

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ποιότητα και ασφάλεια Μυδιών»

Κωνσταντίνος Σπυράτος

ΒΟΛΟΣ 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 16248/1
Ημερ. Εισ.: 10/04/2017
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
664.94
ΣΠΥ

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

«Quality and Safety of Mussels»

Konstantinos Spyratos

VOLOS 2016

« Ποιότητα και ασφάλεια Μυδιών».

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής , Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Χρήστος Νεοφύτου**, Καθηγητής, Ιχθυολογία - Υδροβιολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Αγγελίδης Παναγιώτης**, Καθηγητής, Ιχθυολογία – Υδατοκαλλιέργειες – Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Κτηνιατρικής , Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλλαν να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Κ. Μποζιάρη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια του και τη διαρκή υποστήριξη του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Νεοφύτου Χρήστο και κ. Αγγελίδη Παναγιώτη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κα. Παρλαπάνη Φωτεινή για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά στην προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης τους κυρίους Κορομηλάς Σωτήρης και Αναγνωστόπουλο Δημήτριο για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλλοίωση κατά την συντήρηση των αλιευμάτων μπορεί να προκληθεί λόγω της δράσεως μικροοργανισμών, ενζύμων αλλά και χημικών αντιδράσεων οξειδωσης. Ωστόσο η μικροβιολογική αλλοίωση είναι ένας από τους πιο σημαντικότερους μηχανισμούς υποβάθμισης της ποιότητας στα νωπά αλιεύματα. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα είναι κυρίως αυτοί της αρχικής μικροχλωρίδας του τροφίμου και αυτοί οι οποίοι προέρχονται από επιμόλυνση (Huss 2000).

Η παρούσα διπλωματική εργασία , εστιάζεται σε μία πρώτη προσέγγιση στο θέμα της ποιότητας και της συντήρησης της σάρκας των μυδιών από την περιοχή των Κυμίνων Θεσσαλονίκης, η οποία πραγματοποιήθηκε α) με τη διερεύνηση της παρουσίας ή απουσίας του βακτηριδίου *E.coli* στην συσκευασμένη σάρκα μυδιών στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής τους και β) με τη διερεύνηση/παρακολούθηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της συντήρησης της συσκευασμένης σάρκας μυδιών σε θερμοκρασίες συντήρισης νωπών αλιευμάτων (2 °C και 5 °C). Για το λόγο αυτό μεταφέρθηκαν δείγματα από τη μυδοκαλλιέργεια Μαλιγιάννης Ιωάννης από τα Κύμινα Θεσσαλονίκης (*Mytilus galloprovincialis*) και για τα δύο μέρη του πειράματος όπου πάρθηκαν αρχικά μισοκέλυφος και σάρκα μυδιών σε εμπορική συσκευασία και μετέπειτα μόνο σάρκα μυδιών σε συσκευασίες αποστειρωμένου θαλασσινού νερού , αποστειρωμένου νερού και νερού με την προσθήκη κιτρικού οξέος περιεκτικότητας 2% w/v ρυθμισμένου σε pH 4,0. Και στις δυο περιπτώσεις τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε δυο θερμοκρασίες ψύξης (2 °C και 5 °C) .

Οι μικροβιολογικές πληθυσμιακές μεταβολές για την διερεύνηση της OMX , των οξυγαλακτικών, των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, των *Enterobacteriaceae*

και των *Pseudomonas spp.* και στις δύο φάσεις των πειραμάτων κατά τη διάρκεια τους, δεν είχαν μεγάλες διακυμάνσεις και κρίθηκαν φυσιολογικές για την κάθε μορφή που είχε το κάθε παρασκεύασμα. Η οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του εμπορικού χρόνου ζωής των δειγμάτων, ενώ η απουσία μεγάλης συγκέντρωσης του εντεροβακτηριδίου *E.coli* αποτελούσε θετικό στοιχείο για τα δείγματα της περιοχής. Συμπερασματικά ο εμπορικός χρόνος ζωής δεν ξεπερνά τις επτά ημέρες (d7) με μικρή εξαίρεση αυτή με την προσθήκη κιτρικού οξέος. Ωστόσο η σάρκα μυδιών γευστικά κρίνεται ακατάλληλη λόγω της όξινης γεύσης, υπάρχουν μικρές διαφορές στην επίδραση του προϊόντος έως προς την συντήρηση του στους 2 °C και 5 °C και ανιχνευτήκαν χαμηλά ποσοστά του εντεροβακτηριδίου *E.coli*.

Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στον εργαστηριακό χώρο Υγιεινής και Μικροβιολογίας Αλιευμάτων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο το Μάιο και τον Ιούνιο του 2014.

Λέξεις κλειδιά: *E.coli* , *Mytilus galloprovincialis* , ποιότητα και ασφάλεια οστρακοειδών, μικροβιολογικοί παράμετροι , εμπορικός χρόνος ζωής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Οστρακοειδή	1
1.2. Περιγραφή και μορφολογία του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2
1.3. Στοιχεία Μικροβιολογίας Αλιευμάτων	8
1.3.1 Μικροοργανισμοί και τρόφιμα	8
1.3.2. Στοιχεία μικροβιολογίας οστρακοειδών	10
1.3.3 Μικροβιολογία Μυδιών	13
1.3.4. Μικροβιολογία επεξεργασμένων μυδιών	14
1.3.5. Θερμική επεξεργασία μυδιών	15
1.4. Ποιοτικός Έλεγχος	17
1.4.1 Υγιεινή και ποιότητα των τροφίμων	17
1.4.2. Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας	18
1.4.2.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.)	20
1.4.2.2 Οικογένεια Enterobacteriaceae	21
1.4.2.3 Κολοβακτηριοειδή (coli forms)	22
1.5. Νομοθεσία	24
1.5.1 Υγιεινή Τροφίμων	24
1.5.2 Νομοθεσία για τα μύδια	31
1.6. Αντικείμενο και στόχοι της μεταπτυχιακής διατριβής	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1. Μύδια	33
2.2. Μικροβιολογική ανάλυση	34
2.2.1. Απαρίθμηση μικροοργανισμών	34

2.2.2. Μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν	35
2.2.3. Απαρίθμηση <i>E. coli</i>	36
2.3. Οργανοληπτική αξιολόγηση	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1. Σάρκα Μυδιών (πρώτη φάση)	39
3.1.1. Μικροβιακός πληθυσμός	39
3.1.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση	42
3.2. Μισοκέλυφος μυδιών	44
3.2.1. Μικροβιακός πληθυσμός	44
3.2.2. Οργανοληπτική Αξιολόγηση	47
3.3. Σάρκα μυδιών (δεύτερη φάση)	49
3.3.1. Μικροβιακός πληθυσμός	49
3.3.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση	52
3.4. Σάρκα μυδιών σε θαλασσινό νερό	54
3.4.1. Μικροβιακός πληθυσμός	54
3.4.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση	57
3.5. Σάρκα μυδιών σε συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος	59
3.5.1. Μικροβιακός πληθυσμός	59
3.5.2. Οργανοληπτική αξιολόγηση	62
3.6. <i>Escherichia coli</i>	64

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
4.1. Μικροβιακό φορτίο μυδιών	65
4.2. <i>Escherichia coli</i>	70
4.3. Ενεργός οξύτητα (pH)	71
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73
6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	73
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία	77
6.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία	78
ABSTRACT	79

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οστρακοειδή

Τα δίθυρα μαλάκια (οστρακοειδή) είναι διηθηματοφάγοι οργανισμοί με παγκόσμια εξάπλωση και με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην οικολογία των θαλάσσιων βιοκοινωνιών. Ο γρήγορος ρυθμός αύξησης και η μεγάλη θρεπτική αξία των οστρακοειδών αποτέλεσαν σημαντικά κίνητρα για την καλλιέργειά τους. Στη χώρα μας, ο Θερμαϊκός Κόλπος είναι η σημαντικότερη περιοχή παραγωγής και αλιείας οστρακοειδών.

Ο Θερμαϊκός κόλπος αποτελεί τόσο σημαντικό όσο και εξαιρετικά ευαίσθητο οικοσύστημα, ως πεδίο άσκησης αλιευτικών, τουριστικών και ναυτιλιακών δραστηριοτήτων, ως τελικός αποδέκτης των εκροών μια εκτενέστατης περιοχής, που περιλαμβάνει το μητροπολιτικό κέντρο της Θεσσαλονίκης και την πεδιάδα της Κεντρικής Μακεδονίας (Φάμελλος κ.ά 2008)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο κόλπος του Θερμαϊκού αποτελεί τη σημαντικότερη θαλάσσια περιοχή της Ελλάδας για την ανάπτυξη της μυδοκαλλιέργειας, μεγάλα τμήματα των οποίων εντάσσονται στις υγροτοπικές περιοχές που προστατεύονται από την εθνική και κοινοτική νομοθεσία (NATURA 2000, Συνθήκη Ramsar).

Οι περισσότερες μονάδες μυδοκαλλιεργειών βρίσκονται σε αυτούς τους κόλπους και αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή παραγωγής καλλιεργούμενων μυδιών. Η μυδοκαλλιέργεια στους κόλπους Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού είναι μια εξελισσόμενη δυναμική δραστηριότητα που προσφέρει κοινωνικά (εργασία), οικονομικά (συνάλλαγμα) και εθνικά (εξαγωγές, συνεργασίες) οφέλη (Α. Τ. Ε. Ι. Θ. 2007).

Οι μελέτες για την εκτροφή των μυδιών στην Ελλάδα είναι σχετικά λίγες. Μερικές από αυτές είναι: Για την αύξηση των καλλιεργούμενων πληθυσμών και την ποιότητα των μυδιών στο Θερμαϊκό όπως η Κράββα (2000), Ε.Κ.Θ.Ε (2001), οι Galinou-Mitsoudi et al. (2002). Οι Galinou- Mitsoudi et al.(2002), αναφέρθηκαν στην επίδραση των ενδοβιοτών στην ανάπτυξη. Κυκλοφορία του νερού σε περιοχές οργανωμένης ανάπτυξης υδατοκαλλιεργειών/μυδοκαλλιεργειών (ΠΟΑΥ) και διαχειριστικές παρεμβάσεις χωροταξικής και περιβαλλοντικής βελτίωσης (Α.Τ.Ε.Ι.Θ. 2007)

1.2 Περιγραφή και μορφολογία του *Mytilus galloprovincialis*

Τα μύδια (αγγλικά mussel, γαλλικά moule , γερμανικά miesmuschel , ιταλικά mitilo)από την άποψη της συστηματικής ζωολογίας, ανήκουν στην συνομοταξία των δίθυρων μαλακίων (*Mollusca*),στην ομοταξία των ελασματοβραγχιωτών ή δίθυρων ή πελκύποδων(*Lamellibranchiata*),στην υφομοταξία των ελασματοβραγχίων και στην οικογένεια των μυτιλιδών (*Mytilidae*) (Παπαναστασίου 1988).

Τα μύδια έχουν μια εξαιρετική θρεπτική αξία η οποία τα καθιστά ιδανικά για τη διατροφή του ανθρώπου. Η σάρκα τους είναι πλούσια σε σελήνιο, ασβέστιο, σίδηρο, μαγνήσιο, φώσφορο και βιταμίνες (Α , Β1, Β2, Β6, Β12 και C)καθώς και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA , 37-48 % των ολικών λιπαρών οξέων).

Το *Mytilus galloprovincialis* (πολιτικό ή Ισπανικό μύδι) έχει μήκος 3-8 εκ. δύο συμμετρικές θυρίδες, που ενώνονται προς τα πίσω από ένα ισχυρό σύνδεσμο. Οι θυρίδες ανοίγουν με την βοήθεια δύο προσαγωγών μυών. Το χρώμα του όστρακου είναι μαύρο, ή σκοτεινό μπλε στην εξωτερική του πλευρά και μαύρο γυαλιστερό, με ζωηρές μπλε ανταύγειες στο εσωτερικό του. Το σχήμα του κοχυλιού του είναι κοντόχοντρο. (Παπαναστασίου 1988)(Εικ. 1)



Εικόνα 1 *Mytilus galloprovincialis*

Τα μύδια χαρακτηρίζονται από το δίθυρο όστρακο τους που αποτελείται από δυο κόγχες ή θυρίδες, συμμετρικές και ίσιες (ισόθυρα). Δε έχουν κεφάλι γι αυτό λέγονται και ακέφαλα.

Οι θυρίδες ενώνονται μεταξύ τους με ένα ελαστικό σύνδεσμο. Το άνοιγμα των θυρίδων ελέγχεται από τον ελαστικό σύνδεσμο και το κλείσιμο τους από δυο μύες που καλούνται προσαγωγοί μύες.

Οι θυρίδες του οστράκου προστατεύουν τα μαλακά μέρη του σώματος του ζώου. Σε περίπτωση κινδύνου, οι προσαγωγοί μύες κλείνουν τις θυρίδες ερμητικά, προστατεύοντας το σώμα του ζώου, από τους εχθρούς.

Το όστρακο (κέλυφος ή κοχύλι) που καλύπτει το σώμα τους, εκκρίνεται από τον μανδύα. Τα κύτταρα της επιφάνειας του μανδύα σχηματίζουν χιτινώδη επιδερμίδα, που μετασχηματίζεται σε όστρακο .

Αποτελείται από δύο στρώματα:

- το εξωτερικό στρώμα, που είναι κατασκευασμένο από ανθρακικό ασβέστιο, σκεπάζεται γύρω-γύρω από το περίοστρακο, μια κερατοειδή ουσία, που εκκρίνεται από τα χείλη του μανδύα. Το περίοστρακο χρησιμεύει για να προστατεύει τα μύδια από τους διάφορους εχθρούς των.
- το εσωτερικό στρώμα, αποτελείται από την κογχυλίνη.

Το σώμα τους αποτελείται από τον σπλαχνικό σάκο και το πόδι:

Ο σπλαχνικός σάκος περικλείει τα περισσότερα από τα σπλάχνα, όπως:

- πεπτικό σωλήνα
- καρδιά
- συκώτι
- νεφρά
- γενετικούς αδένες

Ο σπλαχνικός σάκος σκεπάζεται ολόκληρος ή κατά το μεγαλύτερο του μέρος, από μια πτυχή του δέρματος, που λέγεται μανδύας. Ανάμεσα στο μανδύα και στα σπλάχνα, υπάρχει η μανδουακή κοιλότητα, που περιλαμβάνει το αναπνευστικό σύστημα. Μέσα στη μανδουακή κοιλότητα βρίσκονται οι πόροι των γενετικών και ουροποιητικών οργάνων καθώς και η έξοδος του πρωκτού.

Ο πεπτικός σωλήνας περιλαμβάνει τρία τμήματα:

- το πρόσθιο
- το μεσαίο

- τελικό ή οπίσθιο τμήμα.

