



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

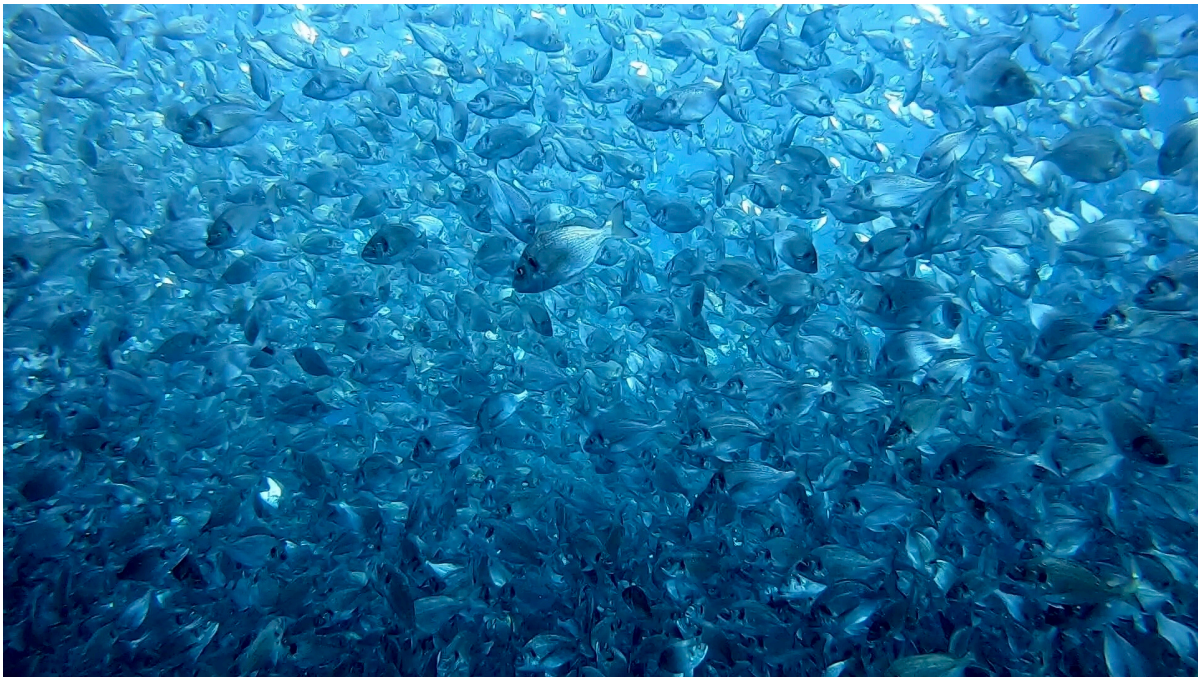
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

## **Πτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**ΘΕΜΑ:**

**Μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες στην μικροβιολογική αλλοίωση με την μέθοδο NGS και στην ποιότητα των νωπών ιχθύων**



**Φοιτητής :** Απόλλων Θωμάς (16029)

**Εισηγητής:** Αναπληρώτρια καθηγήτρια , Χούχουλα Δήμητρα

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο **‘Μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες στην μικροβιολογική αλλοίωση με την μέθοδο NGS και στην ποιότητα των νωπών ιχθύων’** που παρουσιάστηκε από τον **ΘΩΜΑ ΑΠΟΛΛΩΝ** υποψηφίου για τον πτυχιακό τίτλο σπουδών στην Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Dimitra  
Houhoula



Digitally signed by  
Dimitra Houhoula  
Date: 2021.03.11  
22:14:05 +02'00'

---

Ημερομηνία

---

Δρ. Χούχουλα Δήμητρα

---

Ημερομηνία

---

Δρ. Λουγκοβόης Βλαδίμηρος

---

Ημερομηνία

---

Δρ. Κοντελής Σπύρος

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Απόλλων Θωμάς, του Πέτρου, με αριθμό μητρώου 71616029 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Απόλλων Θωμάς

## Περίληψη

Ολόκληρη η τσιπούρα συσκευάστηκε (α) αερόβια (AIR) σε φελιζόλ από πολυστυρένιο με επαρκή ποσότητα πάγου, με βάση τις συμβατικές πρακτικές και (β) υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (συγκέντρωσης 60% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>). Η Next-Generation Sequencing (NGS) του μικροβιακού φορτίου των ψαριών στο δέρμα, τα βράγχια και τα έντερα πραγματοποιήθηκε στα αρχικά δείγματα (συσκευασία, 1 ημέρα μετά τη εξαίεση) και στο τέλος (τέλος της διάρκειας ζωής). Το τέλος της διάρκειας ζωής αξιολογήθηκε από μια αισθητηριακή αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε από μια ομάδα εμπειρογνομόνων. Τα αποτελέσματα του NGS έδειξαν σημαντικές διαφορές στον πλούτο και την ποικιλομορφία των οικογενειών μεταξύ των δύο τύπων συσκευασιών (δηλ. AIR και MAP), καθώς και μεταξύ των τύπων συσκευασίας και του αρχικού μικροβίου της τσιπούρας.

Οι αναλύσεις NGS των μικροβίων, σε επίπεδο Phylum, έδειξαν ότι τα πιο ανθεκτικά βακτήρια, τόσο στο αρχικό μικρόβιο όσο και στο τέλος της διάρκειας ζωής, ήταν τα Πρωτεοβακτήρια, είτε σε δείγματα AIR είτε MAP. Όσον αφορά τα μικρόβια του δέρματος τσιπούρας, οι αρχικά επικρατούσες οικογένειες ήταν *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* και *Moraxellaceae*, ενώ στα έντερα επικράτησαν *Comamonadaceae*, *Anaplasmataceae*, *Bacillaceae* και *Enterobacteriaceae*. Οι αναλύσεις έδειξαν συσχετισμούς μεταξύ του δέρματος και των εντερικών μικροβίων.

Μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής των ψαριών, η σύνθεση του αρχικού μικροβίου τροποποιήθηκε και στους δύο τύπους συσκευασίας (AIR, MAP). Σε γενικές γραμμές, αρκετές από τις αρχικά κυρίαρχες οικογένειες έχουν αντικατασταθεί εν μέρει ή πλήρως από ψυχρότροφες και ψυχρόφιλες οικογένειες όπως *Pseudoalteromonadaceae*, *Psychromonadaceae* και *Shewanellaceae*. Ωστόσο, υπήρχαν οικογένειες, όπως το *Comamonadaceae*, που παρέμειναν υπό συνθήκες MAP.

Μέχρι την 8η ημέρα της ισοθερμικής αποθήκευσης στους 0 ° C τα ψάρια κάτω από MAP παρουσίασαν υψηλότερη βαθμολογία αισθητηρίων από τα αντίστοιχα δείγματα AIR, υποδεικνύοντας καλύτερη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των ψαριών υπό MAP.



## Abstract

Whole gilthead seabream was packed (a) aerobically in polystyrene boxes with an adequate quantity of flake ice, based on the conventional practices (AIR) and (b) under modified atmospheres (MAP: 60% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>). Next-Generation Sequencing (NGS) analysis of fish microbiome on skin, gills, and intestines was performed at the initial (packaging, 1 day after harvesting) and final (end of shelf life) points. End of shelf life was assessed by a sensory evaluation carried out by a panel of experts.

NGS results indicated statistically significant differences in families' richness and diversity among the two types of packaging (i.e. AIR and MAP) as well as among the packaging types and the initial seabream's microbiome. The NGS analyses of the microbiota, at the Phylum level, showed that the most persistent bacteria, both at the initial microbiome and at the end of shelf life, was Proteobacteria, either in AIR or MAP samples. As regards gilthead seabream skin microbiota, the initially prevailing Families were Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, and Moraxellaceae while on the intestines prevailed Comamonadaceae, Anaplasmataceae, Bacillaceae, and Enterobacteriaceae.

Statistical analyses indicated positive correlations between the skin and intestinal microbiota. By the end of fish shelf life, the composition of the initial microbiome was modified in both types of packaging (AIR, MAP). In general, several of the initially predominant families have been partially or completely replaced by psychotropic and psychrophilic families like *Pseudoalteromonadaceae*, *Psychromonadaceae*, and *Shewanellaceae*. However, there were families, such as *Comamonadaceae*, persistent under MAP conditions. By the 8th day of isothermal storage at 0°C fish under MAP exhibited higher sensory scorings than the respective AIR samples, indicating better retention of quality attributes of fish under MAP.

# Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	3
Abstract	4
Κατάλογος Πινάκων	7
Κατάλογος Σχημάτων	9
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	10
<b>1.1 Διατροφική αξία ιχθύων</b>	<b>10</b>
1.1.1 Θρεπτικά συστατικά ιχθυηρών	11
1.1.2 Το εμπόριο των ιχθυηρών	13
<b>1.2 Η παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια</b>	<b>14</b>
1.2.1 Παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών	16
<b>1.3 Ευρωπαϊκά αλιεύματα</b>	<b>17</b>
1.3.1 Αλιεύματα προερχόμενα από υδατοκαλλιέργεια	17
1.3.2 Αλιεύματα προερχόμενα από αλιευση	23
Κεφάλαιο 2: Αλλοιώσεις Ιχθυηρών	25
<b>2.1 Μικροβιακή χλωρίδα ιχθυηρών</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Προέλευση και αποθήκευση ιχθυηρών</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Μεταθανάτιος Μεταβολισμός</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Αλλοίωση Λιπιδίων</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Μικροβιολογικές Αλλοιώσεις Τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)</b>	<b>28</b>
Κεφάλαιο 3: Επεξεργασία και συσκευασία νωπής τσιπούρας	31
<b>3.1 Συντήρηση ιχθύων υπό ψύξη</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Συντήρηση ιχθύων σε υπέρψυξη (superchilling)</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Συντήρηση ιχθύων με προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Συσκευασία ιχθύων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Συνδυασμός μεθόδων και η θεωρία των εμποδίων</b>	<b>34</b>
Κεφάλαιο 4: Αλλοιώσεις και MAP	35
<b>4.1 Αρχή του MAP</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε ψάρια και προϊόντα ψαριών</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Μικροβιακοί παράμετροι για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται σε MAP</b>	<b>37</b>

<b>4.4 Χημικοί και φυσικοχημικοί παράμετροι σημαντικοί για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται στο MAP</b>	<b>40</b>
4.4.1 Το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N)	40
4.4.2 pH	41
<b>4.5 Αισθητήριοι παράμετροι σημαντικοί για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται στο MAP</b>	<b>41</b>
<b>Κεφάλαιο 5: Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS)</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Η ανάλυση DNA μέσω NGS</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Η γονιδιωματική έρευνα</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Η πυροαλληλούχιση</b>	<b>44</b>
<b>Κεφάλαιο 6: Υλικά και Μεθόδοι Α΄ πειραματικής διαδικασίας</b>	<b>45</b>
<b>6.1 Στόχος πειραματικής διαδικασίας</b>	<b>45</b>
<b>6.2 Επεξεργασία δειγμάτων</b>	<b>46</b>
<b>6.3 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων</b>	<b>46</b>
<b>6.4 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων βασισμένο στην μέθοδο QIM</b>	<b>47</b>
<b>6.5 Απομόνωση DNA</b>	<b>49</b>
<b>Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα Α΄ πειραματικής διαδικασίας</b>	<b>51</b>
<b>7.1 Οργανοληπτικά αποτελέσματα</b>	<b>51</b>
<b>7.2 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων βασισμένο στην μέθοδο QIM</b>	<b>58</b>
<b>7.3 Συμπεράσματα Ποιοτικών Ελέγχων</b>	<b>59</b>
<b>Κεφάλαιο 8: Απομόνωση και αποτελέσματα NGS</b>	<b>60</b>
<b>8.1 Απομόνωση DNA</b>	<b>60</b>
<b>8.2 Αποτελέσματα NGS</b>	<b>61</b>
8.2.1 Ποσοστιαίες μεταβολές στην σάρκα τσιπούρας	61
8.2.2 Ποσοστιαίες μεταβολές στα βράγχια τσιπούρας	66
8.2.3 Ποσοστιαίες μεταβολές στα εντόσθια τσιπούρας	70
<b>Κεφάλαιο 9: Σχολιασμός αποτελεσμάτων NGS</b>	<b>77</b>
<b>9.1 Ο στόχος της έρευνας</b>	<b>77</b>
<b>9.2 Η Ανάλυση ως προς Phylum</b>	<b>77</b>
<b>9.3 Η Ανάλυση ως προς Family</b>	<b>78</b>
<b>9.4 Η επίδραση του MAP</b>	<b>79</b>
<b>9.5 Διάρκεια ζωής δειγμάτων</b>	<b>80</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>85</b>

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Παγκόσμια παραγωγή και εκμετάλλευση της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας (σε εκατομμύρια τόνους) (FAO 2018)	13
Πίνακας 1.2: Τα κορυφαία 10 είδη ειδών ανά ποσότητα στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια (FAO 2017)	16
Πίνακας 1.3: Τα 10 είδη ειδών ανά αξία στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια το έτος 2017 (FAO 2017)	17
Πίνακας 1.4: Διατροφική επισήμανση σολομού (Atlantic salmon) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	18
Πίνακας 1.5: Διατροφική επισήμανση κυπρίνου (Cyprinus carpio) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	18
Πίνακας 1.6: Διατροφική επισήμανση μαγειρεμένων μυδιών (M. edulis) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	19
Πίνακας 1.7: Διατροφική επισήμανση τσιπούρας (Sparus aurata) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	20
Πίνακας 1.8: Διατροφική επισήμανση πέστροφας (Oncorhynchus mykiss) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	21
Πίνακας 1.9: Διατροφική επισήμανση λαυρακίου (Dicentrarchus labrax) (Oncorhynchus mykiss) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)	22
Πίνακας 2.1: Μικροβιολογικές Αλλοιώσεις Τσιπούρας από διάφορα στελέχη μικροοργανισμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης σε αερόβιο περιβάλλον (Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη 2013)	29
Πίνακας 2.2: Η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX), Pseudomonas sp., Shewanella putrefaciens (που παράγουν H <sub>2</sub> S), Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικών που καταμετρήθηκαν σε τσιπούρα σε θερμοκρασία συντήρησης 0 οC ( Ζουμπουλα Νίκη 2010)	30
Πίνακας 2.3: Η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX), Pseudomonas sp., Shewanella putrefaciens (που παράγουν H <sub>2</sub> S), Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικών που καταμετρήθηκαν σε τσιπούρα σε θερμοκρασία συντήρησης 5 οC. ( Ζουμπουλα Νίκη 2010)	30
Πίνακας 4.1: Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης και επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης και MAP (60% CO <sub>2</sub> , 10% O <sub>2</sub> , 30% N <sub>2</sub> ) (Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη 2013).	39
Πίνακας 4.2: Μικροβιολογικές μεταβολές σε φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε MAP (60% CO <sub>2</sub> , 30% N <sub>2</sub> , 10% O <sub>2</sub> ) σε συντήρηση στους 5 οC. ( Σάββα Αμαλία 2013)	42

Πίνακας 6.1: Μέθοδος QIM για ολόκληρη, μη εκσπλαχμισμένη τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας (Lougonois et al., 2003)	48
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα μεθόδου QIM για ολόκληρη, μη εκσπλαχμισμένη τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας.	58
Πίνακας 8.1: Συγκεντρώσεις DNA για κάθε δείγμα	60
Πίνακας 8.2: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	61
Πίνακας 8.3: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά family για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	63
Πίνακας 8.4: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά classs για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	64
Πίνακας 8.5: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	65
Πίνακας 8.6: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για στα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	66
Πίνακας 8.7: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά Family για στα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	68
Πίνακας 8.8: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά class για τα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	69
Πίνακας 8.9: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για τα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	70
Πίνακας 8.10: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	70
Πίνακας 8.11: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά Family για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	72
Πίνακας 8.12: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά classes για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	74
Πίνακας 8.13: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.	75

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1: Απεικόνιση της συνολικής προσφοράς πρωτεϊνών (FAO 2012)	10
ΣΧΗΜΑ 1.2: Κατανάλωση ιχθυηρών ανα κάτοικο κάτοικο kg / χρόνο (FAO 2012)	11
Σχήμα 1.3: Απεικόνιση συνολικής προσφοράς πρωτεϊνών ανα ημέρα (FAO 2012)	12
Σχημα 1.4: Παγκόσμια παραγωγή αλιευμάτων και υδατοκαλλιέργειας (σε εκατομμύρια τόνους) (FAO 2018)	16
Σχημα 7.1: Το σύνολο των ελαττωματικών σημείων συνάρτηση του χρόνου	58
Σχημα 8.1: Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.	62
Σχημα 8.2: Τα Families που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.	64
Σχημα 8.3: Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.	65
Σχημα 8.4: Τα επικρατέστερα phylum που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.	66
Σχημα 8.5: Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας.	67
Σχημα 8.6: Τα επικρατέστερα families που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας.	68
Σχημα 8.7: Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας.	69
Σχημα 8.8: Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.	72
Σχημα 8.9: Τα επικρατέστερα Families που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.	74
Σχημα 8.10: Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.	75
Σχημα 8.11: Τα επικρατέστερα phylum που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.	76
Σχημα 9.1: Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας	82
Σχημα 9.2: Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας	83
Σχημα 9.3: Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας	84

