αντιστοιχούν σε καθαρές καλλιέργειες και σάρκα ιχθύων, τσιπούρας και λαβρακιού, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διάφορες συνθήκες.

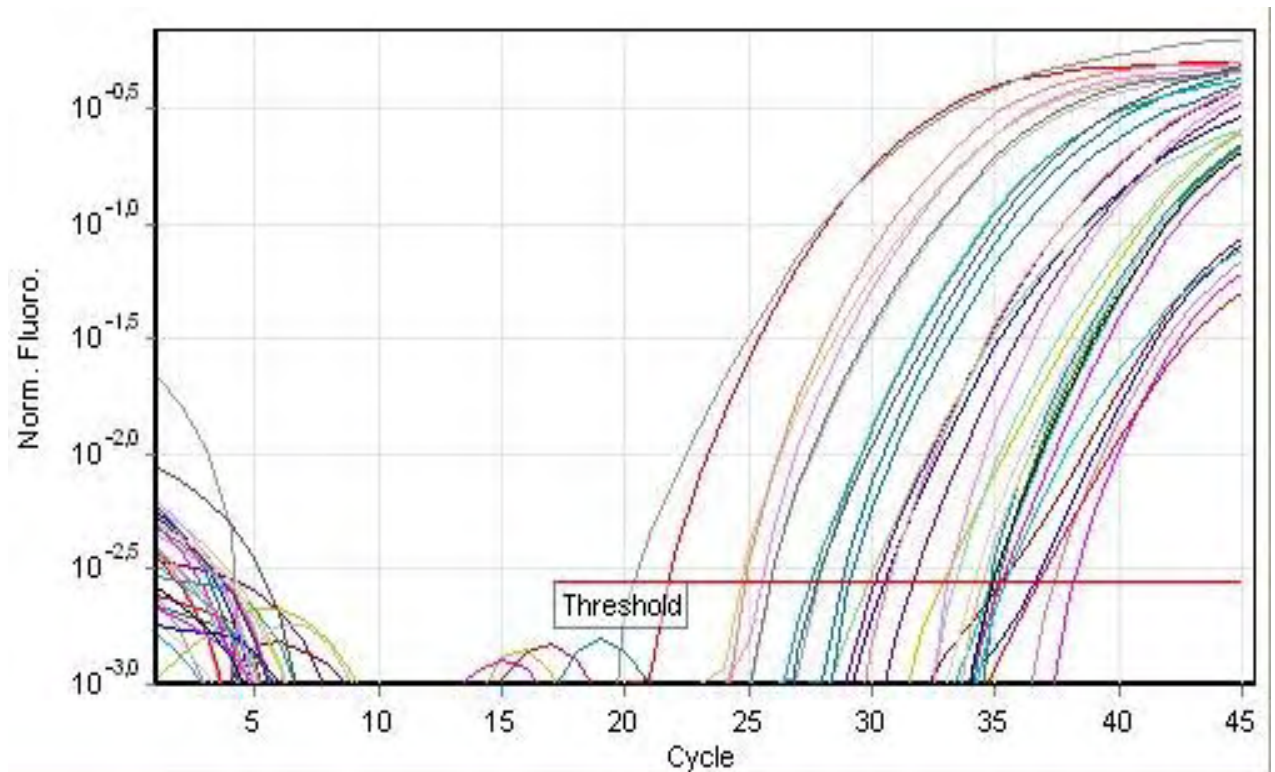
Πίνακας 5. Τιμές Ct των προϊόντων βακτηριακού DNA από καθαρές καλλιέργειες και σάρκα ιχθύων, τσιπούρας και λαβρακιού, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διάφορες συνθήκες.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1		1	Τσιπούρα, ημέρα 4, 1°C	21,70
2		2	Τσιπούρα, ημέρα 5, 1°C	32,81
3		3	Τσιπούρα, ημέρα 8, 1°C	30,47
4		4	Τσιπούρα, ημέρα 9, 1°C	30,10
5		5	Τσιπούρα, ημέρα 10, 1°C	25,43
7		7	Τσιπούρα, ημέρα 14, 1°C	28,76
8		8	Τσιπούρα, ημέρα 1, 4°C	30,62
9		9	Τσιπούρα, ημέρα 2, 4°C	35,08
10		10	Τσιπούρα, ημέρα 3, 4°C	38,13
12		12	Τσιπούρα, ημέρα 5, 4°C	34,87
13		13	Τσιπούρα, ημέρα 6, 4°C	24,60
14		14	Λαβράκι, ημέρα 2, 0°C	29,84
15		15	Λαβράκι, ημέρα 4, 0°C	33,27
16		16	Λαβράκι, ημέρα 8, 0°C	27,83
19		19	Λαβράκι, ημέρα 1, 4°C	37,34
20		20	Λαβράκι, ημέρα 2, 4°C	35,25
23		23	Λαβράκι, ημέρα 5, 4°C	27,53
24		24	Λαβράκι, ημέρα 6, 4°C	29,07
28		17'	Λαβράκι, ημέρα 12, 0°C	34,07
29		18'	Λαβράκι, ημέρα 20, 0°C	25,79
30		mix	Μείγμα καθαρών καλλιιεργειών	20,33
31		9"	Καθαρή καλλιέργεια	25,77