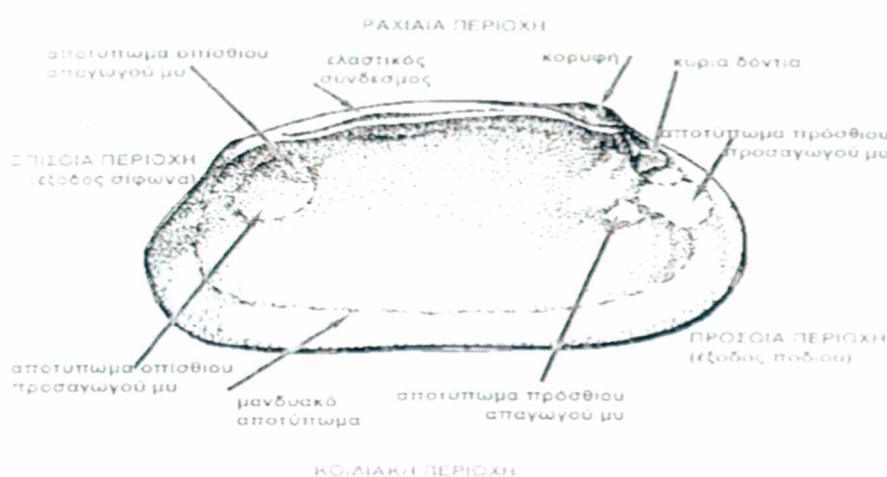
Στο πρόσθιο τμήμα βρίσκεται το στόμα, ο φάρυγγας και ο οισοφάγος. Σιελογόνοι αδένες εκβάλλουν στον οισοφάγο. Το μεσαίο τμήμα του πεπτικού συστήματος, που είναι πιο πλατύ, αποτελεί το στομάχι, στο οποίο και εκβάλλει το πεπτικό υγρό. Στο τελικό ή οπίσθιο τμήμα υπάρχει το έντερο και ο πρωκτός, που μερικές φορές, ύστερα από διάφορες συστροφές, καταλήγει κοντά στο στόμα. Η αναπνοή γίνεται μέσα στη μανδρακή κοιλότητα, και το απαραίτητο οξυγόνο προέρχεται από το θαλασσινό νερό, που περνά μέσα από τα βράγχια, κυκλοφορώντας αδιάκοπα, χάρη στα συνεχή χτυπήματα των μικροσκοπικών βλεφαρίδων των βραγχίων. Τα βράγχια επικοινωνούν με το εξωτερικό περιβάλλον με μια τρύπα που αφήνουν τα χείλη του μανδύα

Η καρδιά βρίσκεται στο πάνω τμήμα του σπλαχνικού σάκου, περικλείεται μέσα σε ένα περικαρδιακό σάκο και περιλαμβάνει κόλπο και κοιλία. Τα αιμοφόρα αγγεία είναι καλά αναπτυγμένα και αποτελούνται από αρτηρίες και φλέβες.

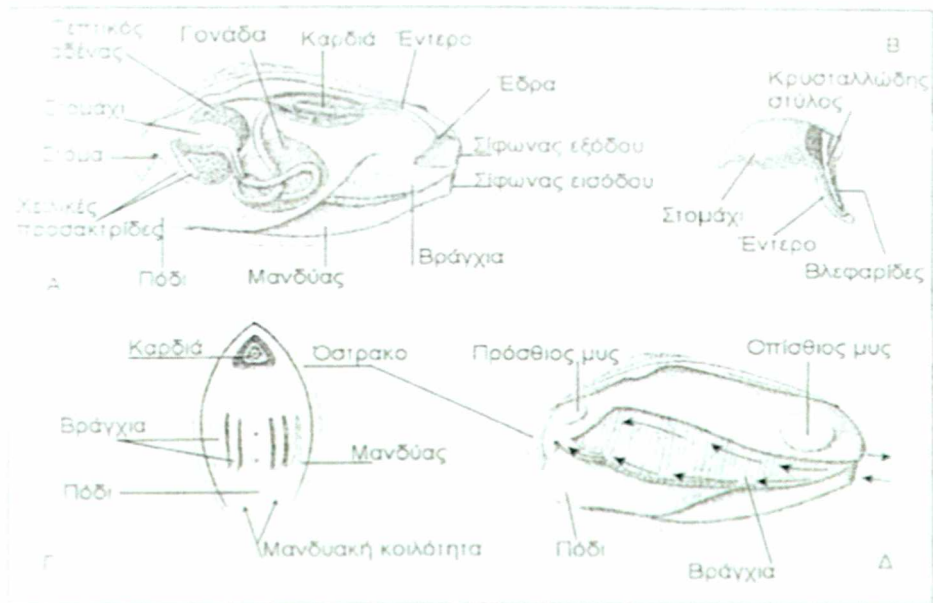
Τα νεφρά αποτελούνται από ένα ζεύγος νεφριδίων (μικρών νεφρών) που επικοινωνούν με τη μανδρακή κοιλότητα με τέσσερις πόρους που εκβάλλουν σε αυτή.

Το πόδι είναι αμφίπλευρο όργανο που βρίσκεται στην κοιλία. Έχει ισχυρό μυϊκό σύστημα και είναι ευκίνητο όργανο. Χρησιμεύει για τη μετακίνηση του ζώου και φέρει αδένες που εκκρίνουν το βύσσο, λεπτά ανθεκτικά νημάτια, με τη βοήθεια των οποίων το ζώο προσκολλάται σε διάφορα αντικείμενα.

Το στόμα τους δεν έχει όργανα μάσησης. Περιβάλλεται από 4 φυλλοειδείς κεραιές, που πάλλονται και διευκολύνουν έτσι την είσοδο του θαλασσινού νερού που περιέχει τις τροφές του. Με το ελαφρό άνοιγμα των θυρίδων, το νερό περνά στα βράγχια μέσα από τις σχισμές του μανδύα ή από τον σίφωνα, πραγματοποιώντας τη διατροφή και την αναπνοή του ζώου. Το νευρικό σύστημα των μυδιών αποτελείται από τρία ζεύγη γαγγλίων, ένα κοντά στο στόμα, ένα στο πόδι και ένα στα σπλάχνα. Όλα τα γάγγλια ενώνονται μεταξύ τους με νευρικούς συνδέσμους.(Εικ. 2,3)(Γαληνού-Μητσούδη 2003)



Εικόνα 2 Ραχιαία περιοχή μυδιού



Ανατομικά στοιχεία δίθυρων οστράκων. Α: Κατά μήκος απεικόνιση των οργάνων ενός δίθυρου. Β: Το στομάχι και λεπτομέριά του με τον κρυσταλλώδη στύλο. Γ: Εγκάρσια τομή στο ύψος του οστράκου με την παρουσίαση των μερών του σώματος στη θέση τομής. Δ: Παρουσίαση της πορείας του νερού από την είσοδο ως την έξοδό του, στα δίθυρα

Εικόνα 3 Ανατομικά στοιχεία μυδιού (Γαληνού – Μητσούδη 2003)

1.3 Στοιχεία Μικροβιολογίας αλιευμάτων

1.3.1 Μικροοργανισμοί και τρόφιμα

Ο όρος μικρόβιο ή μικροοργανισμός είναι όρος της τεχνολογίας και αγορά ένα σύνολο έμβιων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0,16 μm.). Γενικά πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών.

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσής και ρυπάνσής τους, είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα μικρόβια αυτά συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Αυτό αποτελεί και αντικείμενο της επιστήμης της μικροβιολογίας των τροφίμων.

Για την παραγωγή καλής ποιότητας τροφίμων πρέπει να υπάρχει αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών κάτω του ανώτερου επιτρεπτού ορίου για λόγους δημόσιας υγείας, ενώ ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλό επίπεδο για τη δυνατότητα συντήρησης του τροφίμου για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Ο αριθμός και τα είδη των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες (Κοτζεκίδου – Ρουκά 2000) :

1. Το περιβάλλον από το οποίο προέρχονται οι πρώτες ύλες του τροφίμου
2. Την ποιότητα των πρώτων υλών από μικροβιολογική άποψη

3. Τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στο χώρο επεξεργασίας
4. Την καταλληλότητα του υλικού συσκευασίας και των συνθηκών αποθήκευσης του τροφίμου ώστε να διατηρηθεί ο πληθυσμός της μικροχλωρίδας του σε χαμηλό επίπεδο.

Ο αριθμός των μικροοργανισμών ενός τροφίμου αντανακλά συνολικά όλους τους παραπάνω παράγοντες, ενώ μία γενική εικόνα όλων αυτών των παραμέτρων δίνει ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) του τροφίμου.

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα είναι κυρίως αυτοί της αρχικής χλωρίδας του τροφίμου και αυτοί οι οποίοι προέρχονται από επιμόλυνση. Αν και η σάρκα των υγιών ζώων θεωρείται απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς, αυτή μπορεί να μολυνθεί από το δέρμα, το τρίχωμα, τα σκεύη και εργαλεία επεξεργασίας, από το προσωπικό, το νερό, τον αέρα και γενικότερα το περιβάλλον, κατά τα στάδια επεξεργασίας αλλά και κατά την αποθήκευση (Frazier and Westhoff 1988, Dubal *et al.* 2004).

Ως αλλοίωση τροφίμου αναφέρεται η υποβάθμιση της ποιότητάς του όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Ένα τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο όταν έχουν πραγματοποιηθεί αλλαγές σε αυτό οι οποίες το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Η αλλοίωση είναι δυνατόν να προέλθει από μικροβιακή δράση, χημικές αντιδράσεις, δράση ενδογενών ενζύμων του τροφίμου, προσβολή από έντομα, τρωκτικά κ.ά. Περίπου το ένα τέταρτο της παγκόσμιας παραγωγής «χάνεται» λόγω μικροβιακής αλλοίωσης ή προσβολών. Στις αναπτυγμένες χώρες η αλλοίωση των τροφίμων οφείλεται κυρίως σε βακτήρια και ζύμες – μύκητες και επιτυγχάνεται σε σχετικά υψηλούς αριθμούς μικροοργανισμών (10^7 - 10^8 cfu/g) (Huis de Velt 1996).

1.3.2 Στοιχεία μικροβιολογίας οστρακοειδών

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

Επιδημίες λόγω μόλυνσης από βακτήρια και ιούς έχουν σημειωθεί από την κατανάλωση δίθυρων μαλακίων προερχόμενων τόσο από ανοιχτές όσο και από κλειστές περιοχές καλλιέργειας (Gerba and Goyal 1978, Vaughn 1980). Άτομα με ασθένειες όπως διαβήτης, ηπατικές ασθένειες ή ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με τα υγιή άτομα, γι' αυτό θα πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση ωμών οστρακοειδών.

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

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

- οι σωματικοί κολιφάγοι (Vaughn J.M. and T.G. Metcalf. 1974), οι οποίοι μολύνουν ειδικά στελέχη του βακτηρίου *E. coli* με προσκόλληση σε λιποπολυσακχαριδικούς ή πρωτεϊνικούς υποδοχείς του κυτταρικού τοιχώματος
- οι βακτηριοφάγοι που μολύνουν τα βακτήρια του γένους *Bacteroides fragilis* (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology 1991, Jofre et al. 1986, Lucena et al. 1994), αναερόβιων βακτηρίων που ζουν στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα
- οι F-specific RNA βακτηριοφάγοι (F-specific RNA) (Havelaar et al. 1984, Havelaar et al. 1986, IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology 1991), οι οποίοι μολύνουν το κολοβακτηρίδιο *E. coli* με προσκόλληση σε υποδοχείς που βρίσκονται στα συζευκτικά ινίδια (F ινίδια) του βακτηρίου. Επιπλέον, η ανίχνευση των αδενοϊών με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει προταθεί ως μοριακός δείκτης της προερχόμενης από ιό μόλυνσης ανθρώπινης προέλευσης (Pina et al. 1998).

1.3.3 Μικροβιολογία Μυδιών

Τα μύδια προσλαμβάνουν την τροφή τους από την διήθηση τους στο θαλάσσιο περιβάλλον στο οποίο ζουν. Όταν αναπτύσσονται σε καθαρά ύδατα τότε αποτελούν ένα ασφαλές τρόφιμο για τον άνθρωπο. Παρά ταύτα, το νερό στο οποίο ζουν περιέχει τόσο βακτήρια όσο και ιούς, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνουν στο εσωτερικό τους και κυρίως στο γαστρικό τους σωλήνα, παθογόνους οργανισμούς που μπορούν να παραμείνουν εκεί ζωντανοί για μεγάλο χρονικό διάστημα (Desenclos et al. 1991) . Αυτοί οι παθογόνοι οργανισμοί δεν βλάπτουν τα ίδια τα μύδια αλλά μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε ανθρώπους που τα καταναλώνουν καθώς καταναλώνονται κυρίως ωμά γιατί κρίνεται απαραίτητη η καλλιέργεια τους σε πολύ καθαρά νερά , υψηλότερης καθαριότητας από αυτή που απαιτείται για κολύμβηση ή ακόμα και για ψάρεμα (Gerba C.P. and S.M. Goyal 1978, Vaughn et al, 1980 Anonymous 2001)

Η συσσώρευση των μικροοργανισμών στα μύδια έχει μελετηθεί από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα και μας είναι γνωστή η μετάδοση εντεροπαθογόνων ασθενειών από την κατανάλωση τους (Desenclos et al 1991, Halliday et al 1991) Ασθένειες όπως ο τυφοειδής πυρετός, η χολέρα , η λοιμώδης ηπατίτιδα και πολλές άλλες γαστρικές λοιμώξεις (Rippey R. Scott 1994) έχουν παρουσιαστεί κατά την κατανάλωση τους.

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

Ενδεικτικά αναφέρουμε κάποια βακτήρια και μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί στα μύδια. Γνωστοί παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι οι *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Clostridium sp.* και *Vibrio spp.* (Ates Mustafa, Ozkizilcik Asli, Tabakoglu Cengiz 2011).

1.3.4 Μικροβιολογία επεξεργασμένων μυδιών

Τα μύδια δεν φέρουν και ιδιαίτερης επεξεργασίας προς την κατανάλωση τους στους καταναλωτές. Μπορούν να τα προμηθευτούν αποφλοιωμένα σε σακουλάκια 0,5 kg (Εικόνα 4) , σε σακουλάκια με το ένα κέλυφος (μισοκέλυφος) του 0,5 kg , ζωντανά σε δίχτυα των 5 kg, 10 kg ή με το κιλό (Κουτσοστάθη 2008) και κατεψυγμένα. Το συνήθης μικροβιολογικό τους φορτίο δεν φαίνεται να προκαλείτε κατά την αλίευση τους καθώς προϋπάρχει είδη από τον τόπο στο οποίο καλλιεργήθηκαν.

Το προσωπικό είναι δυνατόν να επιμολύνει το προϊόν. Η απευθείας έκθεση και μεταποίηση των προϊόντων από τους εργαζόμενους χωρίς την χρήση μάσκας , γαντιών μπορούν να μεταφέρουν παθογόνους και μη μικροοργανισμούς ενώ το είδος *E.coli* βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα. Το νερό στο οποίο αποθηκεύονται μετά την μεταποίηση τους είναι συνήθως πόσιμο. Έτσι , χωρίς την τήρηση υγιεινής από το προσωπικό, τα είδη αυτά μπορούν εύκολα να επιμολύνουν το τελικό προϊόν (EC-ASEAN Economic Cooperation Programme on Standards, Quality & Conformity Assessment 2005) .

1.3.5 Θερμική επεξεργασία μυδιών

Για την συντήρηση και την εξάλειψη του μικροβιολογικού φορτίου από τα τρόφιμα η θερμική επεξεργασία είναι ο κλασσικότερος και πιο αποτελεσματικότερος τρόπος.

Στις μυδοκαλλιέργειες συνήθως μετά την αλίευση τους από την θάλασσα ακολουθεί αποθήκευση τους μέσα σε νερό σε ψύξη της τάξεως των 2 °C πριν και μετά την επεξεργασία τους. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μείωση του ρυθμού των βιοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στα κύτταρα των μικροοργανισμών και βαθμιαία τη μείωση της δράσης τους (Κοτζεκίδου- Ρούκα 2000).



Εικόνα 4 . Συσκευασία Σάρκας Μυδιών (Ψίχα)

1.4 Ποιοτικός Έλεγχος

1.4.1 Υγιεινή και ποιότητα των τροφίμων

Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (International Standards Organization, ISO) ορίζει την έννοια της ποιότητας, ως το σύνολο των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών ενός προϊόντος, τα οποία του προσδίδουν τη δυνατότητα να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του καταναλωτή. Είναι δηλαδή το σύνολο των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών του προϊόντος (ή υπηρεσίας) που εξυπηρετούν καθορισμένες ή υπονοούμενες ανάγκες.

Υπάρχουν τρεις τύποι κινδύνων οι βιολογικοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί) , οι χημικοί και οι φυσικοί, οι οποίοι είναι δυνατό να μολύνουν ένα τρόφιμο πριν ή κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας ή της αποθήκευσής του (Rooney and Wall 2003). Οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι και άμεσοι για την υγεία του καταναλωτή, ιδιαίτερα στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, είναι οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι και κυρίως τα παθογόνα βακτήρια.