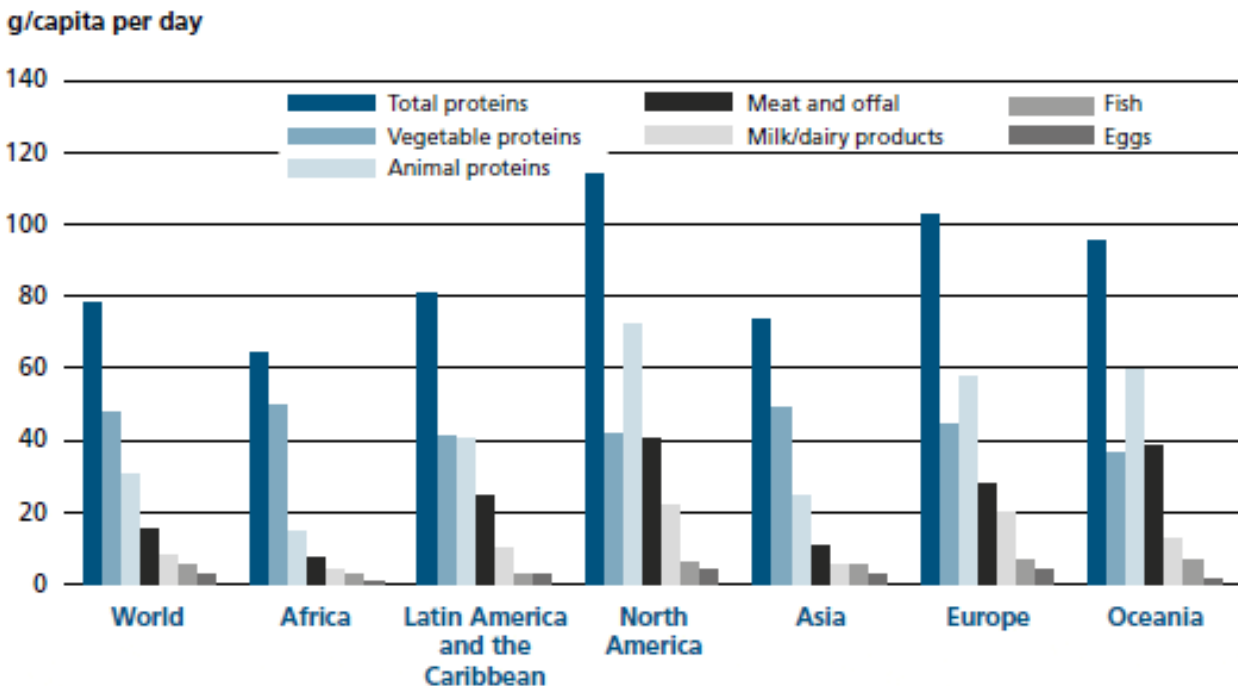


# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

## 1.1 Διατροφική αξία ιχθύων

Το νερό καλύπτει πάνω από τα τρία τέταρτα της επιφάνειας του πλανήτη μας. Η ιστορία της ανθρωπότητας έχει δείξει την σχέση του ανθρώπου με τους ωκεανούς, τις λίμνες και τα ποτάμια, όπου αποτελεί την κύρια πηγή της τροφής του. Σήμερα, η ταχεία εξαλίευση έχει μεταβάλει την ισορροπία των υδρόβιων οργανισμών, έχοντας σαν συνέπεια την σημαντική μείωση των ειδών και μερικές φορές στην εξαφάνισή τους, σε αντίθεση όμως με την ταχεία αύξηση του πληθυσμού του ανθρώπου. (F. Asche 2008)

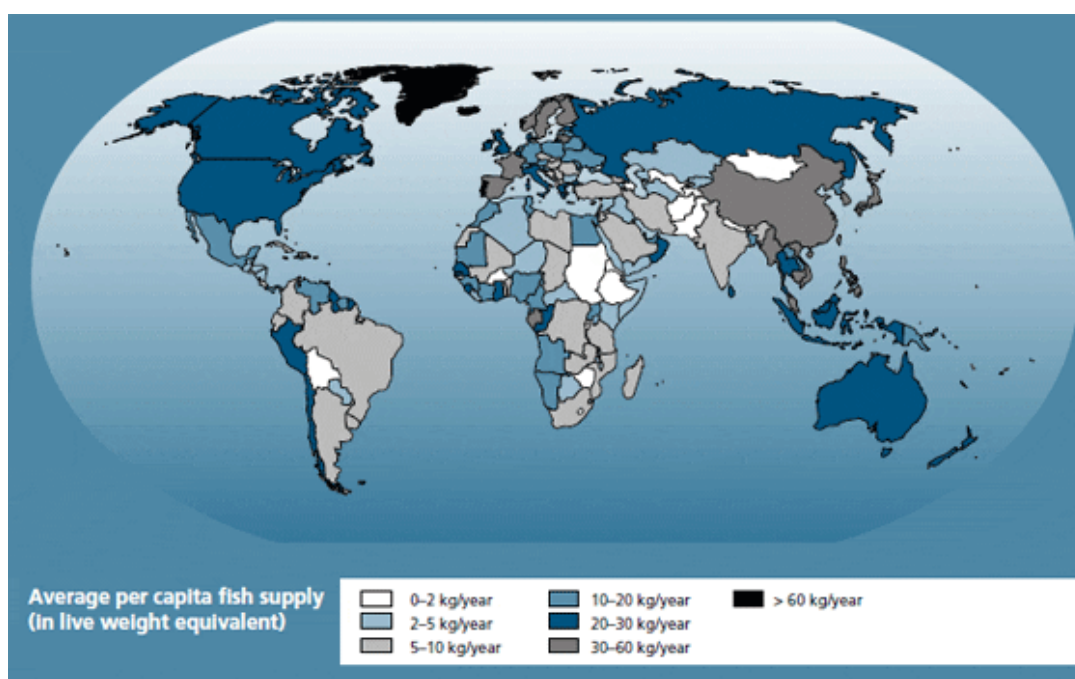
Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ψάρια και τα θαλασσινά αντιπροσωπεύουν ήδη το 16,6% της πρόσληψης ζωικών πρωτεϊνών και το ποσοστό αυτό αυξάνεται. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές γεωγραφικές διαφορές στην παγκόσμια προσφορά και ζήτηση θαλασσινών και το ενεργό διεθνές εμπόριο θαλασσινών συμβάλλει σημαντικά στην εξομάλυνση των περιφερειακών ανισορροπιών. Στην πραγματικότητα, τα θαλασσινά είναι ένα από τα πιο εμπορεύσιμα τρόφιμα. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις περιφερειακές τάσεις της προσφοράς και της ζήτησης και τις επιπτώσεις τους στη διεθνή αγορά όσον αφορά το ρόλο του τομέα των θαλασσινών στην επίτευξη της παγκόσμιας ασφάλειας των τροφίμων και της διατροφής. (FAO 2012)



Σχήμα 1.1: Απεικόνιση της συνολικής προσφοράς πρωτεϊνών (FAO 2012)

### 1.1.1 Θρεπτικά συστατικά ιχθυερών

Τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα αποτελούν μια πολύτιμη πηγή θρεπτικών ουσιών που έχουν θεμελιώδη σημασία για διαφοροποιημένη και υγιεινή διατροφή. Με λίγες εξαιρέσεις για επιλεγμένα είδη, τα ψάρια είναι συνήθως χαμηλά σε κορεσμένα λίπη, υδατάνθρακες και χοληστερόλη. Τα ψάρια παρέχουν όχι μόνο πρωτεΐνη υψηλής αξίας, αλλά και μεγάλη ποικιλία ουσιωδών μικροθρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων βιταμινών (D, A και B), μεταλλικά στοιχεία (συμπεριλαμβανομένου ασβεστίου, ιωδίου, ψευδαργύρου, σιδήρου και σεληνίου) και πολυακόρεστων ω-3 λιπαρών οξέων δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (EPA) και εικοσαπεντανοϊκό οξύ (DHA). Ενώ η μέση κατά κεφαλήν κατανάλωση ψαριών μπορεί να είναι χαμηλή, ακόμη και μικρές ποσότητες ψαριών μπορούν να έχουν σημαντική θετική θρεπτική επίδραση παρέχοντας απαραίτητα αμινοξέα, λίπη και μικροθρεπτικά συστατικά που είναι σπάνια σε φυτικές τροφές. Υπάρχουν ενδείξεις ευεργετικών επιδράσεων της κατανάλωσης ψαριών σε σχέση με τη στεφανιαία νόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο, τον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία και την ψυχική υγεία. Υπάρχουν επίσης πειστικές αποδείξεις για οφέλη όσον αφορά την ανάπτυξη, ιδίως για τις γυναίκες και τα παιδιά κατά τη διάρκεια της κύησης και της νηπιακής ηλικίας και για τη βέλτιστη ανάπτυξη του εγκεφάλου των παιδιών ( FAO 2012).