No.	Colour	Name	Type	Ct
32	■	9'	Καθαρή καλλιέργεια	27,76
33	■	8"	Καθαρή καλλιέργεια	36,76
35	■	7"	Καθαρή καλλιέργεια	36,61
36	■	7'	Καθαρή καλλιέργεια	31,62
37	■	6"	Καθαρή καλλιέργεια	33,00
38	■	6'	Καθαρή καλλιέργεια	34,75
40	■	5'	Καθαρή καλλιέργεια	24,77
42	■	4'	Καθαρή καλλιέργεια	35,27
43	■	3"	Καθαρή καλλιέργεια	34,90
44	■	3'	Καθαρή καλλιέργεια	35,42
45	■	2"	Καθαρή καλλιέργεια	36,42



Εικόνα 15. Καμπύλες καμπύλες πολλαπλασιασμού του προϊόντος (amplification curves) από καθαρές καλλιέργειες και σάρκα ιχθύων, τσιπούρας και λαβρακιού, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διάφορες συνθήκες.



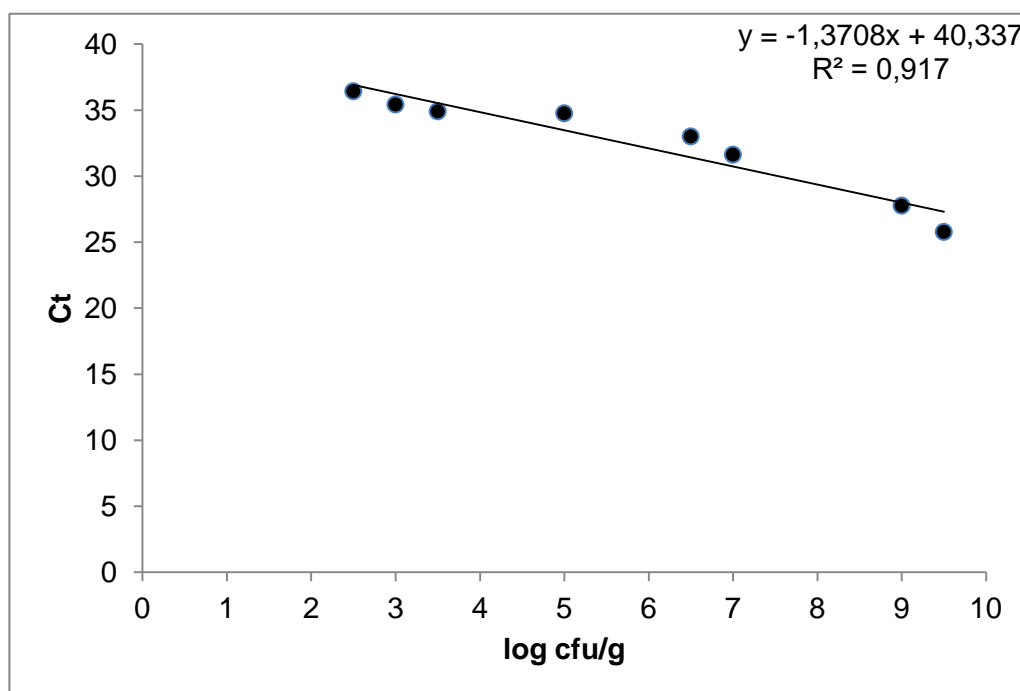
Εικόνα 16. Καμπύλες πολλαπλασιασμού του προϊόντος (amplification curves) βακτηριακού DNA από καθαρές καλλιέργειες και σάρκα ιχθύων, τσιπούρας και λαβρακιού, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διάφορες συνθήκες, με οριοθέτηση του σημείου threshold και της τιμή Ct.

Το χρώμα στο οποίο αντιστοιχεί το κάθε δείγμα φαίνεται στον Πίνακα 6. Τα προϊόντα του βακτηριακού DNA που αντιστοιχούν στα δείγματα των καθαρών καλλιεργειών μεγάλης αραιώσης παρουσίασαν Ct υψηλότερο σε σχέση με εκείνα που αντιστοιχούν στις μικρότερες αραιώσεις, ενώ το μείγμα των καλλιεργειών παρουσίασε την μικρότερη τιμή Ct. Για παράδειγμα το δείγμα 3' παρουσίασε Ct κοντά 35,42 ενώ το αντίστοιχο στο 6' ήταν 34,75 (Πίν. 6, Εικ. 15&16). Αντίθετα, οι καλλιέργειες μειωμένης ή καθόλου αραιώσεως βρέθηκαν να έχουν χαμηλή τιμή του Ct. Ενδεικτικά, το μείγμα των καλλιεργειών παρουσίασε τιμή κύκλου ct στο 20,33, ενώ η αμέσως επόμενη αραιώση (9'') είχε τιμή κοντά στο 25,77 με το 7' να φτάνει το 31,62. Αντίστοιχα για τα δείγματα από την σάρκα των ιχθύων, σύμφωνα με την τιμή Ct, η ποσότητα του βακτηριακού DNA φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα δείγματα

7,13,18 και 24 τα οποία αντιστοιχούν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, σε σχέση με τα δείγματα 2,9,15 και 19 τα οποία αντιστοιχούν στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, των ιχθύων. Ενδεικτικά, η τιμή του Ct για το δείγμα 7 ήταν 27,76, ενώ για το δείγμα 2 ήταν 32,81.