Τα τρόφιμα αποτελούν οικοσυστήματα για τους μικροοργανισμούς και φέρουν μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο από ότι οι άλλες μορφές οργανικής ύλης διότι οι ύλες που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος για τροφή είναι εξίσου θρεπτικές και για τους μικροοργανισμούς. Διάφοροι παθογόνοι και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να εισαχθούν στη σάρκα των ζώων που προορίζονται για κατανάλωση κατά τη διάρκεια της σφαγής και των περαιτέρω διαδικασιών προκαλώντας γρήγορη αλλοίωση με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής του τροφίμου, υποβαθμίζοντας την πρωτεϊνική του αξία και πολλές φορές επιδρώντας στην υγεία του καταναλωτή (Dubal *et al.* 2004).

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων ως δείκτες της Ποιότητας και της Ασφάλειας των τροφίμων είναι το *E.coli*, τα κολοβακτηριοειδή, οι Εντερόκοκκοι και η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Odumeru and Belvedere 2002). Ειδικότερα, τα συνολικά κολοβακτηριοειδή και το *E.coli* χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πιθανότητας ύπαρξης παθογόνων κοπρανώδους προέλευσης (Jay 1992, AOAC International 1995), ενώ η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής των τροφίμων (ICMSF 1986a,b).

1.4.2 Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας

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

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

Οι πιο κοινοί δείκτες σήμερα είναι τα κολοβακτηριοειδή (Total coliforms), το *Enterococcus* spp. και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal coliforms) (Noble *et al.* 2003). Επειδή, όμως, το μεγαλύτερο ποσοστό των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων αποτελείται από το είδος *E. coli* και είναι αναμφισβήτητο το γεγονός αν τα υπόλοιπα βακτήρια των ειδών *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* κατά πόσο θα μπορούσαν να είναι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, η U.S. Environmental Protection Agency το 1986 πρότεινε ως πιο αξιόπιστο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης το είδος *E. coli* (Kessel *et al.* 2007).

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

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

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

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

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

1.4.2.1 Ολική Αερόβια Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Η καταμέτρηση της ΟΜΧ, χρησιμοποιείται ως ένδειξη του πλήθους των μικροοργανισμών στα τρόφιμα όσον αφορά:

- στο αρχικό μικροβιακό φορτίο των πρώτων υλών
- στην αποτελεσματικότητα της παραγωγικής διαδικασίας
- στην ορθότητα των συνθηκών αποθήκευσης και διανομής
- στην αποτελεσματικότητα των διαδικασιών μείωσης μικροβιακών φορτίων (π.χ. παστερίωση, καθαρισμός κλπ)
- στην υγιεινή του μηχανολογικού εξοπλισμού

Η Ο.Μ.Χ έχει μεγαλύτερη αξία ως δείκτης της υπάρχουσας μικροβιακής κατάστασης ενός τροφίμου, παρά ως μέθοδος πρόβλεψης του χρόνου συντήρησης του, διότι η ποσότητα της καταμέτρησης η οποία εκπροσωπείται απ' τους κύριους επιμολυντές του τροφίμου, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Αγγλικοί όροι: Aerobic Plate Count (APC), Total Viable Count (TVC)

1.4.2.2 Οικογένεια Enterobacteriaceae

Η Οικογένεια των εντεροβακτηρίων αποτελεί μια ομάδα Gram-αρνητικών, μη σπορογόνων, δυνητικά αναερόβιων ραβδόμορφων βακτηρίων, που περιλαμβάνει περισσότερα από 115 είδη, τα οποία ανιχνεύονται στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και ορισμένα από τα πιο κοινά παθογόνα βακτήρια, όπως η *Salmonella sp.* και η *Escherichia coli*. Τα εντεροβακτήρια αποτελούν μια ευρύτερη ομάδα βακτηρίων τα οποία, παρουσία αλάτων του χολικού οξέος αναπτύσσονται και παράγουν οξύ από γλυκόζη.

1.4.2.3 Κολοβακτηριοειδή (coliforms)

Ως κολοβακτηρία έχουν οριστεί όλα τα Gram-αρνητικά, μη σπορογόνα, δυνητικά αναερόβια βακτήρια, τα οποία αποτελούν υποομάδα των εντεροβακτηρίων. Αποτελούν μια ευρύτερη ομάδα βακτηρίων, τα οποία παρουσία αλάτων του χολικού οξέος αναπτύσσονται και παράγουν οξύ και αέριο από λακτόζη, μέσα σε 48 ώρες, στους 35 ή 37 °C. Τα κολοβακτήρια αντιπροσωπεύονται από τα τέσσερα γένη της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* και *Klebsiella*. Ως κολοβακτήρια κοπρανώδους προέλευσης, ορίζονται τα κολοβακτήρια εκείνα τα οποία παράγουν αέριο και οξύ από λακτόζη στους 44 – 45,5 °C. Η εξέταση για κολοβακτήρια κοπρανώδους προέλευσης είναι ουσιαστικά εξέταση για *E. coli* τύπου I, ενώ και κάποια από τα στελέχη του *Citrobacter* και *Klebsiella* ταιριάζουν στον προσδιορισμό. Τα κολοβακτήρια εμφανίζονται στον εντερικό σωλήνα των περισσότερων θερμόαιμων ζώων καθώς και στον αέρα, στη σκόνη, στα χέρια των ανθρώπων και στα περισσότερα τρόφιμα. Το ζήτημα που τίθεται δεν είναι η παρουσία των κολοβακτηρίων στα τρόφιμα, αλλά η συγκέντρωσή τους. Για παράδειγμα, τα περισσότερα λαχανικά περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις από κολοβακτήρια, ενώ αν η συγκομιδή και ο χειρισμός αυτών των προϊόντων γίνει σωστά, το φορτίο είναι χαμηλό και όχι ιδιαίτερης σημασίας για την ασφάλεια του καταναλωτή. Αγγλικός όρος: Coliforms

Escherichia coli

Το *E.coli* Nissle 1917 (Rembacken *et al.* 1999, Peran *et al.* 2007) είναι γνωστό ως βακτήριο με ορισμένα παθογόνα στελέχη τα οποία προκαλούν τροφογενή νοσήματα στον άνθρωπο (Kaper *et al.* 2004). Το 1885 ο Theodore Escherich πρότεινε το είδος αυτό, το οποίο ονομαζόταν τότε *Bacillus coli*, ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (Buckalew *et al.* 2006).

Το *E.coli* είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός ο οποίος βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και αποτελεί εξειδικευμένο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των τροφίμων από τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων. Χρησιμοποιείται μαζί με τα ολικά κολοβακτηριοειδή και την ολική μεσόφιλη χλωρίδα ως δείκτης ποιότητας και ασφάλειας στις βιομηχανίες τροφίμων (Odumeru and Belvedere 2002).

Ορισμένα στελέχη του προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις (Bredie and Boer 1992) και κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες: εντεροπαθογόνα, εντεροτοξιγενή, εντεροδιεισδυτικά, εντεροαιμορογικά (Huss 1993). Τα εντεροπαθογενικά *E.coli* (EPEC) είναι αυτά που παράγουν ένα είδος τοξίνης στον πεπτικό σωλήνα και προκαλούν διάρροια κυρίως στα νήπια. Τα εντεροτοξικά *E.coli* (ETEC) παράγουν τοξίνες στο έντερο, παρόμοια με την τοξίνη της χολέρας και ευθύνονται για τον τύπο της «διάρροιας των ταξιδιωτών». Τα εντεροδιεισδυτικά *E.coli* (EIEC) προκαλούν διάρροια και επιπλέον εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου με επακόλουθη εκδήλωση συμπτωμάτων σιγκέλωσης και τέλος τα εντεροαιμορογικά *E.coli* (EHEC ή VTEC *E.coli*) τα οποία προκαλούν αιμοραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουρικό σύνδρομο όταν προσκολληθούν στο τοίχωμα του εντερικού σωλήνα με σημαντικότερο ορολογικό τύπο των στελεχών EHEC τον O157.

1.5 Νομοθεσία

1.5.1 Υγιεινή Τροφίμων

Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα τρόφιμα αποτελούν μία από τις κυριότερες πηγές τροφιμογενών ασθενειών στον άνθρωπο (**ΕΚ αριθ. 2073/2005**). Τα τρόφιμα δεν πρέπει να περιέχουν μικροοργανισμούς ή τις τοξίνες τους ή τους μεταβολίτες τους σε ποσότητες που παρουσιάζουν απαράδεκτο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (**ΕΚ αριθ. 2073/2005**). Όμως , επειδή ορισμένα τρόφιμα ενδέχεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερους κινδύνους απαιτούν τη θέσπιση ειδικών κανόνων υγιεινής προκειμένου να εξασφαλισθεί η ασφάλεια τους.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (**ΕΚ αριθ. 852/2004**) του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29^{ης} Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων ορίζονται τα εξής:

Πεδίο εφαρμογής

Ο παρών κανονισμός έχει σκοπό τη διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων σε όλα τα στάδια από την πρωτογενή παραγωγή έως και την προσφορά προς πώληση ή τη διάθεση τροφίμων στον τελικό καταναλωτή. Δεν καλύπτει θέματα σχετικά με τη διατροφή ή ζητήματα σύνθεσης και ποιότητας των τροφίμων.

Ο παρών κανονισμός εφαρμόζεται στις επιχειρήσεις τροφίμων και δεν εφαρμόζεται στην πρωτογενή παραγωγή τροφίμων για ιδιωτική οικιακή χρήση ούτε στην οικιακή παρασκευή τροφίμων για ιδιωτική κατανάλωση.

Γενικές και ειδικές διατάξεις

Όλοι οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων εξασφαλίζουν ότι όλα τα στάδια για τα οποία είναι υπεύθυνοι, από την πρωτογενή παραγωγή έως και την προσφορά προς πώληση ή διάθεση τροφίμων στον τελικό καταναλωτή, εκτελούνται με υγιεινό τρόπο, σύμφωνα με τον παρόντα κανονισμό.

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων στο επίπεδο της πρωτογενούς παραγωγής και ορισμένες συναφείς δραστηριότητες οφείλουν να συμμορφώνονται προς τις γενικές διατάξεις υγιεινής. Οι σχετικές συναφείς δραστηριότητες είναι:

- η μεταφορά, ο χειρισμός και η αποθήκευση πρωτογενών προϊόντων στον τόπο παραγωγής όταν η φύση τους δεν έχει τροποποιηθεί σημαντικά·
- η μεταφορά ζώντων ζώων αν είναι απαραίτητο·
- η μεταφορά, από τον τόπο παραγωγής προς ένα κατάστημα προϊόντων φυτικής προέλευσης, προϊόντων αλειίας και άγριων ζώων κυνηγίου, όταν η φύση τους δεν έχει σημαντικά τροποποιηθεί.

Εξάλλου, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων που ασκούν άλλες δραστηριότητες εκτός της πρωτογενούς παραγωγής οφείλουν να συμμορφώνονται προς τις γενικές διατάξεις υγιεινής σχετικά με:

- τους χώρους τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των εξωτερικών εκτάσεων και τόπων
- τις συνθήκες μεταφοράς·
- τους εξοπλισμούς·
- τα απορρίμματα τροφών·
- την παροχή νερού

- την προσωπική υγιεινή των προσώπων που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα·
- τα ίδια τα τρόφιμα
- την πρώτη και τη δεύτερη συσκευασία·
- τη θερμική επεξεργασία, που επιτρέπει τη μεταποίηση ορισμένων τροφίμων·
- την κατάρτιση των επαγγελματιών του κλάδου.

Τα κράτη μέλη μπορούν να προσαρμόζουν τις απαιτήσεις τους με σκοπό να καλύψουν τις ανάγκες επιχειρήσεων τροφίμων, οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές που πλήττονται από ειδικές γεωγραφικές δυσχέρειες ή αντιμετωπίζουν δυσκολίες εφοδιασμού και οι οποίες εξυπηρετούν την τοπική αγορά, ή με σκοπό να ληφθούν υπόψη παραδοσιακές μέθοδοι παραγωγής και το μέγεθος των εκμεταλλεύσεων. Η επίτευξη των στόχων της υγιεινής των τροφίμων δεν πρέπει να τίθεται σε κίνδυνο.

Εξάλλου όλοι οι επιχειρηματίες του επισιτιστικού τομέα οφείλουν να τηρούν τις διατάξεις του κανονισμού **(ΕΚ αριθ. 853/2004)** ως προς τους ειδικούς κανόνες που ισχύουν για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, καθώς και, εφόσον χρειάζεται, ορισμένους ειδικούς κανόνες που αφορούν, συγκεκριμένα, μικροβιολογικά κριτήρια εφαρμοζόμενα στα τρόφιμα, τον έλεγχο της θερμοκρασίας και την διατήρηση της αλυσίδας ψύχους, τις λήψεις δειγμάτων και τις αναλύσεις.

HACCP

Τα κράτη μέλη ενθαρρύνουν τους υπευθύνους επιχειρήσεων τροφίμων να καταρτίζουν οδηγούς ορθής πρακτικής, οι οποίοι περιλαμβάνουν οδηγίες για τη συμμόρφωση προς τους γενικούς κανόνες υγιεινής και προς τις αρχές του HACCP. Τα κράτη μέλη αξιολογούν τους εθνικούς οδηγούς για να εξασφαλίσουν ότι το περιεχόμενο των οδηγιών αυτών είναι εφαρμόσιμο, ότι έχουν καταρτισθεί λαμβάνοντας υπόψη τον συνιστώμενο διεθνή κώδικα πρακτικής - γενικές αρχές υγιεινής των τροφίμων του Codex Alimentarius, και ότι έχει ζητηθεί η γνώμη όλων των ενδιαφερομένων που επηρεάζονται ουσιαστικά. Τα κράτη μέλη διαβιβάζουν στην Επιτροπή μόνο τους εθνικούς οδηγούς που έχουν διαπιστώσει ότι συμμορφώνονται με τα παραπάνω, και η Επιτροπή τηρεί μητρώο των οδηγιών αυτών.

Εάν ένα κράτος μέλος ή η Επιτροπή θεωρούν ότι υπάρχει ανάγκη ενιαίων κοινοτικών οδηγιών, η Επιτροπή εξετάζει την ανάγκη έκδοσης των εν λόγω οδηγιών. Οι μόνιμες επιτροπές που επικουρούν την Επιτροπή εξασφαλίζουν ότι το περιεχόμενο των οδηγιών αυτών είναι εφαρμόσιμο, ότι έχουν καταρτισθεί λαμβάνοντας υπόψη τις γενικές αρχές υγιεινής των τροφίμων του Codex Alimentarius και τους εθνικούς οδηγούς, και ότι έχει ζητηθεί η γνώμη όλων όσων τα συμφέροντα επηρεάζονται ουσιαστικά από τους οδηγούς αυτούς.

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων μπορούν να ανατρέχουν είτε στους εθνικούς είτε στους κοινοτικούς οδηγούς.

Καταχώριση ή έγκριση των επιχειρήσεων τροφίμων

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να συνεργάζονται με τις αρμόδιες αρχές και ειδικά να φροντίζουν ώστε όλες οι εγκαταστάσεις που τελούν υπό τον έλεγχό τους καταχωρίζονται από την αρμόδια αρχή και να τηρούν αυτή την τελευταία ενήμερη ως προς τις αλλαγές κατάστασης (παραδείγματος χάρη, το κλείσιμο της επιχείρησης).

Όταν η εθνική ή κοινοτική νομοθεσία το απαιτεί, οι επιχειρήσεις τροφίμων πρέπει να εγκρίνονται από την αρμόδια αρχή και δεν επιτρέπεται η λειτουργία τους χωρίς την έγκριση αυτή.

Ιχνηλασιμότητα και απόσυρση των τροφίμων

Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ αριθ. 178/2002), οι υπεύθυνοι του τομέα τροφίμων εφαρμόζουν συστήματα και διαδικασίες που επιτρέπουν την ιχνηλασιμότητα των συστατικών και των τροφίμων και, αν χρειάζεται, των ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των τροφίμων.