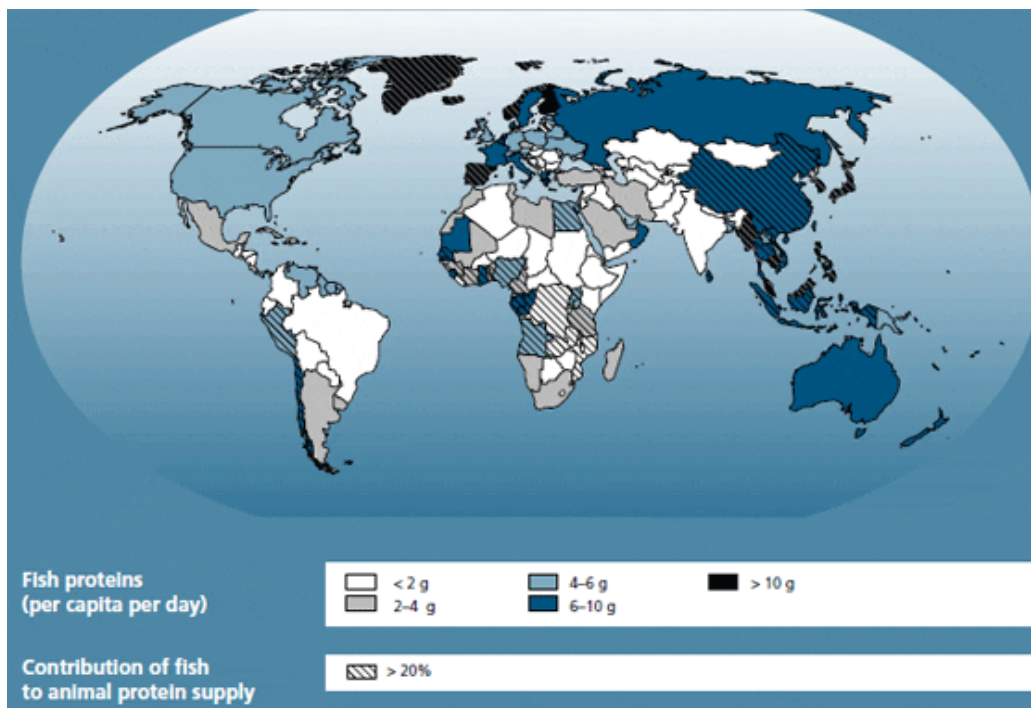


**ΣΧΗΜΑ 1.2:** Κατανάλωση ιχθυερών ανα κάτοικο κάτοικο kg / χρόνο (FAO 2012)

Κατά μέσο όρο, τα ψάρια παρέχουν μόνο περίπου 33 θερμίδες ανά κάτοικο την ημέρα. Ωστόσο, μπορεί να υπερβεί τις 150 θερμίδες ανά κάτοικο ημερησίως σε χώρες όπου υπάρχει έλλειψη εναλλακτικών πρωτεϊνικών τροφίμων και όπου έχει αναπτυχθεί και διατηρηθεί η προτίμηση για τα ψάρια (π.χ. Ισλανδία, Ιαπωνία και αρκετά μικρά νησιωτικά κράτη).

Η διατροφική συμβολή των ψαριών είναι πιο σημαντική όσον αφορά τις ζωικές πρωτεΐνες, καθώς μια μερίδα 150 g ψαριών παρέχει περίπου 50-60 τοις εκατό των ημερήσιων πρωτεϊνικών απαιτήσεων για έναν ενήλικα. Οι πρωτεΐνες των ψαριών μπορούν να αποτελέσουν κρίσιμο στοιχείο σε ορισμένες πυκνοκατοικημένες χώρες όπου τα συνολικά επίπεδα πρόσληψης πρωτεϊνών μπορεί να είναι χαμηλά. Στην πραγματικότητα, πολλοί πληθυσμοί, περισσότερο στις αναπτυσσόμενες χώρες από τις ανεπτυγμένες, εξαρτώνται από τα ψάρια ως μέρος της καθημερινής διατροφής τους. Για αυτούς, τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα συχνά αντιπροσωπεύουν μια προσιτή πηγή ζωικής πρωτεΐνης η οποία μπορεί όχι μόνο να είναι φθηνότερη από άλλες πηγές ζωικών πρωτεϊνών, αλλά επίσης προτιμότερη από τοπικές και παραδοσιακές συνταγές. Για παράδειγμα, τα ψάρια συμβάλλουν ή υπερβαίνουν το 50% της συνολικής πρόσληψης ζωικών πρωτεϊνών σε ορισμένα μικρά νησιωτικά αναπτυσσόμενα κράτη, καθώς και στο Μπαγκλαντές, την Καμπότζη, τη Γκάνα, τη Γκάμπια, την Ινδονησία, τη Σιέρα Λεόνε και τη Σρι Λάνκα. Το 2009, τα ψάρια αντιπροσώπευαν το 16,6% της παγκόσμιας πρόσληψης ζωικών πρωτεϊνών και το 6,5% όλων των πρωτεϊνών που καταναλώθηκαν.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ψάρια παρέχουν περίπου 3,0 δισεκατομμύρια ανθρώπους με περίπου 20% της μέσης πρόσληψης ζωικών πρωτεϊνών και 4,3 δισεκατομμύρια ανθρώπους με περίπου 15% τέτοιων πρωτεϊνών (FAO 2012).



**Σχήμα 1.3:** Απεικόνιση συνολικής προσφοράς πρωτεϊνών ανα ημέρα (FAO 2012)

### 1.1.2 Το εμπόριο των ιχθυηρών

Η αγορά θαλασσινών έχει αλλάξει δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες. Το αυξημένο εμπόριο δημιούργησε μια παγκόσμια αγορά για ομάδες ειδών και ο αριθμός των ειδών που αποτελούν μέρος αυτών των τμημάτων της παγκόσμιας αγοράς συνεχίζει να αυξάνεται. Το αυξημένο εμπόριο και η στασιμότητα της άγριας ζωής διευκόλυναν επίσης την ταχεία ανάπτυξη της βιομηχανίας της υδατοκαλλιέργειας και την καθιστούν την ταχύτερα αναπτυσσόμενη τεχνολογία παραγωγής τροφίμων στον κόσμο. Η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας ήταν αρκετή για να αυξήσει επίσης την κατά κεφαλή κατανάλωση θαλασσινών σε παγκόσμιο επίπεδο. Αυτοί οι δύο παράγοντες σε συνδυασμό με τις σύγχρονες πρακτικές παραγωγής και εμπορίας, έχουν συντελέσει στην δραματική ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας, αυξάνοντας όλο και περισσότερο τις βασικές ομάδες ειδών. ( Smith M.D et al.,2010, Anderson, J.L., 2002)

**Πίνακας 1.1** Παγκόσμια παραγωγή και εκμετάλλευση της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας (σε εκατομμύρια τόνους) (FAO 2018)

Category	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<b>PRODUCTION</b>						
<b>● Capture</b>						
Inland	10.7	11.2	11.2	11.3	11.4	11.6
Marine	81.5	78.4	79.4	79.9	81.2	79.3
<b>Total Capture</b>	<b>92.2</b>	<b>89.5</b>	<b>90.6</b>	<b>91.2</b>	<b>92.7</b>	<b>90.9</b>
<b>● Aquaculture</b>						
Inland	38.6	42.0	44.8	46.9	48.6	51.4
Marine	23.2	24.4	25.4	26.8	27.5	28.7
<b>Total Aquaculture</b>	<b>61.8</b>	<b>66.4</b>	<b>70.2</b>	<b>73.7</b>	<b>76.1</b>	<b>80.0</b>
<b>● + ● Total world fisheries and aquaculture</b>	<b>154.0</b>	<b>156.0</b>	<b>160.7</b>	<b>164.9</b>	<b>168.7</b>	<b>170.9</b>
<b>UTILIZATION<sup>b</sup></b>						
Human consumption	130.0	136.4	140.1	144.8	148.4	151.2
Non-food uses	24.0	19.6	20.6	20.0	20.3	19.7
Population (billions) <sup>c</sup>	7.0	7.1	7.2	7.3	7.3	7.4
Per capita apparent consumption (kg)	18.5	19.2	19.5	19.9	20.2	20.3

● Capture production      ● Aquaculture production

Σε συνδυασμό με την έντονη επέκταση της παραγωγής ψαριών και των σύγχρονων διαύλων διανομής, η παγκόσμια προσφορά ψαριών αυξήθηκε κατά μέσο όρο 3,2% ετησίως κατά την περίοδο 1961 με 2012, υπερβαίνοντας την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού κατά 1,7% ετησίως. Ως εκ τούτου, η μέση κατά κεφαλήν διαθεσιμότητα έχει αυξηθεί. Η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών ανά κάτοικο αυξήθηκε από 9,9 κιλά κατά μέσο όρο τη δεκαετία του 1960 σε 11,5 κιλά στη δεκαετία του '70, 12,6 κιλά τη δεκαετία του 1980, 14,4 κιλά στη δεκαετία του 1990, 17,0 κιλά στη δεκαετία του 2000 και 18,4 κιλά το 2009. Προκαταρκτικές εκτιμήσεις για το 2012 δείχνουν περαιτέρω αύξηση της κατανάλωσης ψαριών κατά κεφαλή σε 18,8 kg. (Hassanpour, B et al., 2010)

Η αυξανόμενη συμβολή της υδατοκαλλιέργειας μπορεί επίσης να σημειωθεί παρατηρώντας την κατανάλωση ψαριών από μεγάλες ομάδες. Λόγω της αυξανόμενης παραγωγής γαρίδων, και μαλάκιων από την υδατοκαλλιέργεια και της σχετικής μείωσης της τιμής τους, η ετήσια κατά κεφαλήν διαθεσιμότητα οστρακόδερμων αυξήθηκε σημαντικά από 0,4 kg το 1961 σε 1,7 kg το 2009 και αυξήθηκε από τα μαλάκια (συμπεριλαμβανομένων των κεφαλόποδων) 0,8 kg έως 2,8 kg κατά την ίδια περίοδο. Η αυξανόμενη παραγωγή σολομού, πέστροφας και επιλεγμένων ειδών γλυκού νερού οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ετήσιας κατά κεφαλήν κατανάλωσης γλυκού νερού και διαδρομικών ειδών, από 1,5 κιλά το 1961 σε 6,0 κιλά το 2009.