3.6 Δημιουργία καμπύλης αναφοράς (Standard curve)

Η καμπύλη αναφοράς (**Σχήμα 6**) δημιουργήθηκε με παραμέτρους τους κύκλους Ct και τους αντίστοιχους πληθυσμούς της OMX (σε logs) που περιέχονταν στο κάθε δείγμα (καλλιέργεια) πριν την απομόνωση DNA. Οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα στη συγκεκριμένη έρευνα ώστε να γίνει δυνατή η εκτίμηση της ποιοτικής κατάστασης/σταδίου αλλοίωσης πραγματικών τροφίμων (ιχθύες της τσιπούρας και του λαυρακιού).



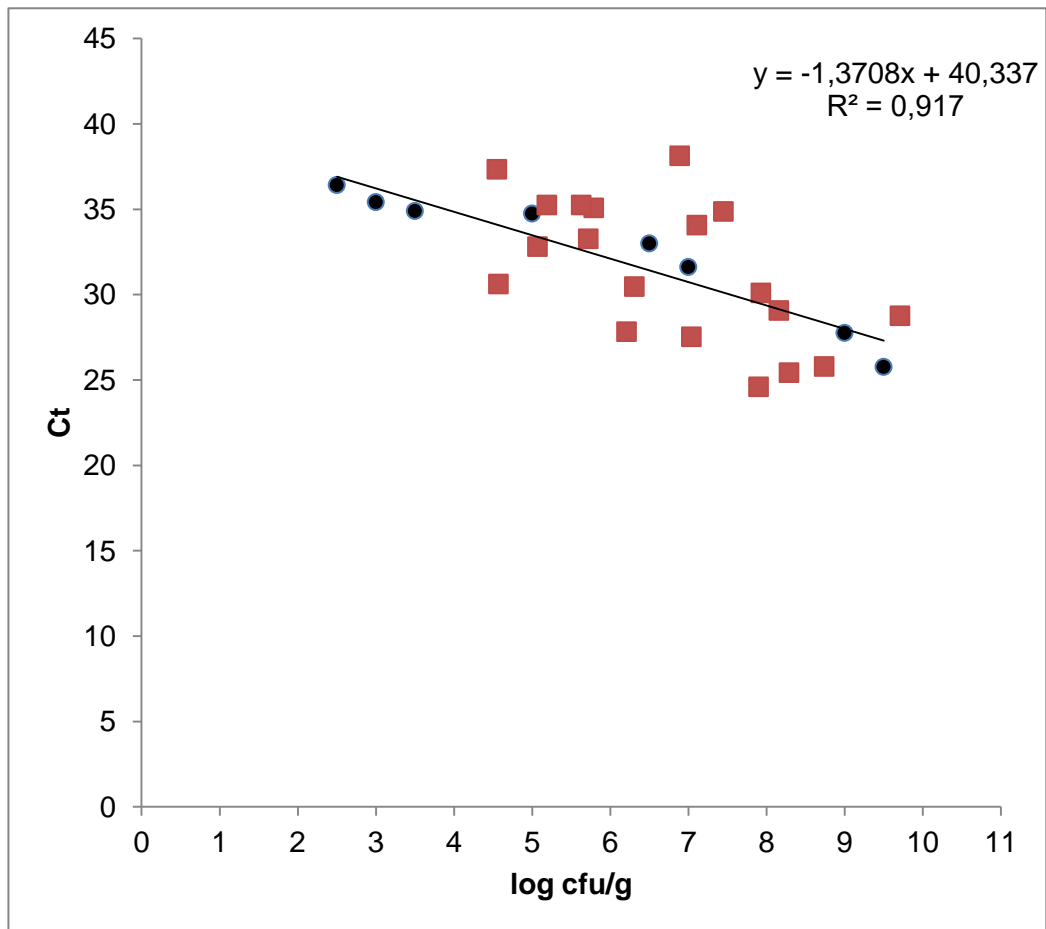
Σχήμα 6 Καμπύλη αναφοράς των Ct και logs από καθαρές καλλιέργειες

Η καμπύλη αναφοράς με $R^2 = 0,917$ δείχνει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων Ct και logs.

3.7 Τιμές Ct vs logs από δείγματα ιχθύων

Στο **σχήμα 7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με τη χρήση της ποσοτικής PCR των καθαρών καλλιιεργειών καθώς και των δειγμάτων ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού,.

Επίσης στον **πίνακα 8** παρουσιάζονται οι τιμές των δειγμάτων με βάση α) τους λογαρίθμους που προέκυψαν από την μέτρηση των βακτηρίων σε τρυβλίο, β) τους κύκλους Ct που προέκυψαν από την εφαρμογή της qPCR, και γ) το στάδιο αλλοίωσης σύμφωνα με την οργανοληπτική ανάλυση. Επιπλέον, υπάρχει και μία στήλη η οποία περιγράφει ποιο θα ήταν το αναμενόμενο αποτέλεσμα όσο αναφορά το στάδιο αλλοίωσης, με βάση τις τιμές του Ct.



Σχήμα 7 Ανάλυση των ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού. Με τον μαύρο κύκλο απεικονίζονται τα σημεία της πρότυπης καμπύλης, ενώ με το κόκκινο τετραγώνκι απεικονίζονται τα δείγματα ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 6) παρουσιάζονται οι πραγματικές και οι εκτιμώμενες βάση της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 6) τιμές του πληθυσμού της OMX των ιχθύων (logs) και η οργανοληπτική αξιολόγηση.

Πίνακας 6 Πραγματικές (observed) με απαρίθμηση σε τρυβλία και εκτιμώμενες (predicted) βάση της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης τιμές πληθυσμού της OMX (σε logs) καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματική και εκτιμώμενη*, κατά τη διάρκεια συντήρησης τσιπούρας και λαυράκιου.