Επίσης, όταν υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων διαπιστώσει ότι ορισμένα τρόφιμα παρουσιάζουν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία, οφείλει να αποσύρει αμέσως τα συγκεκριμένα τρόφιμα από την αγορά και να ενημερώνει την αρμόδια αρχή καθώς και τους χρήστες.

Επίσημοι έλεγχοι

Η εφαρμογή, από τους επιχειρηματίες του τομέα τροφίμων, των αρχών HACCP δεν αντικαθιστά τους επίσημους ελέγχους που εκτελούνται από την αρμόδια αρχή. Οι επιχειρηματίες οφείλουν συγκεκριμένα να συνεργάζονται με τις αρμόδιες αρχές, σύμφωνα με τις διατάξεις της κοινοτικής νομοθεσίας ή, ελλείψει αυτή, της εθνικής.

Εξωτερική διάσταση

Τα τρόφιμα που εισάγονται στην Κοινότητα πρέπει να πληρούν τους κοινοτικούς κανόνες υγιεινής ή ισοδύναμους κανόνες.

Τα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για εξαγωγή σε τρίτες χώρες πρέπει να πληρούν τουλάχιστον τις ίδιες απαιτήσεις με εκείνες που ισχύουν για τη διάθεσή τους στο εμπόριο στο εσωτερικό της Κοινότητας, πέρα από τις απαιτήσεις που ενδεχομένως επιβάλλει η ενδιαφερόμενη τρίτη χώρα.

Έκθεση προς το Συμβούλιο και το Κοινοβούλιο

Η Επιτροπή υποβάλλει στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο έκθεση, ενδεχομένως μαζί με κατάλληλες προτάσεις, εντός πέντε ετών από την έναρξη ισχύος του παρόντος κανονισμού, στην οποία έκθεση θα γίνεται επισκόπηση της εμπειρίας που αποκτήθηκε από την εφαρμογή του παρόντος κανονισμού, καθώς και ως προς τη σκοπιμότητα εφαρμογής των αρχών HACCP στους επιχειρηματίες του επισιτιστικού τομέα που ασκούν δραστηριότητες πρωτογενούς παραγωγής και τις συναφείς δραστηριότητες που περιγράφηκαν παραπάνω.

Πλαίσιο

Ο παρών κανονισμός αποτελεί μέρος του «πακέτου υγιεινής», μιας δέσμης νομοθετικών πράξεων που θεσπίζει κανόνες υγιεινής για τα τρόφιμα. Περιλαμβάνονται, εκτός του παρόντος κανονισμού, οι ακόλουθες νομοθετικές πράξεις:

- κανονισμός **(ΕΚ αριθ. 853/2004)** για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ώστε να εξασφαλίζεται για υψηλό επίπεδο ασφάλειας τροφίμων και δημόσιας υγείας·
- κανονισμός **(ΕΚ αριθ. 854/2004)** για τη θέσπιση κοινοτικού πλαισίου για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, ο οποίος καθορίζει ειδικές διατάξεις για το νωπό κρέας, τα δίθυρα μαλάκια, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Επιπλέον, οι ακόλουθες νομοθετικές πράξεις συμπληρώνουν την κοινοτική νομοθεσία στον τομέα της υγιεινής των τροφίμων:

- κανονισμός **(ΕΚ αριθ. 178/2002)**, ο οποίος περιέχει γενικές αρχές της νομοθεσίας τροφίμων. Ο εν λόγω κανονισμός επεξηγεί τις διαδικασίες σχετικά με την ασφάλεια τροφίμων και ιδρύει την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων·
- κανονισμός **(ΕΚ αριθ. 882/2004)**, ο οποίος αναδιοργανώνει τους επίσημους ελέγχους των τροφίμων και των ζωοτροφών, κατά τρόπον ώστε να ενσωματώνονται οι έλεγχοι σε όλες τις φάσεις της παραγωγής και σε όλους τους τομείς·

- οδηγία (2002/99/EK), η οποία θεσπίζει τις προϋποθέσεις κυκλοφορίας προϊόντων ζωικής προέλευσης στην αγορά και τους περιορισμούς που εφαρμόζονται στα προϊόντα προέλευσης τρίτων χωρών ή περιφερειών, που υπόκεινται σε περιορισμούς υγειονομικού ελέγχου.

1.5.2 Νομοθεσία για τα μύδια

Τα δίθυρα μαλάκια (μύδια , γυαλιστερές, κυδόνια, στρείδια, αχιβάδες κ.τ.λ) αποτελούν μια πολύ θρεπτική τροφή. Ωστόσο η κατανάλωση ωμών ή ελαφρώς μαγειρεμένων δίθυρων μαλακίων που έχουν συλλέγει από περιοχές με μολυσμένα νερά, μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες ασθένειες. Στο παρελθόν τα δίθυρα μαλάκια είχαν συνδεθεί , με τον τυφοειδή και τον παρατυφοειδή πυρετό (οφείλονται στα βακτήρια *Salmonella typhi* και *Salmonella paratyphi* , αντιστοιχά) αλλά η εύρεση των παραπάνω μικροοργανισμών είναι πλέον σπάνια στις αναπτυγμένες χώρες. Στις μέρες μας οι πιο κοινες λοιμώξεις που σχετίζονται με μολυσμένα δίθυρα μαλάκια οφείλονται σε άλλα είδη ή ιούς.

Σύμφωνα με την ισχύουσα κοινοτική νομοθεσία κανονισμός (ΕΚ αριθμ. 853/2004), κανονισμός (ΕΚ αριθμ. 854/2004), κανονισμός (ΕΚ αριθμ. 2073/2005) ο προσδιορισμός του πληθυσμού της *E.coli* , ως μικροοργανισμού δείκτη, στα ζώντα δίθυρα μαλάκια χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου της μόλυνσης των δίθυρων μαλακίων με βακτηριακά ή και ιογενή παθογόνα μικρόβια.

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού της *E. coli* αποτελεί τη βάση των ελέγχων των δίθυρων μαλακίων για την προστασία της δημοσίας υγείας και πρέπει να πραγματοποιείται υποχρεωτικά τόσο στις περιοχές (ζώνες) συγκομιδής των δίθυρων

μαλακίων, όσο και στις μονάδες εξυγίανσης τους . Η συγκεκριμένη εξέταση ορίζεται από την Ευρωπαϊκή νομοθεσία να γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο ISO/TS 16649-3:2005 που είναι η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων

1.6 Αντικείμενο και στόχοι της μεταπτυχιακής διατριβής

Αντικείμενο της συγκεκριμένης έρευνας ήταν:

- i. Ο προσδιορισμός του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού σε σάρκα μύδιων *Mytilus galloprovincialis* περιλαμβάνοντας και την παρουσία-απαρίθμηση *E. coli*
- ii. Η παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών διαφόρων μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση σε αλιεύματα σάρκας μυδιών.
- iii. Ο προσδιορισμός του εμπορικού χρόνου ζωής τους και η διερεύνηση της παράτασής του με την προσθήκη κιτρικού οξέος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μύδια

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δυο μέρη. Στο πρώτο μέρος χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά παρασκευάσματα (μισοκέλυφος και σάρκα) όπου αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασίες 2 °C και 5 °C. Στο δεύτερο μέρος της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά παρασκευάσματα (σάρκα μυδιών σε αποστειρωμένο νερό, σάρκα μυδιών σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και σάρκα μυδιών σε νερό με προσθήκη κιτρικού οξέος ρυθμιζόμενου σε pH 4). Όλα τα παρασκευάσματα αποθηκεύτηκαν το ίδιο με το πρώτο μέρος του πειράματος σε θερμοκρασίες 2 °C και 5 °C.

Τα δείγματα μυδιών και στις δύο φάσεις του πειράματος προμηθεύτηκαν από την περιοχή των Κύμινων Θεσσαλονίκης σε συσκευασίες εμπορίου (σακουλάκια με πόσιμο νερό βρύσης) μεταφέρθηκαν σε πάγο μέχρι το εργαστήριο όπου και αποθηκεύτηκαν σε ψυγεία με θερμοκρασίες των 2 °C και 5 °C όπου και παρέμειναν από 7 μέχρι και 12 μέρες ανάλογα το ποσοστό αλλοίωσης που υπήρχε όπου πραγματοποιούνταν μετρήσεις κάθε δεύτερη μέρα.

Στην δεύτερη φάση αρχικά συλλέχθηκε θαλασσινό νερό όπου και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστρο. Με την ίδια μέθοδο αποστείρωσης έγινε και αυτή με πόσιμο νερό, όπου ένα μέρος του κρατήθηκε ώστε να παρασκευαστεί το νερό με την προσθήκη κιτρικού οξέος. Στο τελευταίο σκέλος αφού έγινε η προσθήκη ξινού όπου το διαλύσαμε αρκετά καλά με την χρήση πεχάμετρου και προσθήκη ΝΑΟΗ ρυθμίσαμε το pH του στους 4.

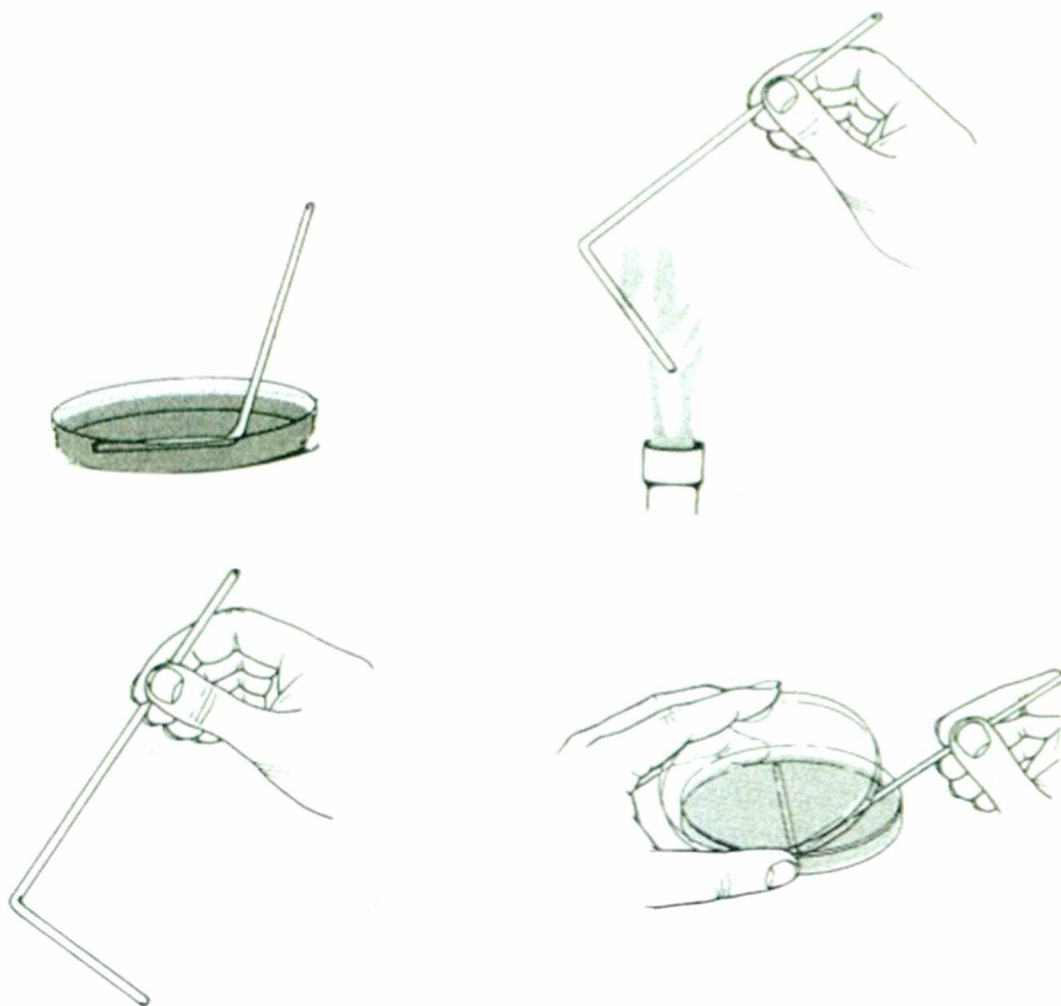
2.2 Μικροβιολογική ανάλυση

2.2.1 Απαρίθμηση μικροοργανισμών

Σάρκα μυδιού 25 gr εις τριπλούν για κάθε δειγματοληψία μεταφερόταν ασηπτικά σε σακούλα Stomacher όπου προστίθενται 225 gr MRD (Maximum Recovery Diluent-0,85% NaCl 0,1% πεπτόνη) και ομογενοποιούνται για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher. Οι αναλύσεις για την απαρίθμηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές για την απαρίθμηση των μικροοργανισμών στα θρεπτικά υποστρώματα, η επίστρωση (spread plate) και η ενσωμάτωση (pour plate).

Επίστρωση (spread plate) Ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να απαριθμηθεί εύκολα χρησιμοποιώντας την τεχνική της επίστρωσης. Στην τεχνική αυτή, λαμβάνεται ποσότητα 0,1 ml και στη συνέχεια διανέμεται ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με μια ειδική ράβδο επίστρωσης (Εικόνα 5).

Ενσωμάτωση (pour plate) Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί ο αριθμός των μικροβίων / mL σε ένα δείγμα. Στην τεχνική αυτή, λαμβάνεται ποσότητα 1 ml και στη συνέχεια προστίθεται το θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 5 Μέθοδος επίστρωσης μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα

2.2.2 Μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν

Με τη μέθοδο της επίστρωσης:

- Ολική Μεσόφυλη Χλωρίδα σε *Long & Hammer Agar (LH)* μετά απο επώαση στους 25 °C για 48 ώρες
- *Pseudomonas spp.* σε *Cephalothin Sodium Fusidate Ceftrimide agar (CFC)* μετά από επώαση στους 25 °C για 48 ώρες

Με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης

- Βακτήρια που παράγουν υδρόθειο σε *Iron Agar (IA)* με ενσωμάτωση 1 ml και μετά από επώαση στους 25 °C για 48 ώρες
- Enterobacteriaceae σε *Violet Red Bile Agar (VRBGA)* με ενσωμάτωση 1 ml και μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες
- Οξυγαλακτικά σε *MRS agar* με ενσωμάτωση 1 ml στους 25 °C για 72 ώρες μετά από επώαση.

2.2.3 Απαρίθμηση *E. coli*

Η απαρίθμηση του *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων (MPN) (3 αραιώσεις – 5 σωλήνες / αραιώση) σύμφωνα με το ISO 16649-3. Χρησιμοποιήθηκαν 15 – 20 μύδια τα οποία τοποθετήθηκαν σε σακούλα stomacher με MRD και ακολούθησε ομογενοποίηση σε συσκευή τύπου stomacher για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε καλλιέργεια σε Minerals Modified Glutamate Broth (MMGB) (x2) double strength : 10ml ομογενοποιημένου από αραιώση 10^{-1} και MMGB (x1) single strength, 1ml από αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} του ομογενοποιημένου των μυδιών. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24h. Στη συνέχεια, αναγράφηκαν αυτά που εμφάνισαν παρουσία οξέος (κίτρινος χρωματισμός του υλικού καλλιέργειας) και καλλιεργήθηκαν (stretch) σε Tryptone Bile X-Glucuronide Medium (TBX) και στους 44 °C για 20-24h. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των τρυβλίων για την παρουσία μπλε-πράσινων αποικιών και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε MPN/100g σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 MPN για δοκιμή 5 σωλήνων

Number of positive tubes			MPN index per 100 mL	Number of positive tubes			MPN index per 100 mL
First dilution set	Second dilution set	Third dilution set		First dilution set	Second dilution set	Third dilution set	
0	0	0	< 2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	30
1	1	0	4	5	0	2	40
1	1	1	6	5	1	0	30
1	2	0	6	5	1	1	50
2	0	0	4	5	1	2	60
2	0	1	7	5	2	0	50
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	90
2	2	0	9	5	3	0	80
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	170
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
4	0	0	13	5	4	4	350
4	0	1	17	5	5	0	240
4	1	0	17	5	5	1	300
4	1	1	21	5	5	2	500
4	1	1	26	5	5	3	900
4	2	0	22	5	5	4	1600
				5	5	5	≥ 1600

2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Για την οργανοληπτική αξιολόγηση των προϊόντων, επιλέχθηκε μια ομάδα 3 ατόμων. Πριν κάθε οργανοληπτική εξέταση γινόταν ένα προπαρασκευαστικό στάδιο με σκοπό να γίνει συζήτηση και να διευκρινισθεί κάθε ιδιότητα που θα έπρεπε να εκτιμηθεί. Η δοκιμασία αυτή έγινε όταν υπήρξε ομοφωνία ως προς τον τρόπο και το μέσο που θα πραγματοποιούνταν. Οι δοκιμαστές εκτιμούσαν την εξωτερική εμφάνιση το χρώμα και την οσμή της σάρκας των μυδιών σύμφωνα με την ακόλουθη κλίμακα.