Τα τελευταία χρόνια, δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές των άλλων ευρύτερων ομάδων. Η ετήσια κατανάλωση βενθοπελαγικών και πελαγικών ειδών ψαριών σταθεροποιήθηκε σε περίπου 3,0 kg και 3,4 kg κατά κεφαλή, αντίστοιχα. Τα βενθοπελαγικά ψάρια εξακολουθούν να συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων ειδών που προτιμούν οι καταναλωτές στη Βόρεια Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (8,6 kg και 7,0 kg κατ 'έτος αντίστοιχα το 2009), ενώ τα κεφαλόποδα προτιμώνται κυρίως από τις χώρες της Μεσογείου και της Ανατολικής Ασίας. Από τα 18,4 kg ιχθυερών ανά κάτοικο που ήταν διαθέσιμα για κατανάλωση το 2009, περίπου το 74% προέρχεται από ψάρια. Τα οστρακοειδή παρήγαγαν 26% (ή περίπου 4,5 kg κατά κεφαλή, υποδιαιρούμενα σε 1,7 kg καρκινοειδών, 0,5 kg κεφαλόποδων και 2,3 kg άλλων μαλακίων). (FAO 2018)

## 1.2 Η παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια

Η υδατοκαλλιέργεια παγκοσμίως είναι ο ταχύτερος αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 8%, όπου παρέχει το 49% της παγκόσμιας ζήτησης των θαλασσινών. Η συνολική προσφορά ιχθυερών από υδατοκαλλιέργεια αυξήθηκε δραματικά από 0,7 mMT το 1950 σε 90 mMT το 2012, ενώ μόνο η τελευταία δεκαετία σημείωσε αύξηση 51% στην παραγωγή (FAO 2014). Η εσωτερική υδατοκαλλιέργεια έχε 51,4 εκατομμύρια τόνους (64%), ενώ τόσο η παράκτια υδατοκαλλιέργεια όσο και η ιχθυοκαλλιέργεια (δηλαδή η υδατοκαλλιέργεια στο θαλάσσιο περιβάλλον) παρήγαγαν 28,7 εκατομμύρια τόνους (36%) (FAO, 2018). Η εσωτερική, η παράκτια και η θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια ασκούνται κυρίως σε περιβάλλον γλυκού νερού (αλατότητα έως 0.05 ppt), υφάλμυρο νερό (0,5-30 ppt αλατότητα) και περιβάλλον θαλάσσιου ύδατος (30 ppt αλατότητα), αντίστοιχα (Nesar Ahmed, Shirley Thompson 2018).

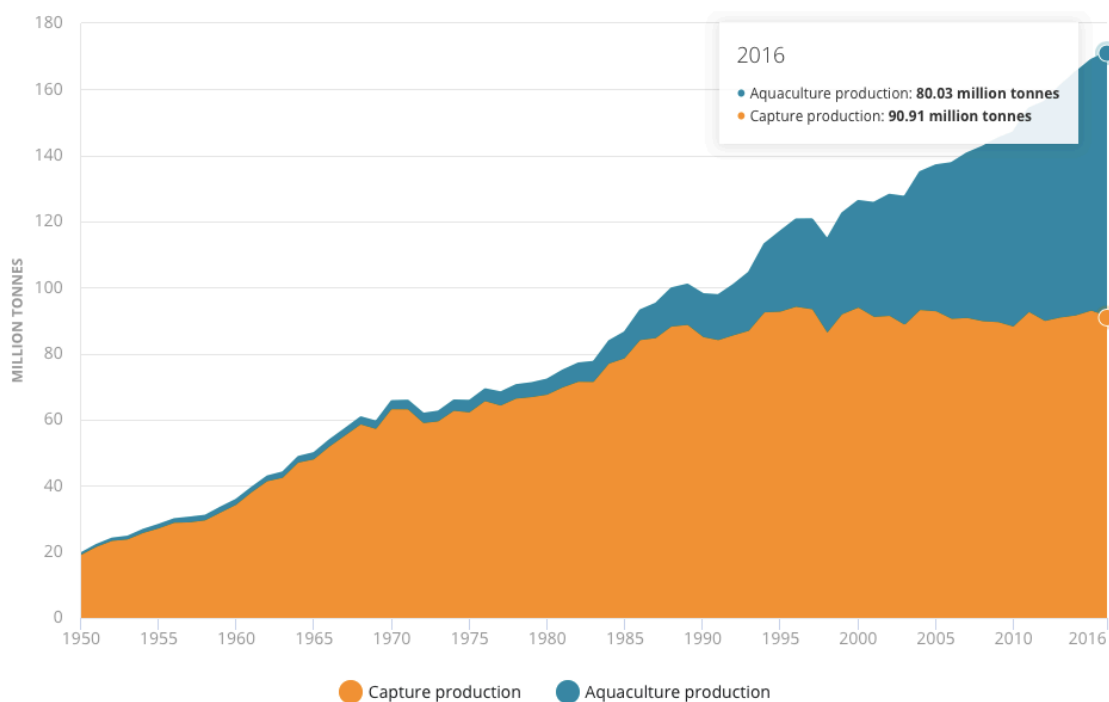
Η υδατοκαλλιέργεια ασκείται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η Ασία αντιστοιχούσε στο 89% της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας το 2016 και η Κίνα κατέχει την πρώτη θέση (61,5% της παγκόσμιας παραγωγής) μεταξύ των χωρών παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιέργειας, ακολουθούμενη από την Ινδία, την Ινδονησία, το Βιετνάμ, το Μπαγκλαντές, την Αίγυπτο, τη Νορβηγία, τη Χιλή,). Συνολικά 598 είδη καταγράφηκαν για την υδατοκαλλιέργεια το 2016 και η παραγωγή κυπρίνων, γατόψαρων και τυλάπια με ψάρια υψηλής αξίας συμπεριλαμβανομένων σολομού και γαρίδας. Η υιοθέτηση νέων τεχνολογιών και η συστημική βελτίωση των υφιστάμενων τεχνολογιών διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην αύξηση της αποδοτικότητας, της οικονομικής, της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας και της συμμόρφωσης με την κανονιστική ρύθμιση της παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας (Ganesh Kumara and Carole R. Engle 2016, N. Ahmed 2013).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η αγορά θαλασσινών έχει αλλάξει ριζικά. Ενώ η παραδοσιακή πηγή για τα θαλασσινά, της αλιείας άγριων ψαριών έχει επιβαρυνθεί από τα μέσα της δεκαετίας του '80, η συνολική παραγωγή συνέχισε να αυξάνεται καθώς η νέα τεχνολογία παραγωγής, η υδατοκαλλιέργεια, γινόταν όλο και πιο σημαντική. Επιπλέον, από τα μέσα της δεκαετίας του '70, το εμπόριο θαλασσινών έχει αυξηθεί κατά περισσότερο από 350%, όπως μετράται τόσο από την ποσότητα όσο και από την πραγματική αξία (FAO, 2018). Αυτή η ραγδαία ανάπτυξη έχει κάνει τα θαλασσινά το πιο εμπορεύσιμο φαγητό. Αυτό δημιούργησε τις παγκόσμιες αγορές στις οποίες υπήρχαν προηγουμένως περιφερειακές αγορές και επέτρεψε τη χρησιμοποίηση της δέσμης εργαλείων για τις αγορές βασικών προϊόντων για έναν αυξανόμενο αριθμό προϊόντων θαλασσινών. Καθώς τα θαλασσινά προέρχονται ολοένα και περισσότερο σε παγκόσμιο επίπεδο, υπήρξε μια εμπορευματοποίηση πολλών σημαντικών τμημάτων της αγοράς θαλασσινών.

Οι ομάδες ειδών έχουν καταστεί πιο σημαντικές καθώς υπάρχει αυξανόμενος βαθμός υποκαταστασιμότητας σε πολλές ομάδες ειδών, διευκολύνοντας την εμπορευματοποίηση. Αυτό επέτρεψε επίσης τον αυξανόμενο αριθμό τεχνολογιών παραγωγής, μεταφοράς και εμπορίας που χρησιμοποιούνται ευρέως στις προηγμένες χερσαίες αλυσίδες τροφίμων για να εφαρμοσθούν στον τομέα των θαλασσινών (G.J. Tacou, M et al., 2009).