Samples	Ct	logs		Οργανοληπτική αξιολόγηση	
		Πραγματικές	Εκτιμώμενες	Πραγματική	Εκτιμώμενη
2	32,81	5,07	5,49	Πολύ καλό	Πολύ καλό
3	30,47	6,31	7,20	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό
4	30,1	7,93	7,47	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό
5	25,43	8,29	10,87	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό
7	28,76	9,71	8,45	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό
8	30,62	5,57	7,09	Μέτριο	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό
9	35,08	4,79	3,83	Μέτριο	Πολύ καλό
10	38,13	6,89	1,61	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό	Άριστο
12	34,87	7,45	4,00	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό	Μέτριο
13	24,6	7,9	11,48	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό
14	35,25	5,19	3,71	Πολύ καλό	Πολύ καλό
15	33,27	5,72	5,16	Πολύ καλό	Πολύ καλό
16	27,83	6,21	9,12	Μέτριο	Μη αποδεκτό
17	34,07	7,11	4,57	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό	Πολύ καλό
18	25,79	8,74	10,61	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό
19	37,34	3,55	2,19	Πολύ καλό	Άριστο
20	35,25	5,63	3,71	Πολύ καλό	Άριστο
23	27,53	7,04	9,43	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό	Μη αποδεκτό
24	29,07	8,16	8,22	Μη αποδεκτό	Μη αποδεκτό

* Η εκτιμώμενη οργανοληπτική αξιολόγηση προσδιορίστηκε βάση του πληθυσμού της OMX και του οργανοληπτικού σκορ πραγματικής οργανοληπτικής αξιολόγησης των ιχθύων όταν ο εκτιμώμενος πληθυσμός της OMX συμβάδιζε ή ήταν ίδιος με τον πραγματικό. Για παράδειγμα, όταν ο εκτιμώμενος πληθυσμός ήταν 5,49 log cfu/g, η εκτιμώμενη

οργανοληπτική κατάσταση υπολογίζονταν από το ποια ήταν η πραγματική οργανοληπτική κατάσταση του ιχθύος όταν ο πραγματικός πληθυσμός ήταν περίπου 5,49 log cfu/g.

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, βάση των τιμών Ct, οι πραγματικές (observed) και εκτιμώμενες (predicted) τιμές βρέθηκαν να είναι παρόμοιες όσον αφορά την OMX (απόκλιση της τάξης του 0,5-1,5 log) και την οργανοληπτική αξιολόγηση (ίδιος ή παρόμοιος χαρακτηρισμός) στην πληθώρα των δειγμάτων. Στα δείγματα 2,3,4,5,7,8,9,14,15,18,19,20 και 24, βρέθηκε να μην υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις (0,5-1,5 log) μεταξύ των πραγματικών και των εκτιμώμενων τιμών. Ακόμα και στην περίπτωση του δείγματος 13, όπου η εκτιμώμενη (11,48 logs) τιμή της OMX υπολογίσθηκε να είναι 2,5 logs μεγαλύτερη σε σχέση με την πραγματική (7,90 logs), το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως 'Μη αποδεκτό' βάση της πραγματικής και εκτιμώμενης οργανοληπτικής αξιολόγησης. Ωστόσο, σε κάποια δείγματα (10,12,16,17,23) υπήρχε πολύ μεγάλη απόκλιση μεταξύ πραγματικής και εκτιμώμενης τιμής ή χαρακτηρισμού. Για παράδειγμα, ο εκτιμώμενος πληθυσμός της OMX στο δείγμα 10 με τιμή Ct 38,13, υπολογίσθηκε σε 1,61 log και χαρακτηρίστηκε ως άριστο. Αντί αυτού, από την μικροβιολογική ανάλυση προέκυψε πληθυσμός που άγγιξε τους 6,89 log cfu/g και οργανοληπτικά το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό με βαθμό 2.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία σκοπός ήταν η συσχέτιση των τιμών Ct που προκύπτουν από την qPCR με τις τιμές των λογαρίθμων που προκύπτουν από καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά, και ο προσδιορισμός του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (ή Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα-OMX) με qPCR, κατά τη διάρκεια συντήρησης τσιπούρας και λαβρακιού ελληνικής υδατοκαλλιέργειας.. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού πραγματοποιήθηκε δημιουργία πρότυπης καμπύλης, παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών της OMX με απαρίθμηση σε θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης TSA καθώς και απομόνωση DNA από τους ιχθύες και τις καθαρές καλλιέργειες. Το TSA αποδείχθηκε για ακόμα μία φορά ποσοτικά αποτελεσματικότερο από τα άλλα δύο θρεπτικά υλικά (IA, PCA) που μελετήθηκαν, πράγμα που συμφωνεί και με άλλα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας (Kakasis et al. 2011) και άλλων ερευνητών (Valle et al. 2008). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως το βασικό υλικό απαρίθμησης της OMX για την συσχέτιση με τα αποτελέσματα της qPCR στην παρούσα μελέτη.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ποσοτικής PCR, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς ($R^2 = 0.917$), χρησιμοποιώντας ως πρότυπα τις καθαρές καλλιέργειες. Από το σύνολο των δειγμάτων ιχθύων που εξετάστηκαν (20), μόνο πέντε δείγματα (10,12, 16,17, 23), βάση της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης, έδωσαν εκτιμώμενα αποτελέσματα που απέκλιναν αρκετά από τις πραγματικές μετρήσεις. Το εύρημα αυτό πιθανόν να οφείλεται στα σφάλματα δειγματοληψίας ή σε ανεπιτυχή εκχύλιση ή/και εξαγωγή του DNA στα συγκεκριμένα δείγματα ή ακόμα και στην απαίτηση για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Η ποιοτική κατάσταση/στάδιο αλλοίωσης του κάθε ιχθύος προσδιορίστηκε επιτυχώς (με πολύ μικρές αποκλίσεις των εκτιμώμενων