➤ 3 = άριστη εμφάνιση, φωτεινός χρωματισμός ένδειξη του κρέατος νωπών μυδιών, εξαιρετική οσμή

➤ 2 = καλή εμφάνιση, ελαφρά σκούρος χρωματισμός, ελαφρά θολερότητα της συσκευασίας, καλή οσμή.

➤ 1 = όχι καλή εμφάνιση σκοτεινός χρωματισμός σχετικά μη αποδεκτός, πιο έντονη θολερότητα της συσκευασίας, ενοχλητική οσμή

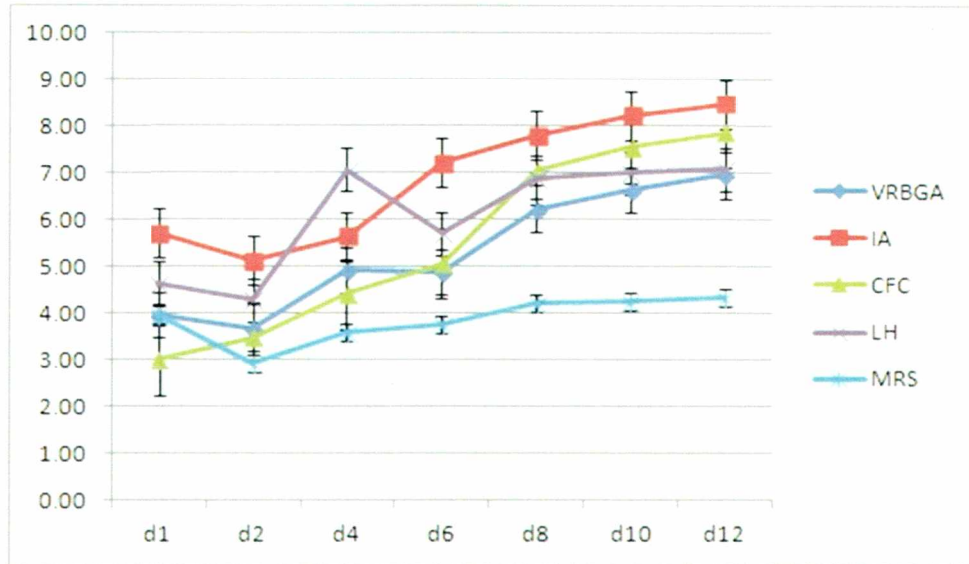
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σάρκα Μυδιών (Πρώτη Φάση)

3.1.1 Μικροβιακός πληθυσμός

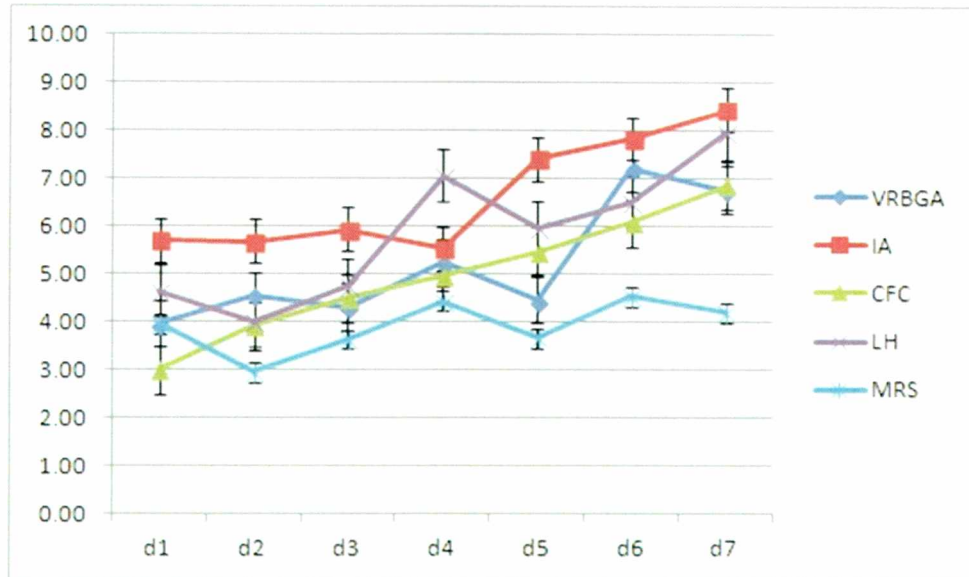
Στην πρώτη φάση του πειράματος προμηθεύτηκαν σάρκα μυδιών (ψίχα) και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης και συντήρησης (στους 2 °C και 5 °C αντίστοιχα). Από τους μέσους όρους 3 επαναλήψεων των μικροβιακών μετρήσεων προέκυψαν οι εξής μεταβολές :

Στο σχήμα 1 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 2 °C. Σε διάρκεια 12 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστικε και ο μέσος όρους τους όπου αποτυπώνετε στο παραπάνω σχήμα. Βλέπουμε μια σταθερή αύξηση σχεδόν σε όλα τα είδη των βακτηριδίων μέχρι και την έκτη μέρα (d6) με τους συντελεστές να αυξάνουν φυσιολογικά τις επόμενες μέρες.



Σχήμα 1: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με πόσιμο νερό κατά την συντήρηση στους 2 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., LH η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Στο σχήμα 2 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 5 °C. Σε διάρκεια 7 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους όπως αποτυπώνεται στο παραπάνω σχήμα. Είναι φανερό σε σχέση με αυτή των 2 °C το ποσοστό αύξησης του μικροβιακού φορτίου καθιστώντας μάλιστα και έως μια μέρα λιγότερη την εμπορική αξία του συγκεκριμένου αλλειύματος.



Σχήμα 2: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με πόσιμο νερό κατά την συντήρηση στους 5 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., LH η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.1.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Οσμή

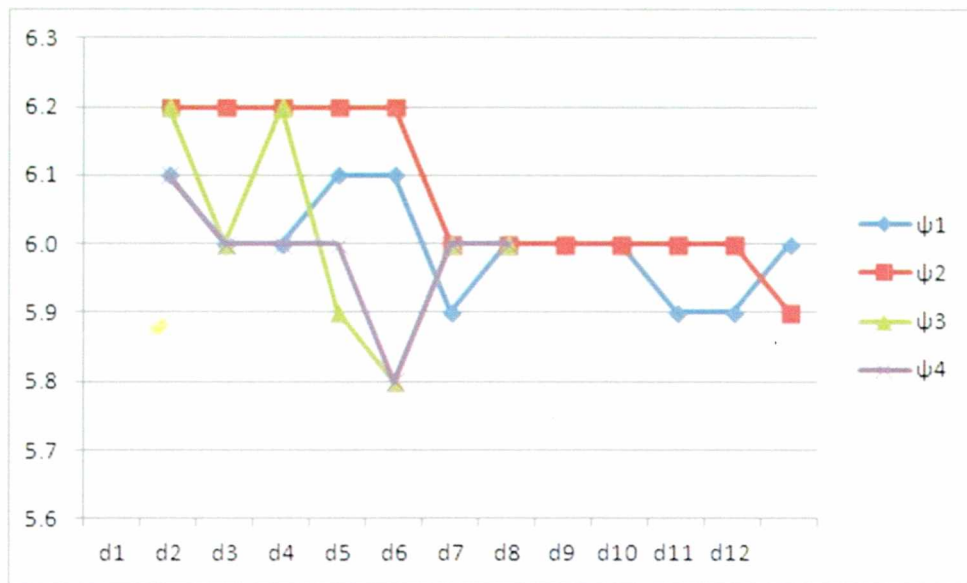
Πίνακας 2 Πίνακας οργανοληπτικής αξιολόγησης της οσμής σάρκας μυδιών της πρώτης φάσης του πειράματος. ψ_1, ψ_2 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και ψ_3, ψ_4 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Όπου 3= Άριστο, 2= Μέτριο, 1= Κακό.

ΟΣΜΗ	ψ_1	ψ_2	ψ_3	ψ_4
d1	3	3	3	3
d2	3	3	3	3
d3	3	3	3	3
d4	2	2	2	2
d5	-	-	2	2
d6	2	2	-	-
d7	-	-	1	1
d8	1	1	-	-
d9	-	-	-	-
d10	1	1	-	-
d11	-	-	-	-
d12	1	1	-	-

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής και της εξωτερικής εικόνας της συσκευασίας των μυδιών προκύπτει ότι μετά την 6 με 7 (d6-d7) ημέρα συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης αποτελεί και το μέγιστο του εμπορικού χρόνου ζωής του.

pH

Μία άλλη μεταβλητή η οποία μετρήθηκε και αξιολογήθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αυτή της τιμής του pH. Όπου ψ1,ψ2 σάρκα μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και ψ3,ψ4 σάρκα μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του pH κρίνονται φυσιολογικές.



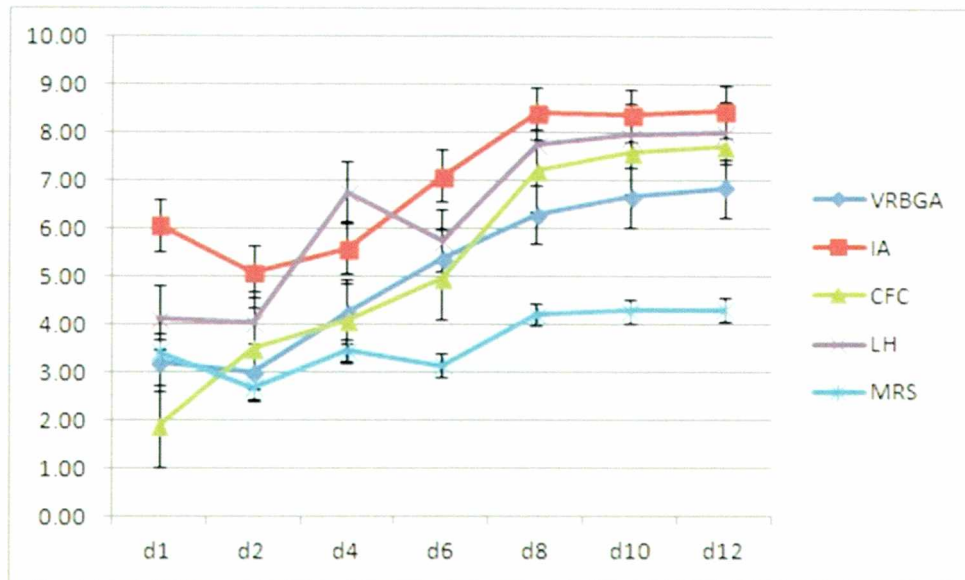
Σχήμα 3: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε σάρκα μυδιών της πρώτης παρτίδας όπου ψ1,ψ2 δείγματα στους 2 °C και ψ3,ψ4 δείγματα στους 5 °C

3.2 Μισοκέλυφος μυδιών

3.2.1 Μικροβιακός πληθυσμός

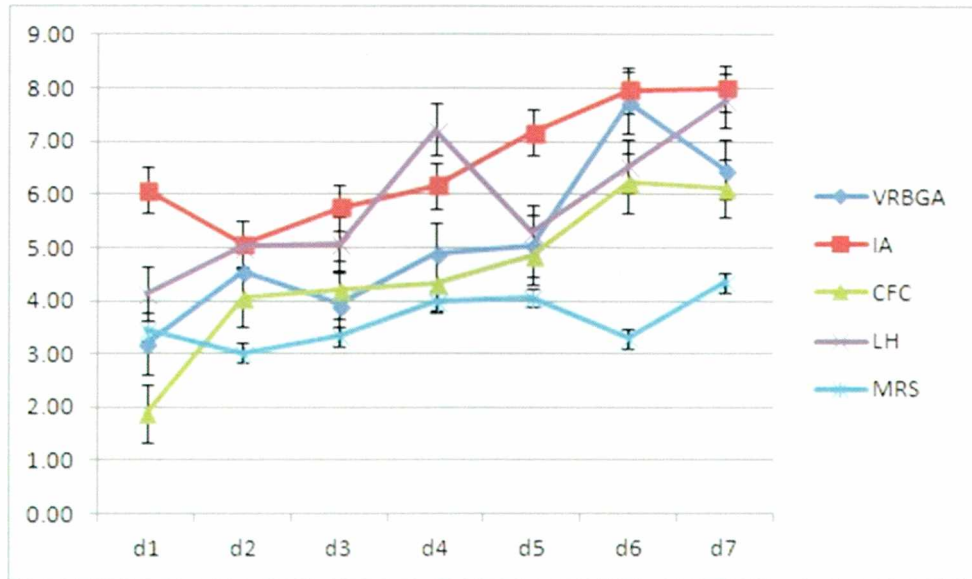
Στην πρώτη φάση του πειράματος προμηθεύτηκαν μισοκέλυφος μυδιών και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης και συντήρησης (στους 2 °C και 5 °C αντίστοιχα). Από τους μέσους όρους 3 επαναλήψεων των μικροβιακών μετρήσεων προέκυψαν οι εξής μεταβολές :

Στο σχήμα 4 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου του μισοκέλυφους μυδιών σε θερμοκρασία 2 °C. Σε διάρκεια 12 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστικε και ο μέσος όρος τους όπου αποτυπώθη στο παραπάνω σχήμα. Παρόμοια είναι και η εικόνα με αυτή της σάρκας μυδιών του ίδιου συσκευάσματος έχοντας την έκτη μέρα (d6) αυτή όπου ξεκινάει η αλλοίωση του συγκεκριμένου εμπορεύματος, με μία ελάχιστα μεγαλύτερη διάρκεια.



Σχήμα 4: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών του μισοκέλυφους μυδιών σε πλαστική συσκευασία με πόσιμο νερό κατά την συντήρηση στους 2 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., LH η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Στο σχήμα 5 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου μισοκέλυφους μυδιών σε θερμοκρασία 5 °C. Σε διάρκεια 7 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες μισοκέλυφους μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρους τους, όπως αποτυπώθηκε στο παραπάνω σχήμα. Είναι φανερό σε σχέση με αυτή των 2 °C το ποσοστό αύξησης του μικροβιακού φορτίου καθιστώντας μάλιστα και έως μια μέρα λιγότερη την εμπορική αξία του συγκεκριμένου αλλιεύματος.



Σχήμα 5: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών του μισοκέλυφους μυδιών σε πλαστική συσκευασία με πόσιμο νερό κατά την συντήρηση στους 5 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., LH η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.2.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Οσμή

Πίνακας 3 Πίνακας οργανοληπτικής αξιολόγησης της οσμής σάρκας μυδιών της πρώτης φάσης του πειράματος. κ1,κ2 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και κ3, κ4 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Όπου 3= Άριστο, 2= Μέτριο , 1= Κακό.