Αντίθετα, η ταχεία επέκταση της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας δεν σηματοδοτείται χωρίς να έχει φτάσει στο ανώτατο σημείο της, κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας επεκτάθηκε με μέσο ετήσιο ρυθμό άνω του 8%, από 5,2 εκατομμύρια τόνους το 1981 σε 66,6 εκατομμύρια τόνους το 2012. Η Κίνα αντιπροσωπεύει το μοναδικό μεγαλύτερο έθνος που παράγει και καταναλώνει θαλασσινά και η επιρροή του στις παγκόσμιες αγορές ψαριών και στο εμπόριο έχει ενταθεί (Zhang et al., 2014). Η Κίνα κατανάλωσε το 35% των παγκόσμιων θαλασσινών το 2011 (FAO, 2012). Αν και η Ασία αντιπροσώπευε το 88% της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας σε όγκο το 2012, μόνο η Κίνα αντιπροσώπευε το 62%. Η Κίνα είναι ταυτόχρονα εισαγωγέας και εξαγωγέας ψαριών. Η Κίνα έγινε η τρίτη μεγαλύτερη χώρα εισαγωγής αλιευμάτων ανά αξία το 2011 μετά την Ιαπωνία και τις Ηνωμένες Πολιτείες. μέρος των εισαγωγών ψαριών είναι πρώτη ύλη για επανεξαγωγή μετά την επεξεργασία. Η Κίνα αντιπροσωπεύει πλέον το 13% των παγκόσμιων εξαγωγών ψαριών αξίας αξίας 17 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2011 και 18,2 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2012 (T. Cashion et al., 2017).





**Σχημα 1.4:** Παγκόσμια παραγωγή αλιευμάτων και υδατοκαλλιέργειας (σε εκατομμύρια τόνους) (FAO 2018)

### 1.2.1 Παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών

Οι τελευταίες στατιστικές για την παγκόσμια παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας του FAO καταγράφουν 608 είδη ειδών (στο πλαίσιο του ASFIS - Σύστημα Πληροφοριών Αλιείας - κατάλογος των υδρόβιων ειδών) που καλλιεργήθηκαν στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια κατά τη διάρκεια του 1950-2017. Ανάμεσά τους, 424 είδη ειδών καλλιεργήθηκαν 2017, με συγκεκριμένες στατιστικές παραγωγής καταγεγραμμένες στη βάση δεδομένων του (FAO 2017).

**Πίνακας 1.2:** Τα κορυφαία 10 είδη ειδών ανά ποσότητα στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια (FAO 2017)

Top 10 ASFIS species items			World aquaculture (2017 quantity)		
ASFIS species	Scientific name	ISSCAAP division	Number of countries farming the species item	World production quantity of the species item (live weight; tonnes)	Share of world production quantity of all species (%)
1. Japanese kelp	<i>Laminaria japonica</i>	Aquatic plants	4	11 174 505	9.98
2. <i>Eucheuma</i> seaweeds nei	<i>Eucheuma</i> spp.	Aquatic plants	13	8 637 534	7.72
3. Grass carp (= white Amur)	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Freshwater fishes	38	5 519 487	4.93
4. Cupped oysters nei	<i>Crassostrea</i> spp.	Molluscs	9	4 905 215	4.38
5. Silver carp	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Freshwater fishes	37	4 704 673	4.20
6. Whiteleg shrimp	<i>Penaeus vannamei</i>	Crustaceans	36	4 456 603	3.98
7. <i>Gracilaria</i> seaweeds	<i>Gracilaria</i> spp.	Aquatic plants	7	4 311 040	3.85
8. Japanese carpet shell	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Molluscs	7	4 228 206	3.78
9. Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Freshwater fishes	78	4 130 281	3.69
10. Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Freshwater fishes	78	4 129 100	3.69
Other species			n.a.	55 749 978	49.80
All species			196	111 946 623	100.00

**Πίνακας 1.3:** Τα 10 είδη ειδών ανά αξία στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια το έτος 2017 (FAO 2017)

Top 10 ASFIS species items			World aquaculture (2017 value)		
ASFIS species	Scientific name	ISSCAAP division	Number of countries farming the species item	World production value of the species item (farmgate; USD 1 000)	Share of world production value of all species (%)
1. Whiteleg shrimp	<i>Penaeus vannamei</i>	Crustaceans	36	26 743 265	10.72
2. Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	Diadromous fishes	14	16 697 788	6.69
3. Grass carp (= white Amur)	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Freshwater fishes	38	12 649 100	5.07
4. Silver carp	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Freshwater fishes	37	10 268 207	4.11
5. Red swamp crawfish	<i>Procambarus clarkii</i>	Crustaceans	3	10 003 537	4.01
6. Chinese mitten crab	<i>Eriocheir sinensis</i>	Crustaceans	3	9 540 416	3.82
7. Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Freshwater fishes	78	8 635 866	3.46
8. Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Freshwater fishes	78	7 612 374	3.05
9. Bighead carp	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Freshwater fishes	19	7 318 744	2.93
10. Japanese carpet shell	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Molluscs	7	6 957 089	2.79
Other species			n.a.	133 152 775	53.35
All species			196	249 579 163	100.00

## 1.3 Ευρωπαϊκά αλιεύματα

### 1.3.1 Αλιεύματα προερχόμενα απο υδατοκαλλιέργεια

Η παραγωγή της ΕΕ στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας εξελίχθηκε από ένα ρυθμό ετήσιας αύξησης 3,5% περίπου κατά την περίοδο 1980-2000 παρόλα αυτά εμφανίζει αρνητικό ποσοστό -0,5% κατά την περίοδο 2000-2016 . Επιπλέον, η παραγωγή υδατοκαλλιέργειας της ΕΕ αντιπροσωπεύει επί του παρόντος <1/5 του εγχώρια προμηθειών ιχθύων και οστρακοειδών στην ΕΕ (Ester Gutiérrez et al. 2020).

Τα βασικότερα είδη της υδατοκαλλιέργειας της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι:

- Ο σολομός (*Atlantic salmon*) με κύριο παραγωγό την Μεγάλη Βρετανία. Στην ΕΕ, η παραγωγή σολομού περιορίζεται στον σολομό του Ατλαντικού. Η καλλιέργεια άλλων ειδών και αλιευμάτων είναι αμελητέα. Η ΕΕ εξαρτάται πολύ από τον υπόλοιπο κόσμο για τον σολομό, δεδομένου ότι εισάγει το 80% της προσφοράς του από τρίτες χώρες όπου 80% είναι από την Νορβηγία (European Commission, 2016b).

**Πίνακας 1.4: Διατροφική επισήμανση σολομού (*Atlantic salmon*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

**Nutritional value per 100 g**  
(average for UK and Norwegian farmed salmon)

Calories: 198 kcal

Protein: 20 g

Selenium: 12 µg

Vitamin D: 5.7 µg

EPA: 612 mg

DHA: 869 mg

- Τον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*). Η συντριπτική πλειοψηφία της παραγωγής κυπρίνου προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια. Η παγκόσμια παραγωγή κυπρίνων κυριαρχείται από την Κίνα, η οποία αντιπροσωπεύει το 80% της συνολικής παραγωγής. Στην ΕΕ, οι δύο μεγαλύτεροι παραγωγοί είναι η Πολωνία και η Τσεχική Δημοκρατία. Δεν υπάρχει ουσιαστικά εμπόριο κυπρίνου με τρίτες χώρες. Όσον αφορά το ενδοκοινοτικό εμπόριο, υπάρχουν μόνο περιορισμένες ροές από τη Δημοκρατία της Τσεχίας στη Γερμανία. Το είδος παραμένει άγνωστο σε πολλά κράτη μέλη (European Commission, 2016b).

**Πίνακας 1.5: Διατροφική επισήμανση κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

**Nutritional value per 100 g**  
(average)

Calories: 100 kcal

Protein: 17.7 g

Selenium: 20 µg

Vitamin D: 3.8 µg

EPA: 66 mg

DHA: 60 mg

- Τα μύδια (*Mytilus edulis*). Η υδατοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει το 95% της παραγωγής μυδιών. Η Κίνα και η ΕΕ είναι οι δύο μεγαλύτεροι παραγωγοί μυδιών, ακολουθούμενη από τη Χιλή και τη Νέα Ζηλανδία. Το μεγαλύτερο μέρος της προσφοράς μυδιών από την ΕΕ παράγεται τοπικά. (European Commission, 2016b).

**Πίνακας 1.6: Διατροφική επισήμανση μαγειρεμένων μυδιών (*M. edulis*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

**Nutritional value per 100 g**  
(average values for cooked mussels, *M. edulis*)

Calories: 103 kcal

Protein: 17 g

Selenium: 50 µg

Vitamin D: < 0,5 µg

EPA: 340 mg

DHA: 214 mg

- Την τσιπούρα (*Sparus aurata*). Οι περισσότερες τσιπούρες προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια. Η ΕΕ είναι μακράν ο μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο, ακολουθεί η Τουρκία. Στο εσωτερικό της ΕΕ, η Ελλάδα είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός, και στην συνέχεια είναι η Ισπανία. Το εμπόριο μεταξύ της ΕΕ και τρίτων χωρών είναι πολύ περιορισμένο. Από την άλλη πλευρά, το ενδοκοινοτικό εμπόριο είναι σημαντικό, με την Ελλάδα να είναι ο σημαντικότερος εξαγωγέας στην Ιταλία, την Πορτογαλία, τη Γαλλία και την Ισπανία.