αποτελεσμάτων - logs σε σχέση με τις πραγματικές τιμές, ενώ σχεδόν καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της πραγματικής και της εκτιμούμενης οργανοληπτικής αξιολόγησης) στα υπόλοιπα 15 δείγματα. Πράγματι, πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του Ct και της OMX ($R^2 = 0.99$) έχει αναφερθεί σε φιλέτα μπακαλιάρου από άλλους ερευνητές (Lee & Levin, 2007). Οι παραπάνω ερευνητές κατάφεραν επιπλέον να ξεχωρίσουν τα ζωντανά κύτταρα της OMX από τα νεκρά χρησιμοποιώντας ethidium bromide monoazide. Ωστόσο, δεν βρήκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην ποσοτικοποίηση της OMX είτε περιλάμβαναν τα νεκρά κύτταρα στην ανάλυση ή όχι. Εκτός της ποσοτικοποίησης της OMX, έχουν γίνει προσπάθειες ποσοτικοποίησης των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών όπως *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *thermosphacta*, *Photobacterium phosphoreum* και των βακτηρίων που παράγουν TMA εξάγοντας DNA απευθείας από τη σάρκα σολομού (Reynisson et al., 2008), μαγειρεμένης γαρίδας και σολομού σε MAP (Mamlouk et al., 2012), νωπού σολομού σε MAP (Macé et al., 2013) και μπακαλιάρου της Μεσογείου (Duflos et al. 2010), αντίστοιχα. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του Ct και των EAM.

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αξία της qPCR ως ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων οργανισμών στα τρόφιμα. Οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε ευρείες κατηγορίες με βάση ορισμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, αλλά μόνο σε λίγες περιπτώσεις αυτά τα χαρακτηριστικά σχετίζονται με τα προβλήματα αλλοίωσης που προκαλούν. Αυτές οι ομάδες περιλαμβάνουν ζύμες και μούχλες, Gram-αρνητικά βακτήρια (π.χ., *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*), Gram-θετικά βακτήρια (π.χ., *Bacillus* και *Clostridium spp.*), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ., *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus spp.*), άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια

(π.χ., *Brochothrix thermosphizucta*, *Micrococcus*.) και βακτηριοφάγους. Η qPCR έχει προταθεί ως ένα μέσο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μερικών από τις ομάδες αυτές, όπως ζύμες και μούγλες (Casey & Dobson, 2004), αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και μερικά γένη που αναφέρονται ως ευκαιριακά παθογόνοι. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του φύλλου των Firmicutes (Haakensen et al. 2008), για θερμόφιλους βακίλους (Rueckert et al. 2006), για αυστηρά αναερόβια βακτήρια της τάξης Clostridia (Juvonen et al. 2008), για οξυγαλακτικά βακτήρια (Haakensen et al. 2007), για τους Gram-αρνητικά παραγωγούς ισταμίνης σε αλιευτικά προϊόντα (Bjornsdottir-Butler et al., 2011), για τα στελέχη που παράγουν τυραμίνη (Ladero et al. 2010) και για βακτηριοφάγους που συμμετέχουν στην αλλοίωση των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (Martin et al. 2008).

Αρκετές μέθοδοι που βασίζονται στην qPCR είναι επίσης διαθέσιμες για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός αριθμού βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των επιπέδων υγιεινής κατά την παραγωγή τροφίμων (Jay et al. 2003). Βιοδείκτες είναι μικροοργανισμοί, ή ομάδες των μικροοργανισμών, των οποίων η παρουσία σε δεδομένο αριθμό αποτελεί ένδειξη αλλοίωσης των τροφίμων. Για παράδειγμα οι *Pseudomonas* είναι ψυχρότροφα βακτήρια που εμπλέκονται ιδιαίτερα στην αλλοίωση των τροφίμων που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, και χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτης (Jay et al. 2003).

Άλλες εφαρμογές της qPCR έχουν αναπτυχθεί για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων και ποτών, όπως στα γαλακτοκομικά ή στη ζύμωση κρέατος (Martin et al. 2006) και στη ζύμη για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών (Martorell et al., 2005). Παρ' όλα αυτά, αυτή η μέθοδος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε

καταστάσεις στις οποίες η παρουσία των εν λόγω μικροοργανισμών είναι ανεπιθύμητη, όπως για παράδειγμα, η παρουσία της μαγιάς σε πολλά τρόφιμα (Jespersen & Jakobsen, 1996). Υπάρχουν πλέον αρκετές αναλύσεις qPCR όπου έχουν ανιχνευθεί και ποσοτικοποιηθεί τα στελέχη που παράγουν BAS σε διάφορα τρόφιμα (Fernandez et al. 2006, Ladero et al. 2010, Nannelli et al. 2008, Torriani et al, 2008).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων τσιπούρας και λαυρακιού με οργανοληπτική ανάλυση στις διάφορες συνθήκες συντήρησης. Έτσι, βρέθηκε ότι η διάρκεια ζωής της τσιπούρας και του λαυρακιού υπό συνθήκες 4°C ήταν 6 ημέρες (144h), με την τιμή της OMX την ημέρα εκείνη να αγγίζει τους 7,93 και 8,16 log cfu/g, αντίστοιχα. Αντιθέτως, στα λαυράκια που αποθηκεύτηκαν στον πάγο και τις τσιπούρες που συντηρήθηκαν στον 1°C, ο εμπορικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε στις 14 (336h) και 10 (240h) ημέρες αντίστοιχα, με την OMX να φτάνει στο μεν λαυράκι τα 7,65 log cfu/g, στη δε τσιπούρα τα 8,29 log cfu/g. Πράγματι, έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες ότι ο εμπορικός χρόνος σε ιχθύες λαυρακιού, αποθηκευμένους υπό αερόβιες συνθήκες στον πάγο (0 °C), ήταν 12 έως 13 ημέρες (Taliadourou et al. 2003). Επιπλέον η διάρκεια ζωής ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (meltingice, 0 °C), ήταν 17 ημέρες (Kyra et al. (1997), Επίσης, το όριο αποδοχής ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 °C), ήταν 17 έως 18 ημέρες (Alasalvar et al. 2001), ενώ ο χρόνος απόρριψης για ολόκληρους ιχθύες λαυρακιού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες πάγου (0 °C), προσδιορίστηκε στις 15 ημέρες (Kyra & Lougonois 2002).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την συγκεκριμένη έρευνα προκύπτει ότι η χρήση της qPCR για την διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού στα αλιεύματα είναι επιτυχής, και έχει πολλά περιθώρια βελτίωσης, αφού πρώτα βελτιωθούν κάποιες παράμετροι (π.χ. δειγματοληψία ιστών, εκχύλιση ή/και εξαγωγή DNA, χρήση μεγαλύτερης ποσότητας DNA στην ανάλυση). Ένα από τα πλεονεκτήματα της Real Time PCR έναντι των συμβατικών μεθόδων είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Η μέθοδος αυτή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση θεμάτων σχετικά με την ποιότητα των τροφίμων και την ασφάλειά τους και προσφέρεται για την επαλήθευση της εφαρμογής των κανονισμών σήμανσης καθώς και για την εξασφάλιση της προστασίας του καταναλωτή.

Η qPCR έχει αποδείξει τη χρησιμότητά της στη βασική μικροβιολογική έρευνα. Η ικανότητά της να ενισχύει νουκλεϊνικά οξέα σε ένα ευρύ φάσμα δειγμάτων την κατατάσει ως ένα ιδανικό σύστημα για χρήση σε διάφορες μικροβιολογικές επιστήμες (Mackay, 2004). Όσο αναφορά την μικροβιολογία και την ασφάλεια των τροφίμων, έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον (Hanna et al., 2005) και διάφορα εμπορικά πακέτα έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί ως μέθοδοι για τον εντοπισμό της μικροβιακής οικολογίας των τροφίμων (Makino et al., 2010). Για την ποσοτικοποίηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών όπως ευελιξία, ταχύτητα, εγκυρότητα. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών με

συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους διαρκεί ημέρες, αλλά με την qPCR αυτό μπορεί να γίνει μέσα σε λίγες ώρες. Αυτά και άλλα πολλά, κάνουν αυτή την τεχνική ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ασφάλειας και της ποιότητας των προϊόντων διατροφής.

Συμπερασματικά μέσω της Real Time PCR είναι εφικτός ο προσδιορισμός της ποιότητας/σταδίου αλλοίωσης των ιχθύων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους, γεγονός που οδηγεί στην ταχύτερη, πιο αξιόπιστη και πιο αναπτυγμένη επιστήμη της μικροβιολογίας των τροφίμων. Ωστόσο, οι τεχνικές δειγματοληψίας ιστού ή/και εκχύλισης ή/και εξαγωγής DNA θα πρέπει να βελτιωθούν έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η λήψη της πραγματικής συγκέντρωσης κυττάρων επομένως και DNA, πράγμα που θα οδηγεί με ακρίβεια στην ορθή εκτίμηση της ποιότητας/σταδίου αλλοίωσης των ιχθύων. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου στην ποσοτικοποίηση της OMX των τροφίμων θα βοηθήσει τη βιομηχανία τροφίμων να διεξάγει τις 'μικροβιολογικές αναλύσεις' σε 2-3 ώρες σε σχέση με τις 2-3 ημέρες που απαιτεί η κλασική μικροβιολογία!

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Έντυπη

- ❖ **Abolmatty, A., Vu, C., Oliver, J., Levin, R.E., 2000.** Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios 101*, 181–189.
- ❖ **Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006.** PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology 100* (2), 352-364.
- ❖ **Allen, D.G., Green, D.P., Bolton, G.E., Jaykus, L.A., Cope, W.G., 2005.** Detection and identification of histamine-producing bacteria associated with harvesting and processing mahi-mahi and yellow fin tuna. *J. Food Prot.* 68, 1676-1682.
- ❖ **Bjornsdottir-Butler, K., Bolton, G.E., Jaykus, L.A., McClellan-Green, P.D., Green, D.P., 2010.** Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 161-167.
- ❖ **Bjornsdottir, K., Bolton, G.E., McClellan-Green, P.D., Jaykus, L.A., Green, D.P., 2009.** Detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *J. Food Prot.* 72, 1987-1991.
- ❖ **Buling, A., A. Criado-Fornelio, G. Asenzo, D. Benitez, J. C. Barba- Carretero, and M. Florin-Christensen. 2007.** A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* JC. *Vet. Parasitol.* 147:16–25.
- ❖ **Butot, S., Putallaz, T., & Sanchez, G. (2007).** Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 186-192.