ΟΣΜΗ	κ1	κ2	κ3	κ4
d1	3	3	3	3
d2	3	3	3	3
d3	3	3	3	3
d4	2	2	2	2
d5	-	-	2	2
d6	2	2	2	2
d7	-	-	1	1
d8	1	1	-	-
d9	-	-	-	-
d10	1	1	-	-
d11	-	-	-	-
d12	1	1	-	-

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής και της εξωτερικής εικόνας της συσκευασίας των μυδιών προκύπτει ότι μετά την 7 (d7) ημέρα συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης αποτελεί και το μέγιστο του εμπορικού χρόνου ζωής του.

pH

Μία άλλη μεταβλητή η οποία μετρήθηκε και αξιολογήθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αυτή της τιμής του pH. Όπου κ1,κ2 μισοκέλυφος μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και κ3,κ4 μισοκέλυφος μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του pH κρίνονται φυσιολογικές.



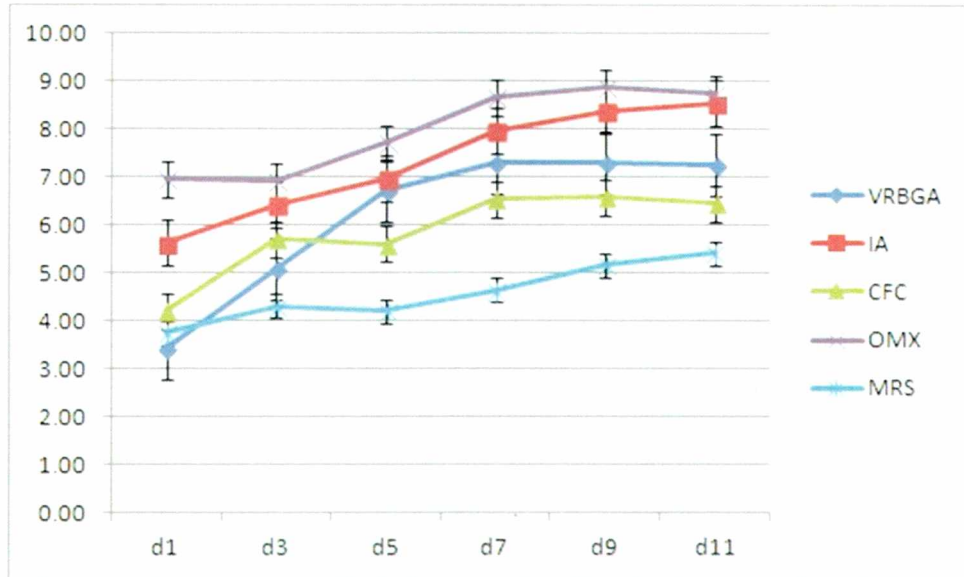
Σχήμα 6: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε μισοκέλυφος μυδιών όπου κ1,κ2 δείγματα στους 2 °C και κ3,κ4 δείγματα στους 5 °C

3.3 Σάρκα μυδιών (δεύτερη φάση)

3.3.1 Μικροβιακός πληθυσμός

Στην δεύτερη φάση του πειράματος προμηθεύτηκαν ξανά σάρκα μυδιών (ψίχα) σε αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης και συντήρησης (στους 2 °C και 5 °C αντίστοιχα). Από τους μέσους όρους 3 επαναλήψεων των μικροβιακών μετρήσεων προέκυψαν οι εξής μεταβολές :

Στο σχήμα 7 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 2 °C. Σε διάρκεια 11 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρους τους, όπως αποτυπώθηκε στο παραπάνω σχήμα. Ουσιαστικά αυτή η διαδικασία αποτελούσε και το control του πειράματος έχοντας εως γνώμονα και τα αποτελέσματα από την πρώτη του φάση. Η εικόνα που παρατηρούμε είναι σχεδόν ίδια με αυτή της πρώτης φάσης κρίνοντας εώς κρίσιμη ημέρα εμπορικής αξίας του συγκεκριμένου προϊόντος την έκτη (d6) με σχετικά ίδιες μεταξύ τους αποκλίσεις.



Σχήμα 7: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με αποστειρωμένο νερό κατά την συντήρηση στους 2 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Στο σχήμα 8 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 5 °C. Σε διάρκεια 10 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρος τους, όπως αποτυπώθηκε στο σχήμα 6. Αποτελώντας και αυτή η διαδικασία το control της δεύτερης φάσης του πειράματος δεν καταγράφονται διαφορές με αυτή του πρώτου καθιστώντας και αυτή έως εμπορική αξία του προϊόντος στο 5 °C την τέταρτη μέρα (d4).



Σχήμα 8: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με αποστειρωμένο νερό κατά την συντήρηση στους 5 °C. Όπου VRBGA τα *Enterobacteriaceae*, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas spp.*, OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.3.2 Οργανοληπτική αξιόγηση

Οσμή

Πίνακας 4 Πίνακας οργανοληπτικής αξιολόγησης της οσμής σάρκας μυδιών της δεύτερης φάσης του πειράματος. c1,c2 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και c3, c4 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Όπου 3= Άριστο, 2= Μέτριο , 1= Κακό.

ΟΣΜΗ	c1	c2	c3	c4
d1	3	3	3	3
d2	-	-	3	3
d3	3	3	3	3
d4	-	-	3	3
d5	3	3	-	-
d6	-	-	2	2
d7	1	1	-	-
d8	-	-	1	1
d9	1	1	-	-
d10	-	-	1	1
d11	1	1	-	-

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής και της εξωτερικής εικόνας της συσκευασίας των μυδιών προκύπτει ότι μετά την 7 (d7) ημέρα συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης αποτελεί και το μέγιστο του εμπορικού χρόνου ζωής του.

pH

Μία άλλη μεταβλητή η οποία μετρήθηκε και αξιολογήθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αυτή της τιμής του pH. Όπου c1,c2 σάρκα μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και c3,c4 σάρκα μυδιών σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του pH κρίνονται φυσιολογικές.



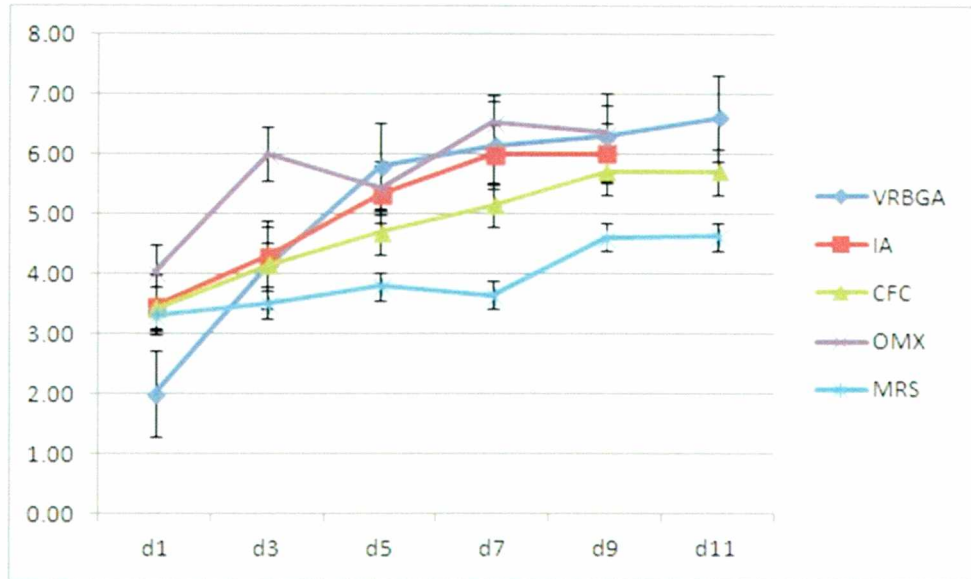
Σχήμα 9: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε σάρκα μυδιών της δεύτερης παρτίδας όπου c1,c2 δείγματα στους 2 °C και c3,c4 δείγματα στους 5 °C

3.4 Σάρκα μυδιών σε θαλασσινό νερό

3.4.1 Μικροβιακός πλυθυσμός

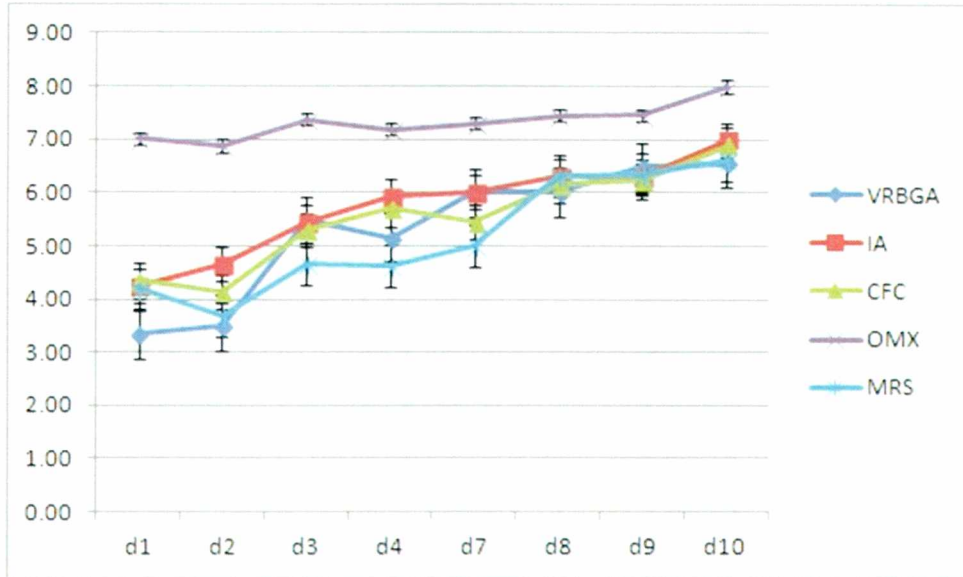
Στην δεύτερη φάση του πειράματος προμηθεύτηκαν σάρκα μυδιών σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης και συντήρησης (στους 2 °C και 5 °C αντίστοιχα). Από τους μέσους όρους 3 επαναλήψεων των μικροβιακών μετρήσεων προέκυψαν οι εξής μεταβολές :

Στο σχήμα 10 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 2 °C. Σε διάρκεια 11 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρους τους όπως αποτυπώθηκε και στο παραπάνω σχήμα. Είναι φανερό ότι η χρήση του αποστειρωμένου θαλασσινού νερού εμποδίζει και την ταχεία αύξηση του μικροβιακού φορτίου δίνοντας ελαφρός μια μικρή παράταση στην εμπορική αξία τους προϊόντος ουσιαστικά κατά μία μέρα (d7).



Σχήμα 10: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό κατά την συντήρηση στους 2 °C. Όπου VRBGA τα Enterobacteriaceae, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Στο σχήμα 11 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 5 °C. Σε διάρκεια 10 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρους τους, όπως αποτυπώθηκε στο παραπάνω σχήμα. Είναι εμφανής η διαφορά που υπάρχει σε αυτή των 2 °C με εμπορική αξία του συγκεκριμένου προϊόντος να είναι λίγο μικρότερη στην έκτη μέρα (d6) και σαφώς όμοια με αυτή της σάρκας μυδιών σε εμπορική συσκευασία.



Σχήμα 11: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό κατά την συντήρηση στους 5 °C. Όπου VRBGA τα *Enterobacteriaceae*, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas* spp., OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.4.2 Οργανολυπτική αξιολόγηση

Οσμή

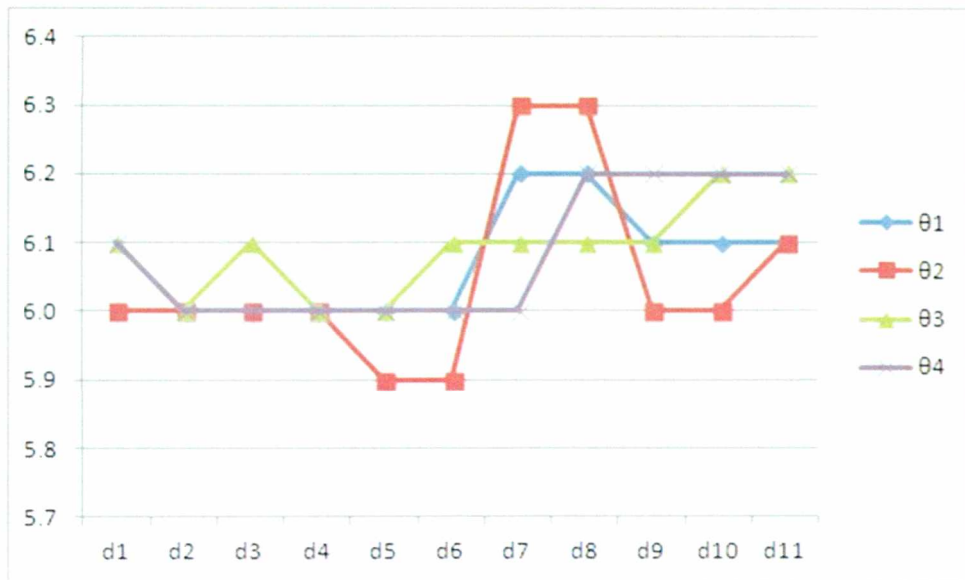
Πίνακας 5 Πίνακας οργανολήπτικης αξιολόγησης της οσμής σάρκας μυδιών σε θαλασσινό νερό της δεύτερης φάσης του πειράματος. θ1,θ2 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και θ3, θ4 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Όπου 3= Άριστο, 2= Μέτριο , 1= Κακό.

ΟΣΜΗ	θ1	θ2	θ3	θ4
d1	3	3	3	3
d2	-	-	3	3
d3	3	3	3	3
d4	-	-	3	3
d5	3	3	-	-
d6	-	-	2	2
d7	1	1	-	-
d8	-	-	1	1
d9	1	1	-	-
d10	-	-	1	1
d11	1	1	-	-

Σύμφωνα με την οργανολήπτική αξιολόγηση της οσμής και της εξωτερικής εικόνας της συσκευασίας των μυδιών προκύπτει ότι μετά την 7 (d7) ημέρα συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης αποτελεί και το μέγιστο του εμπορικού χρόνου ζωής του.

pH

Μία άλλη μεταβλητή η οποία μετρήθηκε και αξιολογήθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αυτή της τιμής του pH. Όπου θ1,θ2 σάρκα μυδιών σε θαλασσινό νερό με θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και θ3,θ4 σάρκα μυδιών σε θαλασσινό νερό με θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του pH κρίνονται φυσιολογικές.