**Εικόνα 1.1:** Τσιπούρα επιστημονική ονομασία, *Sparus aurata* - Σπάρος ο χρυσόχρους.

Το σώμα της τσιπούρας είναι επίμηκες, πεπλατυσμένο και πλευρικά πιεσμένο με κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος. Στο στόμα της έχει δύο σιαγόνες του όπου φέρει 4 – 6 κυρτούς και μυτερούς κυνόδοντες και πίσω από αυτούς φέρει 2 – 4 σειρές πιο στρογγυλεμένων δοντιών, τα οποία σταδιακά με την πάροδο της ηλικίας γίνονται τραπεζίτες. Το βιολογικό θερμοκρασιακό εύρος της τσιπούρας κυμαίνεται από περίπου 5 °C έως 32 °C, ενώ η μέγιστη τιμή του ρυθμού αναπτύξεως της παρατηρείται στους 22-26°C και η αναπαραγωγική της δραστηριότητα ευνοείται ιδιαίτερα στους 14-17°C περίπου. Τα όρια της αλατότητας του νερού στο οποίο επιβιώνει μπορεί να φθάσουν μέχρι του επιπέδου του 42 ppt. Το εύρος της τιμής του pH που επιβιώνει κυμαινόμενη από 7,8 έως 8,5. (Παπουτσόγλου, 2008)

Η τσιπούρα ανήκει στα σαρκοφάγα ψάρια και τρέφεται κυρίως με μικρότερα ψάρια, μύδια, κοχύλια, οστρακοειδή και μικρά μαλάκια. Η αναπαραγωγή της λαμβάνει χώρα την περίοδο Οκτωβρίου – Δεκεμβρίου. Είναι ερμαφρόδιτο είδος με πρωτανδρική εμφάνιση και μετά το δεύτερο έτος της ηλικίας της πολλά άτομα μετατρέπονται σε θηλυκά. Συναντάται στην κεντρική και δυτική Μεσόγειο θάλασσα, λιγότερο συχνά στις ανατολικές και νότιο-ανατολικές περιοχές και πολύ σπάνια στη Μαύρη θάλασσα (FAO, 2010). Επίσης, απαντάται από την περιοχή της Αγγλίας μέχρι το Πράσινο ακρωτήριο και τα Κανάρια νησιά. Η τσιπούρα είναι ψάρι που εκτρέφεται σε ιχθυοτροφεία και έχει μεγάλη εμπορική αξία (Νεοφύτου, 2007).

**Πίνακας 1.7: Διατροφική επισήμανση τσιπούρας (*Sparus aurata*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

<b>Calories:</b>	130 kcal		
<b>Protein:</b>	21g		
	Methionine	0,67 g	
	Lysine	2,38 g	
	Arginine	1,29 g	
	Cystine	0,33 g	
	Total Amino Acid	18,94 g	
<b>Total Fat acid</b>	12,30 g		
	Saturated Fatty Acid	3.76 g	

	Monounsaturated Fatty Acid	4,88 g	
		Oleic Acid C18H34O2	3,8g
	Polyunsaturated Fatty Acid	3,65 g	
		Omega 3 Fatty Acid	1.39 g
		Omega 6 Fatty Acid	2.08 g
		EPA	0,480 g
		DHA	0,805 g
<b>Vitamin D</b>	<b>0,87 µg</b>		
<b>Selenium</b>	<b>7 µg</b>		

- Η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Το 2009, οι κυριότεροι παραγωγοί παγκοσμίως ήταν η ΕΕ, η Χιλή, η Νορβηγία, η Τουρκία και το Ιράν. Σήμερα, σχεδόν όλη η ιριδιζουσα πέστροφα στην αγορά της ΕΕ προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια. Το μεγαλύτερο μέρος της προσφοράς της πέστροφας στην ΕΕ παράγεται τοπικά. Οι κύριες χώρες παραγωγής της ΕΕ είναι η Ιταλία, η Γαλλία, η Δανία, η Γερμανία και η Ισπανία (European Commission, 2016b).

**Πίνακας 1.8: Διατροφική επισήμανση πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

<b>Nutritional value per 100 g</b> (portion size – average)	
Calories:	107 Kcal
Protein:	20 g
Selenium:	10 µg
Vitamin D:	7 µg
EPA:	219 mg
DHA:	496 mg



- Το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί τη κύριο παραγωγό για το λαβράκι, αλλά η αλιεία εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 10% της παγκόσμιας παραγωγής λαβρακιού. Η ΕΕ είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός λαβρακιού με μερίδιο 80%, πολύ πάνω από τον δεύτερο παραγωγό (Αίγυπτος). Εντός της ΕΕ, η Ελλάδα είναι ο πρώτος παραγωγός, και ακολουθεί η Ισπανία (European Commission, 2016b).

**Πίνακας 1.9: Διατροφική επισήμανση λαυρακίου (*Dicentrarchus labrax*) (*Oncorhynchus mykiss*) υδατοκαλλιέργειας (European Commission 2016)**

Nutritional value per 100 g (portion size – average)	
Calories:	123 kcal
Protein:	21 g
Selenium:	8 µg
Vitamin D:	2.3 µg
EPA:	438 mg
DHA:	579 mg



**Εικόνα 1.2:** Λαυράκι επιστημονική ονομασία, *Dicentrarchus labrax*.

### 1.3.2 Αλιευματα προερχομενα απο αλιευση

Τα βασικότερα είδη που αλιεύονται και καταναλώνονται στην Ευρώπη είναι:

- Γαύρος (*Engraulis encrasicolus*).

Ο γαύρος είναι ένα βραχύβιο ψάρι, που γενικά ζει λιγότερο από τρία χρόνια. Παρατηρείται να μεταναστεύει σε παράκτια ύδατα σε μεγάλα κοπάδια.

- Τόνος (*Thunnus thynnus*).

Ο τόνος βρίσκεται σε ολόκληρο τον Ατλαντικό Ωκεανό, καθώς και στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. Πρόκειται για ένα θερμόαιμο ψάρι το οποίο μπορεί να ζήσει μέχρι και 40 χρόνια.

- Γάδος (*Gadus morhua*).

Ο μπακαλιάρος είναι ψάρια που ζει σε κρύα νερά, τα οποία βρίσκονται σε όλο τον βόρειο Ατλαντικό. Ο γάδος φτάνει σε σεξουαλική ωριμότητα μεταξύ τριών και πέντε ετών και μπορεί να ζήσει μέχρι και 25 χρόνια.

- Χέλι (*Anguilla anguilla*).

Το ευρωπαϊκό χέλι είναι ένα «καταδρομικό» ψάρι - δηλαδή, αναπαράγεται και γεννιέται στη θάλασσα και στη συνέχεια μεταναστεύει σε εσωτερικά ύδατα για να φάει και να αναπτυχθεί. Κατά τη διάρκεια της ζωής του, ταξιδεύει πολλές χιλιάδες μίλια και περνά μέσα από μια σειρά από πολύ διαφορετικά στάδια, που χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο χρώμα τους.

- Μερλούκιο (*Merluccius merluccius*).

Ο μερλούκιος είναι ένα από τα σημαντικότερα αποθέματα βενθοπελαγικών ιχθύων στα ευρωπαϊκά ύδατα και αλιεύεται συχνά σε μεικτή αλιεία σε όλο τον Βορειοανατολικό Ατλαντικό, μαζί με τον μπακαλιάρο, και το νταουκιού του Ατλαντικού.

- Ρέγγα (*Clupea harengus*).

Η ρέγγα του Ατλαντικού είναι ένα λιπαρό ψάρι που βρίσκεται στην ανοιχτή θάλασσα σε ολόκληρο τον Βόρειο Ατλαντικό. Συγκεντρώνονται σε μεγάλα κοπάδια που μπορούν να περιέχουν εκατοντάδες χιλιάδες ψάρια ή περισσότερα.

- Καραβίδα (*Nephrops norvegicus*).

Ο αστακός της Νορβηγίας βρίσκεται σε όλα τα ύδατα της ΕΕ, από τις Αζόρες μέχρι τη Βόρεια Θάλασσα. Δεν απαντάται συχνά στη Μεσόγειο, αν και αλιεύεται στην Αδριατική.

- Γλώσσα και χωματίδα (*Solea solea* και *Pleuronectes plassa*).

Η γλώσσα και η ευρωπαϊκή χωματίδα είναι πλατύψαρα που ζουν σε ρηχά νερά πάνω ή κοντά στο βυθό της θάλασσας, όπου βυθίζονται σε αμμώδη ή λασπώδη πυθμένα. Τρέφονται με μικρά ασπόνδυλα που κατοικούν στο βυθό, συμπεριλαμβανομένων σκουληκιών και καρκινοειδών.