- ❖ **Casey, G. D., & Dobson, A. D. W. (2004).** Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice - a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 327-335.
- ❖ **Chai, T.C., Chen, C., Rosen, A., Levin, R.E., 1968.** Detection and incidence of specific spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of *P. Putrefaciens* and fluorescent pseudomonads on haddock fillets. *Journal of Applied Microbiology* 16, 1738–1741.
- ❖ **Cheng, Z., & Griffiths, M. W. (2003).** Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 66, 1343-1352.
- ❖ **Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A., & Rodr_iguez, J. M. (2009).** Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 523-528.
- ❖ **Connor, C. J., Luo, H., Gardener, B. B., & Wang, H. H. (2005).** Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. In juice products. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 229-235.
- ❖ **Corless, C.E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, E.B., Fox, A.J., 2000.** Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1747–1752.
- ❖ **Dalgaard, P., 1995.** Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packaged fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319–333.

- ❖ **Dalgaard, P., L. G. Munoz, and O. Mejlholm. 1998.** Specific inhibition of *Photobacterium phosphoreum* extends the shelf life of modified-atmosphere-packed cod fillets. *J. Food Prot.* 61:1191–1194.
- ❖ **Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010).** Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1977-1990.
- ❖ **Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., & Kenneth, J. (2010).** Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*, 354, 34-39.
- ❖ **Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., et al. (2003).** Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6597-6604.
- ❖ **Dos Santos, J. P., C. Iobbi-Nivol, C. Couillault, G. Giordano, and V. Me'jean. 1998.** Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J. Mol. Biol.* 284:421–433.
- ❖ **Dyer, R. B., Kendra, D. F., & Brown, D. W. (2006).** Real-time PCR assay to quantify *Fusarium graminearum* wild-type and recombinant mutant DNA in plant material. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 534-542.
- ❖ **Duflos, G., S. Degremont, S. Copin, J.-P. Dos Santos, G. Giordano, V. Me'jean, and P. Malle. 2002.** A new PCR method of characterizing seafood freshness, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 10:149–159.
- ❖ **Duflos, G., Theraulaz, L., Giordano, G., Mejean, V. & Malle P. (2010).** Quantitative PCR Method for Evaluating Freshness of Whiting (*Merlangius*

- merlangus*) and Plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Protection*, 73, 1344–1347.
- D’Urso, O.F., Poltronieri, P., Marsigliante, S., Storelli, C., Hernandez, M., Rodriguez- Lazaro, D., 2009.** A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology* 26 (3), 311-316.
- ❖ **Edwards, K., & Logan, J. (2009).** Performing real-time PCR. In J. Logan, K. Edwards, & N. Saunders (Eds.), *Real-time PCR. Current technology and applications*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
 - ❖ **Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009.** Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7), 1990-2001.
 - ❖ **Fernandez, M., Del Rio, B., Linares, M., Martin, M.C., Alvarez, M.A., 2006.** Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* 89, 3763-3769.
 - ❖ **Fischer, A., von Eiff, C., Kuczius, T., Omoe, K., Peters, G., & Becker, K. (2007).** A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Molecular Medicine*, 85, 461-469.
 - ❖ **Fitzmaurice, J., Glennon, M., Duffy, G., Sheridan, J.J., Carroll, C., Maher, M., 2004.** Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT1 and VT2 toxin genes in *E.coli* O157:H7. *Molecular and Cellular Probes* 18, 123–132.
 - ❖ **Fortin, N.Y., Mulchandani, A., Chen, W., 2001.** Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytical Biochemistry* 289, 281–288.

- ❖ **Gammon, K. S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S. J., Chandra, S., & Middleton, A. M. (2007).** Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 262-267.
- ❖ **Goarant, C., Merien, F., 2006.** Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *Journal of Microbiological Methods* 67 (1), 27-35.
- ❖ **Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., & Guillam_on, J. M. (2006).** Enumeration and detection of acetic acid bacteria by realtime PCR and nested PCR. *FEMS Microbioly Letters*, 254, 123-128.
- ❖ **Gram, L., Huss, H.H., 1996.** Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 121-137.
- ❖ **Grattepanche, F., Lacroix, C., Audet, P., Lapointe, G., 2005.** Quantification by realtime PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (4), 414-421.
- ❖ **Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D., 1994.** PCR Primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 335–351.
- ❖ **Haakensen, M., Dobson, C. M., Deneer, H., & Ziola, B. (2008).** Realtime PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 236-241.
- ❖ **Herman, L., 1997.** Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology* 14, 103–110.