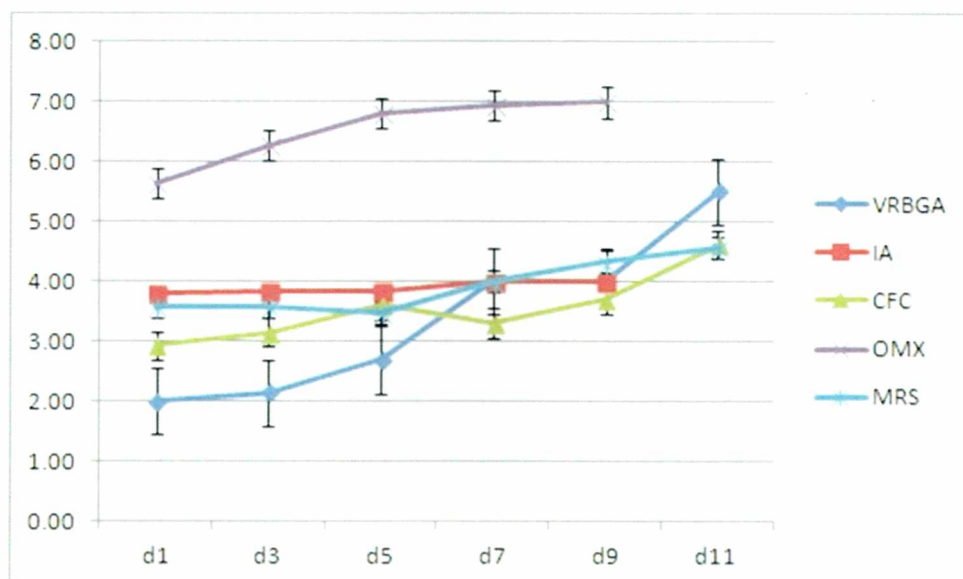
Σχήμα 12: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε σάρκα μυδιών με προσθήκη αποστειρωμένου θαλασσινού νερού όπου θ1,θ2 δείγματα στους 2 °C και θ3,θ4 δείγματα στους 5 °C

3.5 Σάρκα μυδιών σε συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος

3.5.1 Μικροβιακός πληθυσμός

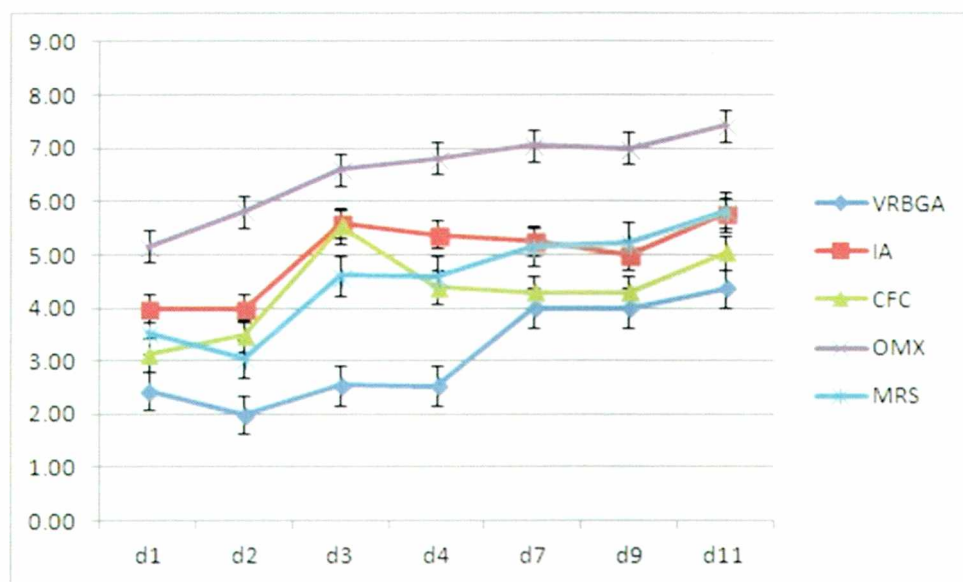
Στην δεύτερη φάση του πειράματος προμηθεύτηκαν σάρκα μυδιών όπου τοποθετήθηκαν σε συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος (ξυνό) κεντραρισμένο σε pH 4.0 και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης και συντήρησης (στους 2 °C και 5 °C αντίστοιχα). Από τους μέσους όρους 3 επαναλήψεων των μικροβιακών μετρήσεων προέκυψαν οι εξής μεταβολές :

Στο σχήμα 13 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 2 °C. Σε διάρκεια 11 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών με προσθήκη κιτρικού οξέος καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρους τους, όπως αποτυπώνετε στο παραπάνω σχήμα. Το χαμηλό pH αποτελεί ολοφάνερα πλέον καταλήτη για την εκτεταμένη παράταση της εμπορικής αξιάς του προϊόντος όπου σε συνδιασμό με τον τρόπο συντήρησης να ξεπερνάμε και την έκτη μέρα (d6) έχοντας χαμηλό μικροβιακό φορτίο σε σχέση με αυτό της κλασσικής εμπορικής συσκευασίας ακόμα και πέρα της δέκατης μέρας (d10).



Σχήμα 13: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος σε αποστειρωμένο νερό κατά την συντήρηση στους 2 °C. Όπου VRBGA τα *Enterobacteriaceae*, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas spp.*, OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Στο σχήμα 14 παρατηρούμε την καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου της σάρκας μυδιών σε θερμοκρασία 5 °C. Σε διάρκεια 11 ημερών από δυο διαφορετικές συσκευασίες σάρκας μυδιών με προσθήκη κιτρικού οξέος, καταγράφηκαν λογαριθμικά οι αποικίες βακτηρίων στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τους και στο τέλος υπολογίστηκε και ο μέσος όρους τους, όπως αποτυπώνετε στο παραπάνω σχήμα. Η εικόνα εξακολουθεί να είναι ίδια με αυτή των 2 °C και σαφώς καλύτερη εξίσου με αυτή των control δειγμάτων έχοντας και πάλι μεγαλύτερη εμπορική παράταση στο συγκεκριμένο προϊόν.



Σχήμα 14: Πληθυσμιακές μεταβολές των κυριότερων μικροοργανισμών της σάρκας μυδιών σε πλαστική συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος σε αποστειρωμένο νερό κατά την συντήρηση στους 5 °C. Όπου VRBGA τα *Enterobacteriaceae*, IA τα Υδροθειούχα βακτήρια, CFC τα *Pseudomonas spp.*, OMX η OMX και MRS τα οξυγαλάκτικα. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

3.5.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Οσμή

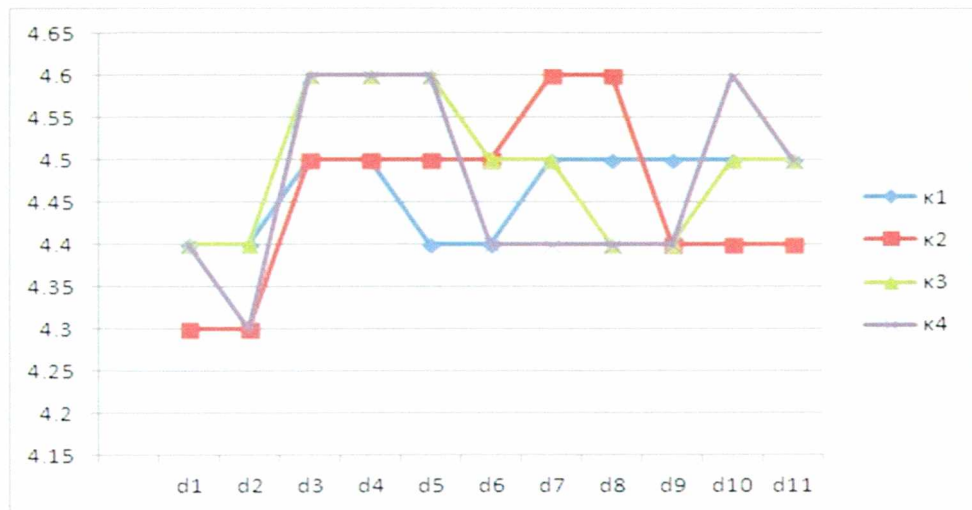
Πίνακας 6 Πίνακας οργανοληπτικής αξιολόγησης της οσμής σάρκας μυδιών σε συσκευασία με προσθήκη κιτρικού οξέος της δεύτερης φάσης του πειράματος. κ1,κ2 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 2 °C και κ3, κ4 ίδιων δειγμάτων σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Όπου 3= Άριστο, 2= Μέτριο , 1= Κακό.

ΟΣΜΗ	κ1	κ2	κ3	κ4
d1	3	3	3	3
d2	-	-	3	3
d3	3	3	3	3
d4	-	-	3	3
d5	3	3	-	-
d6	-	-	2	2
d7	2	2	-	-
d8	-	-	2	2
d9	1	1	-	-
d10	-	-	1	1
d11	1	1	1	1

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής και της εξωτερικής εικόνας της συσκευασίας των μυδιών προκύπτει ότι και μετά την 7 (d7) ημέρα συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος με την προσθήκη κιτρικού οξέος και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης μέχρι και την 9 (d9) ημέρα παρατηρώντας μικρές αλλιώσεις στην σάρκα και έντονη οσμή του κιτρικού οξέος.

pH

Μία άλλη μεταβλητή η οποία μετρήθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν και αυτή του pH. Από τις συσκευασίες που παρασκευάστηκαν και έγινε προσθήκη του κιτρικού οξέος υπήρξε μια παρέμβαση ώστε το pH να υπάρχει σταθερά στην τιμή του 4 και όχι σε αυτή του 2,2 με ένα διάλυμα οξέος μας προδίδει. Στα παρακάτω σχήματα προδίδονται οι τιμές αυτές για κάθε συσκευασία ξεχωριστά κρίνοντας αυτές τις τιμές τους φυσιολογικές.



Σχήμα 15: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε σάρκα μυδιών με προσθήκη κιτρικού οξέος όπου κ1,κ2 δείγματα στους 2 °C και κ3,κ4 δείγματα στους 5 °C

3.6 *Escherichia coli*

Όπως προαναφέραμε για την ανίχνευση ή όχι του εντεροβακτηρίου *E.coli* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων (MPN) Donovan et al. 1998). Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία και σύμφωνα με τον πίνακα τελικής καταμέτρησης και ταυτοποίησης *E.coli* (Πίνακας 1) προέκυψε ότι για τα δείγματα σάρκας μυδιών σε MPN/100g έχουμε 9 cfu/100g . Αντίστοιχα για τα δείγματα μισοκέλυφους από τον ίδιο πίνακα προέκυψε ότι σε MPN/100g έχουμε 7 cfu/100g. Συνεπώς και στις δύο περιπτώσεις τα όρια βρίσκονταν εντός των ορίων που ορίζει η νομοθεσία (Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν ο μικροβιολογικός έλεγχος σε σάρκα μυδιών διαφορετικών παρασκευασμάτων στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλονίκης, ο καθορισμός του ποσοστού του εντεροβακτηριδίου *Escherichia coli* και η παράταση του εμπορικού χρόνου ζωής με την προσθήκη κιτρικού οξέος σε παρασκεύασμα σάρκας μυδιών με ρυθμισμένο σε pH 4,0.

4.1 Μικροβιακό φορτίο μυδιών

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της καταμέτρησης της OMX στα δείγματα μυδιών προέκυψε ότι οι μέσοι όροι των παρασκευασμάτων σε θερμοκρασία των 2 °C και στα δυο μέρη του πειράματος ξεκινά με την χαμηλότερη τιμή στα 4,04 log cfu/g για το παρασκεύασμα με το θαλασσινό νερό και έχοντας έως μεγαλύτερη αυτή των 6,98 log cfu/g για το δείγμα σάρκας μυδιών σε αποστειρωμένο νερό του δεύτερου μέρους του πειράματος. Από την άλλη μεριά στα παρασκευάσματα που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία των 5 °C παρατηρούμε σαφώς πιο έντονη ανάπτυξη των βακτηρίων λόγω και της θερμοκρασίας , με χαμηλότερη τιμή αυτή της σάρκας μυδιών του πρώτου μέρους του πειράματος στα 4,65 log cfu/g και μεγαλύτερη αυτή της σάρκας μυδιών του δεύτερου μέρους του πειράματος στα 8,12 log cfu/g.

Σε αντίστοιχες μελέτες έχουν παρατηρηθεί μικρότερα ποσοστά της ολικής μεσόφυλης χλωρίδας κατά την έκτη ημέρα της συντήρησης τους 3,7 log cfu/g (Vasakou et al 2000) και 4,32 log cfu/gr (Costanzo, Sarno, Maione, Santoro 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις υπήρχαν δείγματα σάρκας μυδιών μόνο σε θερμοκρασία συντήρησης στους 4 °C του γένους *Mitylus galloprovincialis* και οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται κατά κύριο λόγο της περισυλλογής από τις διαφορετικές περιοχές καθώς διαδραματίζει σημαντικό παράγοντα και η ποιότητα των νερών στα οποία τα μύδια καλλιεργούνται. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων του προϊόντος γενικότερα στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα λόγω κυρίως της φρεσκότατης σάρκας τους η οποία θεωρητικά είναι απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς (Huss 1950). Μετά παρατηρείται μια σχετική σταθερότητα από την έκτη μέρα προς το τέλος τις διαδικασίας του πειράματος και στις δύο φάσεις. Εξαίρεση αποτελεί αυτό των παρασκευασμάτων με προσθήκη κιτρικού οξέος.

Οι ιχθύες οι οποίοι συνήθως προέρχονται από μολυσμένα ύδατα φέρουν μεγάλους αριθμούς βακτηριών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Huss 1995). Τα *Enterobacteriaceae* παράγουν κυρίως TMA και TMAO, κετόνες, αλδεύδες, εστέρες και αμμωνία από αμινοξέα, οξέα και υδατάνθρακες (Leisner & Gram 1999). Δεδομένου ότι αποτελούν και βακτηρία όπου συντελούν κυρίαρχη σημασία στην αλλοίωση της σάρκας (Gram et al. 1987, Edwards et al. 1987, Dainty et al. 1989, Gram & Huss 1996, Leisner & Gram 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000) αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δυο φάσεις του πειράματος δεν είχαμε μεγάλα ποσά. Τα ποσοστά της πρώτης μέρας όλων των παρασκευασμάτων είναι εξαιρετικά χαμηλά σε σύγκριση με αυτή παρόμοιων πειραμάτων με συγκεκριμένο παράδειγμα όπου όλες οι τιμές μας βρίσκονται περίπου στα 4 log. cfu/gr σε αντίθεση με αυτή της περίπτωσης όπου κυμείνονταν στα 5,66 cfu/gr (Gonkur, Gucukoglu, Cadirci, Kevenk, Alisarli 2010). Όλες οι συσκευασίες έχουν τα αναμενόμενα ποσοστά *Enterobacteriaceae* με μέση αλλοίωση την έβδομη (d7) μέρας συντήρησής τους και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησής τους. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι ίδια σε ότι αφορά τις συσκευασίες με προσθήκη κιτρικού οξέος. Από την πρώτη μέρα κιόλας συντήρησής τα επίπεδα των *Enterobacteriaceae* κατεβαίνουν αισθητά στα 2 log. cfu/gr παραμένοντας το ίδιο λίγα και σταθερά αρκετές μέρες δίνοντας έτσι και την δυνατότητα παράτασης του εμπορικού χρόνου ζωής του συγκεκριμένου προϊόντος. Σε ανάλογο πείραμα παρατηρείται ακριβώς το ίδιο φαινόμενο αλλά με διαφορετικό οξύ και χαμηλότερο pH (υδροξυπανατικό οξύ, pH = 2.9-3.2).

Τα βακτήρια *Pseudomonas spp.* αποτέλεσαν έναν από τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς κυρίως στα παρασκευάσματα σάρκας μυδιών και στις δυο φάσεις και θερμοκρασίες συντήρησης του πειράματος με ποσοστά της τάξεων των 6,22 με 7,22 log cfu/gr. στο τέλος της εμπορικής ζωής των σκευασμάτων. Σύμφωνα με Sallam (2007), τα άλατα του κιτρικού οξέος επιδρούν σημαντικά στους πληθυσμούς των *Pseudomonas spp.* και των βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο, καθώς ο ειδικός ρυθμός αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ήταν μικρότερος στις συσκευασίες με προσθήκη κιτρικού σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις. Ενδεικτικά την πέμπτη μέρα (d5) όπου αποτελεί και κρίσιμο σημείο εμπορικής αξίας, στις περισσότερες συσκευασίες και στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης έχουμε ποσοστά από 5,71 μέχρι και 7,22 log cfu/gr. ενώ στις αντίστοιχες αυτές του κιτρικού τα ποσοστά είναι 3,60 log cfu/gr. σχεδόν τα μισά σε παρόμοια επίπεδα και σαφώς λιγότερα μέχρι και την εντεκάτη μέρα (d11).

Τα υδροθειούχα βακτήρια ενώ αποτελούν τους EAM για τους ιχθύες που προέρχονται από τις βόρειες θάλασσες και αποθηκεύονται στους 0 °C (Gram et al. 1987), είναι οι δεύτεροι πιο επικρατέστεροι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou et al. 2007), κατά κύριο λόγο στους 0 °C και 5 °C (Koutsoumanis & Nychas 2000).