- ❖ **Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdague, J.L., 2001.** Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of coldsmoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66 (3), 175-184.
- ❖ **Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J., 2010.** Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15), 5097-5104.
- ❖ **Juvonen, R., Koivula, T., & Haikara, A. (2008).** Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 162-169.
- ❖ **Klein, D., 2002.** Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8 (6), 257-260.
- ❖ **Ladero, V., Linares, D.M., Fernandez, M., Alvarez, M.A., 2008.** Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Res. Int.* 41, 1015-1019.
- ❖ **Lee, J.-L. & Levin, R.E. (2007).** Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 312–317.
- ❖ **Lee, Jung-Lim, Levin, Robert E., 2006.** Direct application of the polymerase chain reaction for quantification of total bacteria on fish fillets. *Food Biotechnology* 20, 287–298.
- ❖ **Levin, R.E., 2004.** The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology* 18, 97–133.

- ❖ **Ludwig, W., Schleifer, K.H., 2000.** How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Systematic and Applied Microbiology* 23, 556–562.
- ❖ **Macé, S., Mamlouk K., Chipchakova S., Prévost, H., Joffraud, J.-J., Dalgaard P., Pilet, M.-F. & Dousset, X. (2013b).** Development of a Rapid Real-Time PCR Method as a Tool To Quantify Viable *Photobacterium phosphoreum* Bacteria in Salmon (*Salmo salar*) Steaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2612–2619.
- ❖ **Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., 2004.** Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12), 7046-7052.
- ❖ **Mamlouk, K., Macé, S., Guilbaud, M., Jaffrès, E., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet, M. F. & Dousset, X. (2012).** Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. *Food Microbiology*, 30, 173-179.
- ❖ **Martin, B., Jofre, A., Garriga, M., Pla, M., Aymerich, T., 2006.** Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 6040-6048.
- ❖ **Martin, M. C., Martinez, N., del Rio, B., Ladero, V., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2010).** A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries. *Journal of Dairy Science*, 93, 860-867.
- ❖ **Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud- Funel, A., & Lucas, P. M. (2008).** Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 594-599.

- ❖ **Nocker, A., Cheung, C.Y., Kamper, A.K., 2006.** Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiology Methods* 67 (2), 310-320.
- ❖ **Nogva, H.K., Drømtorp, S.M., Nissen, H., Rudi, K., 2003.** Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 34, 804–813.
- ❖ **Oliveira, T.C., Barbut, S., Griffiths, M.W., 2005.** Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 104 (1), 105-111.
- ❖ **Pan, Y., Breidt Jr., F., 2007.** Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (24), 8028-8031.
- ❖ **Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F., 2009.** Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *International Journal of Food Microbiology* 134 (3), 230-236.
- ❖ **Parlapani F.F., Malouchos A., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (2014).** Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189, 153–163.
- ❖ **Parlapani F.F., Kormas K. Ar. & I.S. Boziaris (2015c).** Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream

fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 2386–2394

- ❖ **Parlapani F.F., Haroutounian S.A., Nychas G-J.E & I.S. Boziaris (2015a).** Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2°C. *Food Microbiology* 50, 44-53.
- ❖ **Parlapani F.F., Verdos G.I., Haroutounian S.A. & I.S. Boziaris (2015b).** The dynamics of *Pseudomonas* and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C. *Food Control* 55, 257-265.
- ❖ **Parlapani F.F. & I.S. Boziaris (2016).** Monitoring of spoilage status and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 553–559.
- ❖ **Parlapani F.F, Michailidou S., Pasentsis K., Argiriou A., Krey G., Boziaris I. S. (2016).** In preparation
- ❖ **Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D., 2011.** Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28 (5), 848-861.
- ❖ **Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L., 2008.** Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 121 (1), 99-105.
- ❖ **Reichert-Schwillinsky, F., Pin, C., Dzieciol, M., Wagner, M., Hein, I., 2009.** Stress- and growth rate-related differences between plate count and real-time PCR data during growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7), 2132-2138.

- ❖ **Reynisson, E., Lauzon, H.L., Magnusson, H., Oli Hreggvidsson, G., Marteinsson, V.T., 2008.** Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Journal of Environmental Monitoring* 10 (11), 1357-1362.
- ❖ **Rivas, B.D.L., Marcobal, A., Carrascosa, A.V., Munoz, R., 2006.** PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69, 2509-2514.
- ❖ **Rodriguez, O., Losada, V., Aubourg, P.S., Barros-Velazquez, J., 2004.** Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International* 37, 749–757.
- ❖ **Rodriguez-Lazaro, D., D’Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikononopoulos, J., 2005a.** Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *International Journal of Food Microbiology* 101 (1), 93-104.
- ❖ **Rodriguez-Lazaro, D., Jofre, A., Aymerich, T., Garriga, M., Pla, M., 2005b.** Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of pre-real-time PCR strategies. *Journal of Food Protection* 68 (7), 1467-1471.
- ❖ **Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L., 2005.** Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1018–1024.
- ❖ **Sheridan, G.E., Masters, C.I., Shallcross, J.A., MacKey, B.M., 1998.** Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1313–1318.

- ❖ **Skjerdal, O.T., Lorentzen, G., Tryland, I., Berg, J.D., 2004.** New method for rapid and sensitive quantification of sulphide-producing bacteria in fish from arctic and temperature waters. *International Journal of Food Microbiology* 93, 325–333.
 - ❖ **Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., Fujii, T., 2003.** Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2568-2579.
 - ❖ **Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D., Giraffa, G., 2009.** Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 32 (7), 514-521.
- Zhou, S., Hou, Z., Li, N., Qin, Q., 2007.** Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5), 1897-1906

6.2 Ηλεκτρονική

- ❖ <http://www.anetel.com> (http1)
- ❖ <http://www.seafoodhealthfacts.org> (http2)
- ❖ <http://www.fao.org> (http 3)
- ❖ <http://www.fda.gov> (http 4)