Στην πρώτη φάση του πειράματος τα ποσοστά και της σάρκας και του μισοκέλυφους μυδιών είναι με μια μικρή απόκλιση ίδια ξεκινώντας και στις δυο θερμοκρασίες κοντά στα 6,00 log cfu/gr με ακριβής ίδιες τιμές μέχρι και την έκτη μέρα (d6) φτάνοντας μέχρι και τα 7,10 log cfu/gr. Σε παρόμοιες μελέτες τα ποσοστά βακτηρίων που παράγουν υδρόθειο είναι ακριβώς στα ίδια επίπεδα. Στην δεύτερη φάση του πειράματος τα δείγματα μας που βρίσκονται σε συσκευασία με την προσθήκη του κιτρικού οξέος είναι σαφώς λιγότερα ξεκινώντας από τους 4,00 log cfu/gr μέχρι και την τελευταία μέρα στους 2 °C με ένα λογάριθμο παραπάνω από ότι στους 5 °C αποτελώντας δείκτη παραπάνω συντήρησης κυρίως λόγω των χαμηλών ποσοστών του pH. Στις υπόλοιπες συσκευασίες η εικόνα είναι ίδια με αυτή της πρώτης φάσης του πειράματος έχοντας σαν εξαίρεση αυτή με την προσθήκη αποστειρωμένου θαλασσινού νερού τις πρώτες μέρες συντήρησης με 4,00 log cfu/gr. Στην διάρκεια όμως των ημερών παρουσιάζεται αυξημένα ποσοστά ίδια με αυτά που παρουσιάζονται στις υπόλοιπες συσκευασίες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και γενικότερα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διακρίνονται για τις ανταγωνιστικές τους ιδιότητες παράγοντας διάφορες ουσίες έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των ιχθύων. Τα οξυγαλακτικά παράγουν κυρίως βακτηριοσίνες (Adams & Nicolaidis 1997) και γενικότερα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παράγουν ουσίες όπως είναι η NH₃ και η TMA, οι οποίες δρουν τοξικά έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών. Ως αποτέλεσμα, οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν και επηρεάζει ο ένας την αύξηση του άλλου (Boddy & Wimpenny 1992).

Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός οξυγαλακτικών δεν έχει μεγάλες αποκλίσεις σε καμία από τις συσκευασίες μυδιών και στις δύο φάσεις και θερμοκρασίες συντήρησης του πειράματος. Ξεκινώντας κατά μέσο όρο στα 3,50 log. cfu/gr τα ποσοστά είναι ίδια με παρόμοιες μελέτες όπου παρουσιάζουν κοντά στα 3,00 log cfu/gr για την νωπή σάρκα μυδιών (Άννα Κυριαζή – Παπαδοπούλου 2002). Κατά την διάρκεια της λήξης του εμπορικού χρόνου ζωής (d7) βλέπουμε μια αύξηση μόνο μιας μονάδας η οποία συντηρείται μέχρι και την λήξη της μελέτης. Τα χαμηλά αυτά ποσοστά για μεγάλο χρονικό διάστημα συντήρησης μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παρεμποδίζεται αισθητά σε όλες τις συσκευασίες η δημιουργία παθογόνων οργανισμών σε όλες τις ημέρες και θερμοκρασίες συντήρησης τους.

4.2 *Escherichia coli*

Το *E.coli* είναι σήμερα ο πιο κοινός προαιρετικά αναερόβιος οργανισμός στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και αποτελεί πιο εξειδικευμένο δείκτη κοπρανόδους μόλυνσης των τροφίμων από τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων. Η παρουσία του στα τρόφιμα μπορεί να αντιμετωπιστεί με θερμική επεξεργασία στους 68.3⁰ C για 15 min (Temelli et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νωπή σάρκα μυδιών σε διαφορετικές τροποποιημένες συσκευασίες καθώς και σάρκα μυδιών σε μισοκέλυφος.

Σύμφωνα με την ισχύουσα κοινοτική νομοθεσία (Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004, Κανονισμός (ΕΚ) 854/2004, Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005) ο προσδιορισμός του πληθυσμού του *E. coli*, ως μικροοργανισμού δείκτη, στα ζώντα δίθυρα μαλάκια χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου της μόλυνσης των δίθυρων μαλακίων με βακτηριακά ή/και ιογενή παθογόνα μικρόβια και δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10 MPN/100 gr. Στις δύο μετρήσεις για την ανίχνευση του κολοβακτηρίου *E. Coli* είχαμε 9 cfu/100g για την σάρκα μυδιών και 7 cfu/100g για το μισοκέλυφος μυδιών. Συνεπάγεται ότι σε στις δύο περιπτώσεις είναι εντός των φυσιολογικών και νομοθετικών ορίων.

4.4 Ενεργός οξύτητα (pH)

Το pH της σάρκας μυδιών και στις δύο φάσεις του πειράματος ήταν σταθερό καθόλη την διάρκεια των ημερών της μελέτης με τιμές $6.4 \pm 0,10$, ίδιες τιμές υπήρχαν και σε ανάλογες μελέτες (*Basakou et al. 2002, Καστανίδου-Μανούσου 1992*). Αντιθέτως ελαφρά πτώση έχουμε και στις συσκευασίες με το μισοκέλυφος και σε αυτή με την σάρκα μυδιών με την προσθήκη θαλασσινού νερού με τιμές στα $6,0 \pm 0,10$. Αντιθέτως το pH στις συσκευασίες σάρκας μυδιών με την προσθήκη κιτρικού οξέος ήταν ρυθμισμένες στα $4,0 \pm 0,20$.

Το pH έχει πάρα πολύ μεγάλη σημασία στην τεχνολογία των τροφίμων καθώς είναι ο παράγοντας εκείνος που επηρεάζει την ποιότητα των μαγειρευμένων τροφίμων. Τα βακτήρια τα οποία προκαλούν αλλοιώσεις δεν αναπτύσσονται σε χαμηλό pH (*Love, 1992*) αλλά σε υψηλό, όπου η διαδικασία αποσύνθεσης επιταχύνεται

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία συμπερασματικά διαπιστώνεται ότι:

- i. Από τον μικροβιολογικό έλεγχο των μυδιών του γένους *Mytilus galloprovincialis* στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλονίκης τα όρια του κολοβακτηριδίου *E. Coli* ήταν μέσα στα επιτρεπτά όρια που ορίζει η νομοθεσία.
- ii. Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση όλων των σκευασμάτων εκτός αυτού της σάρκας μυδιών με την προσθήκη κιτρικού λόγου χαμηλού pH, ο εμπορικός χρόνος ζωής είναι κατά κύριο λόγο στην έβδομη ημέρα (d7) παρά ταύτα η προσθήκη κιτρικού επηρεάζει την γευστική αξία του προϊόντος.
- iii. Οι διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών θερμοκρασιών συντήρησης όλων των προϊόντων στους 2 °C και 5 °C είναι ελάχιστες χωρίς να κρίνεται κάποια από τις δυο πιο ιδανική.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Acton Q. Ashton (2013 edition):** Enterobacteriaceae Infections- Advances in Research and Treatment pp. 1-104.
- **Ahmed Farid E. (1991) :** Seafood Safety pp. 10-25.
- **Arvanitoyannis Ioannis (2009):** HACCP and ISO 22000 Application to Foods of Animal Origin pp. 360-452.
- **Ates Mustafa, Ozlilizcik Asli, Tabakoglu Cengiz (2011):** Microbiological analysis of stuffed mussels sold in streets. Indian J Microbiol (July-Sept 2011) 51(3):350-354.
- **Blackburn Clive de W. (2006):** Food spoilage microorganisms pp. 147-167.
- **Corry Janet , Curtis Gordon , Baird Rosamund (2012) :** Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology (third edition) pp. 174-185.
- **Douglas Gunnison (1985):** Microbial Processes in Reservoirs pp. 79-89.
- **Duncan Mara and Migel Horan (2003) :** Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Part I : Basic Microbiology pp. 3-173.
- **Emre Caglak, Sukran Cakli, Berna Kilinc (2007):** Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. Volume 226, Issue 6 pp.1293-1299.
- **Erkan Nuray (2005):** Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and selected chemical decomposition indicators. Volume 85, Issue 15, pp 2625-2630.
- **Frazier, William C.; Westhoff , Dennis C. (1998):** Food Microbiology 4th Edition pp. 35-68.

- **Gallinou-Mitsoudi, Giannakouroy A, Petridis D, Papathanasiou E (2002):** Mussel Endobionts In Greek Cultures pp. 25-60.
- **Ghosh Dilip, Shantanu Das Debasis Bagvhi, Smarta R. B (2013):** Innovation in Healthy and Functional foods pp. 13-42.
- **Gibson Glenn R. (2009):** Food Science and Technology, Functional Foods Volume 5 pp. 51-61.
- **Goulas A.E, Chouliara I., Nessi E., Kontominas M.G and Savvaidis I.N (2004):** Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. Volume 98, Issue 3 (8) 752-760.
- **Grigorova R. , Norris J.R (1990):** Methods in Microbiology Volume 22 pp 1-618.
- **Gronewold Andrew David (2008):** Water Quality Models for Supporting Shellfish Harvesting Area Management 15 : 8 -23.
- **Guillon-Cottard, Augier H., Console J.J. and Esmieu O. (1998):** Study of microbiological pollution of a pleasure boat harbour using mussels as bioindicators. Volume 45, issue 3 pp 239-247.
- **Hagedorn Charles, Blanch Anicet R., Harwood Valerie J. (2011):** Microbial Source Tracking: Methods Applications and Case Studies pp. 137-156.
- **Hayes P.R, Forsythe S J. (1998):** Food Hygiene , Microbiology and HACCP pp. 150-202.
- **Hui Y.H. (2005):** Handbook of Food Science, Technology and Engineering (four volume set) pp. 352-356.
- **Huss H.H. (1994):** Assurance of seafood quality pp.10-32.

- **Jay James (1998):** Modern Food Microbiology (fifth edition) pp. 125-132.
- **Jay James, Loessner Martin, Golden David (2005):** Modern Food Microbiology (seventh edition) pp. 39-54.
- **Koon Hoong The, Flint Steve, Brooks John, Knight Geoff (2015):** Biofilms in the Dairy Industry pp. 23-27.
- **Koutsoumanis K., Nychas E., Taoukis P.S. (1999):** Use of time–temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. Volume 53, Issue 1 pp. 21-31.
- **Kutter Elizabeth, Sulakvelidze Alexander (2004):** Bacteriophages : Biology and Applications pp. 30- 40.
- **Martin Roy, Carter Emily Paine, Flick,JR George , Davis Lynn (2000):** Marine and Freshwater Products Handbook pp. 2-15.
- **Motarjemi Y., Adams M. (2006):** Emerging Food borne Pathogens pp. 130-180.
- **Oliviera Jacinta, Cunha Angela, Almeida Adelaide, Castilho Fernanda, Pereira Mario (2012):** Comparision of Methodologies for the Extraction of bacterial DNA from Mussels- Relevance for food safety. Volume 6, Issue 1 pp. 201-209.
- **Patel P. (1995):** Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology pp. 4-10.
- **Percival Steven, V.Yates Marylynn , Williams David , Chalmers Racher and Gray Nick (2014) :** Microbiology of Waterborne Diseases : Microbiological Aspects and Risks pp. 49-118.
- **Perlman D. (1972):** Advances in Applied Microbiology. Volume 25 pp. 37-54.

- **Prester Ljerka, Orct Tatjana, Macan Jelena and Kipic Dubravka (2010):** Determination of biogenic amines and endotoxin in squid, musky octopus, Norway Lobster and mussel stored at room temperature. Volume 65, Issue 4 , pp. 389-397.
- **Ralph Mitchell and Ji-Dong GU (2010):** Environmental Microbiology (second edition) pp. 9-36.
- **Rey Minia, Miranda Jose, Aubourg Santiago and Barros-Velazquez Jorge (2011) :** Improved microbial and sensory quality of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by refrigeration in a slurry ice packaging system. Volume 47, Issue 4 pp. 861-869.
- **Rippey R. ScottQ (1994)** Applied and Environmental Microbiology 68:1165-1172.
- **Shahidi F. And Botta J. R. (1994):** Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality pp. 196-219.
- **Skinner Frederick, Shewan J. M. (1977):** Aquatic microbiology pp. 86-102.
- **Torrence Mary, Isaacson Richard (2003):** Microbial Food Safety in Animal Agriculture pp. 131-174.
- **Veld Huis (1996):** Microbial and biochemical spoilage of food Volume 33, Issue 1, pp. 1-18.
- **Ward Donn R. and Hachmer Cameron R. (1991):** Microbiology of Marine Food products pp. 19-39.

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Γαληνού-Μητσούδη Σ. (2003)** : Σημειώσεις Εκτροφής Οστράκων, Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης (Παράρτημα Ν. Μουδανιών)
- **Κοτζεκίδου-Ρουκά, Π. (2000)** : Μικροβιολογία Τροφίμων. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- **Κράββα Νικολέττα (2000)** : Γενετική σύσταση και αύξηση σε πληθυσμούς του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στο Θερμαϊκό κόλπο.
- **Κυριαζή-Παπαδοπούλου Άννα (2002)** : Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση του Μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*)
- **Μποζιάρης Ι. (2010)** : Υγιεινή και συντήρηση εδώδιμων αλιευμάτων Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών.
- **Παπαετροπούλου Μ. και Μαυρίδου Α. (1995)** : Μικροβιολογία του Υδάτινου Περιβάλλοντος – Βασικές Αρχές. Εκδόσεις ΤΡΑΥΛΟΣ-ΚΩΣΤΑΡΑΚΗ, Αθήνα.

5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **AOAC INTENATIONAL (16/5/2015):**

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx?hkey=5142c478-ab50-4856-8939-a7a491756f48

- **EC-ASEAN(5/5/2015):**

<http://ec.europa.eu/trade/policy/countries-and-regions/regions/asean/>

- **ICMSF (19/9/2015) :** <http://www.icmsf.org/>

- **NATURA 2000 (20/8/2015) :** <http://natura2000.eea.europa.eu/>

- **Κανονισμός 2073/2005 (15/9/2014):**

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20071227:EL:PDF>

ABSTRACT

The deterioration in the maintenance of the catch may be caused by the action of microorganisms, enzymes and chemical oxidation reactions. However, microbiological spoilage is one of the most important quality degradation mechanisms in fresh fish. The microorganisms which are responsible for the microbial spoilage in food are mainly those of the original microflora of the food and those who come from contamination (Huss 2000).

This thesis focuses on a first approach to the quality and maintenance of the flesh of the mussels from the area of Kymina Thessaloniki, held a) to investigate the presence or absence of the bacterium *E.coli* in packaged mussel flesh in beginning of the commercial life and b) to investigate / monitor microorganisms during the preservation of the packaged mussel flesh temperatures fresh catch (2 ° C and 5 ° C). For this reason, samples were transferred from mussels farm Maligiannis AE from Kymina Thessaloniki (*Mytilus galloprovincialis*) for both parts of the experiment which were taken initially half-shell and mussel flesh in a commercial package and later only flesh mussels in sterile seawater packs, sterile water and water by adding citric acid content of 2% w / v buffered to pH 4,0. In both cases the samples are stored in two refrigeration temperatures (2 ° C and 5 ° C).

The microbiological population changes for the investigation of TVC, of lactic acid, the hydrogen sulfide producing bacteria of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* in both phases of the experiments during their were no major fluctuations and considered normal for each form as each specimen. The sensory evaluation was used to determine the commercial time of the samples life, while the absence of high concentration of enterobacteria an *E.coli* positive for the samples of the area. In conclusion the commercial life of no more than seven days (d7) with little exception with the addition of citric acid. However mussel flesh flavor is inappropriate ratio of the acid flavor, slight differences in the effect of the product up to the maintenance at 2 ° C and 5 ° C and detected low levels of enterobacteriaceae *E.coli*.

The experimental procedure took place in Hygiene and Microbiology Catch the Department of Ichthyology and Aquatic Environment, University of Thessaly in Volos in May and June 2014.

Key words: *E.Coli*, *Mytilus galloprovincialis*, quality and safety of shellfish microbiological parameters, commercial life.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134350