## Κεφάλαιο 2: Αλλοιώσεις Ιχθυηρών

Τα ψάρια και τα θαλασσινά είναι πολύ ευαίσθητα προϊόντα στην αλλοίωση. Ως αλλοίωση θεωρείται κάθε μεταβολή η οποία καθιστά το προϊόν ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Η ποιότητά τους αλλοιώνεται πολύ γρήγορα λόγω τριών μηχανισμών. Την μικροβιακή δραστηριότητα, χημικές οξειδώσεις και ενζυματικές αντιδράσεις (Ashie et al., 1996).

Ακριβώς μετά τον θάνατο των ψαριών η αυτόλυση είναι το αποτέλεσμα της δράσης διαφόρων ενδογενών ενζύμων. Αρχικά, λαμβάνει χώρα ενζυματική αποικοδόμηση της τριφωσφορικής αδενοσίνης και άλλων σχετικών ενώσεων που προκαλούν απώλεια της χαρακτηριστικής φρέσκιας οσμής και γεύσης και στη συνέχεια η δράση διαφόρων προτεολυτικών ενζύμων μαλακώνει τη σάρκα των ψαριών (Ashie et al., 1996).

Τα ένζυμα είναι επίσης υπεύθυνα για τις αλλαγές χρώματος. Το μαύρισμα του κελύφους των καρκινοειδών οφείλεται στη δράση της οξειδάσης πολυφαινόλης στη τυροσίνη και στα παράγωγά της όπως η τυραμίνη (Martinez-Alvarez et al., 2007).

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ο κύριος μηχανισμός αλλοίωσης χημικής φύσης. Η συγκέντρωση οξυγόνου αποκλείουν ή εξαλείφουν αντίστοιχα την οξειδωτική τάγγιση λιπιδίων ψαριών (Ashie et al., 1996).

Η μόλυνση της σάρκας ψαριών με μικροοργανισμούς συμβαίνει επίσης αμέσως μετά το θάνατο. Η υψηλή περιεκτικότητα σε αζωτούχες μη πρωτεϊνικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (NPN) και η χαμηλή οξύτητα (pH=6) της σάρκας ψαριών ευνοούν την ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης.

Καθώς αναπτύσσονται τα βακτήρια παράγουν μεταβολικά παραπροϊόντα και η συσσώρευσή τους προκαλεί οργανοληπτική απόρριψη (Gram and Huss, 1996). Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί προχωρούν σχεδόν ταυτόχρονα. Ωστόσο, η μικροβιακή αλλοίωση είναι ο μηχανισμός που επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα φθοράς των φρέσκων και ελαφρά διατηρημένων ψαριών, ενώ στα μεταποιημένα προϊόντα θαλασσινών όπου επιβραδύνεται η αναστέλλεται η ανάπτυξη μικροβίων, οι μη μικροβιακοί μηχανισμοί διαδραματίζουν καθοριστικότερο ρόλο (Bozaris, I. S., & Parlapani, F. F. 2017, Tsironi, T., and Taoukis, P. S. 2010.)

## 2.1 Μικροβιακή χλωρίδα ιχθυερών

Τα ζωντανά και υγιή ψάρια δεν περιέχουν μικροοργανισμούς στη σάρκα τους. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται μόνο στο δέρμα, στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα (Liston, 1980). Μόνο μετά το θάνατο των ψαριών οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται στη σάρκα. Η αρχική μικροβιολογική χλωρίδα της σάρκας των ψαριών χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή της αφθονία και την υψηλή ποικιλομορφία. Πολλές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι συνολικές βιώσιμες μετρήσεις της σάρκας ψαριών κυμαίνονται συνήθως από 3- 4 log cfu / g, ενώ η ποικιλομορφία της είναι αρκετά υψηλή.

Η αρχική μικροχλωρίδα αποτελείται από διάφορα γένη. Οι *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* και *Aeromonas* είναι τα πιο κοινά Gram αρνητικά, ενώ τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vagococcus*, *Bacillus* και *Clostridium* είναι τα κύρια Gram θετικά βακτήρια. Εντεροβακτηριοειδή, σταφυλόκοκκοι, Λιστέρια και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν επίσης να βρεθούν στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό κυρίως ως μολυσματικότητα μικροβίων (Huss et al., 2000).

Η σύνθεση της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας επηρεάζεται σημαντικά από τη γεωγραφική προέλευση (εύκρατη ή τροπική) και από τα ύδατα (θαλάσσια ή γλυκά νερά) που ζουν σε αυτούς τους υδρόβιους οργανισμούς. Τα ψάρια από τα ψυχρά ήπια ύδατα του Βόρειου Ατλαντικού ή της Βόρειας Θάλασσας περιέχουν κυρίως ψυχοφιλούς και ψυχροτροφούς gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς όπως *Photobacterium*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, ενώ τα ψάρια από τα ζεστά νερά των θερμών ζωνών, όπως η Μεσόγειος Θάλασσα, περιέχουν περισσότερο ή λιγότερο τα ίδια γενικά αλλά όχι ψυχοφιλούς μικροοργανισμούς όπως το *Photobacterium*.

Το *Photobacterium* δεν έχει ανιχνευθεί στη σάρκα ψαριών από τα ελληνικά ύδατα χρησιμοποιώντας κλασικές ή μοριακές τεχνικές (Koutsoumanis and Nychas, 1999, Parlapani et al., 2013). Τα ψάρια από τα τροπικά νερά έχουν λίγο πολύ τα ίδια γένη αλλά περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό Gram-θετικών σε σύγκριση με τα ψάρια από εύκρατες ζώνες. Τα ψάρια από γλυκά ύδατα περιέχουν κυρίως ψευδομονάδες, *Aeromonas* και διάφορα Gram-θετικά (Gram, 2009).

Η δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών οι οποίοι συνδέονται με την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ιχθύων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών με συνέπεια την οργανοληπτική απόρριψη των αλιευτικών προϊόντων, όταν ο πληθυσμός τους φθάσει σε υψηλά επίπεδα της τάξης των 7-9 log cfu/g. Επομένως, η οσμή αποτελεί τον κυριότερο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας. Διάφορες ουσίες με χαρακτηριστική μυρωδιά όπως είναι η τριμεθυλαμίνη (TMA), πτητικές θειούχες ενώσεις, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες και άλλες μικρού μοριακού βάρους ουσίες παράγονται κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων. Το TMAO, αμινοξέα που περιέχουν θείο (υπεύθυνα για το σχηματισμό θειούχων ενώσεων και αμμωνίας), υδατάνθρακες, νουκλεοτίδια (π.χ. ινοσίνη) και άλλες μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή των πτητικών ουσιών στα αλιεύματα (Gram & Huss 1996).

## 2.2 Προέλευση και αποθήκευση ιχθυηρών

Τα ψάρια που παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υψηλές θερμοκρασίες, κυρίως λόγω της θερμοκρασιακής συντήρισης κατά τη διανομή, αλλοιώνονται από τα *Enterobacteriaceae*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Τα ψάρια που αποθηκεύονται κάτω από θερμοκρασίες ψύξης χαλάνε από τους ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς.

Η κύρια αλλοίωση των ιχθυηρών από μικροοργανισμούς σε αερόβιο αποθηκευμένων περιβάλλον ανήκει στα γένη του *Pseudomonas* και της *Shewanella*. Τα θαλάσσια ψάρια και άλλα αλιευτικά προϊόντα από ψυχρά, εύκρατα ύδατα που αποθηκεύονται αερόβια σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλοιώνονται κυρίως από την δράση της *Shewanella* και δευτερευόντως των ειδών *Pseudomonas*. Από την άλλη πλευρά, κυρίως *Pseudomonas spp.* και οι δευτερογενείς *Shewanella putrefaciens* έχουν βρεθεί ότι είναι η μεγάλη αλλοίωση των μικροοργανισμών ψαριών και οστρακοειδών από τα θερμότερα νερά, όπως η περιοχή της Μεσογείου, που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Parlapani and Boziaris, 2016). Ψάρια από θαλάσσια τροπικά ύδατα αποθηκευμένα σε πάγο αλλοιώνονται κυρίως λόγω της δράσης του *Pseudomonas* (Dalgaard, 2003).

Αναφορικά με τα ψάρια γλυκών υδάτων και τα οστρακοειδή από τις εύκρατες ή τροπικές περιοχές, κυρίως οι *Pseudomonas* και *Aeromonas* κυριαρχούν στο αλλοιωμένο προϊόν (Lalitha and Surendram, 2006). Επιπλέον, ακόμη και μικρές διαφορές γεωγραφικής προέλευσης ενδέχεται να επηρεάσουν την επιλογή των κυρίαρχων. Η τσιπούρα από το Αιγαίο που φυλάσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλοιώνεται εξαιτίας της παρουσίας διαφόρων στελεχών *Psychrobacter* και *Pseudomonas* ενώ από το Ιόνιο Πέλαγος καταστρέφεται λόγω του *Pseudomonas* (Parlapani et al., 2016).

## 2.3 Μεταθανάτιος Μεταβολισμός

Με το θάνατο του ζώου η καρδιά σταματά να χτυπάει έχοντας ως αποτέλεσμα το κυκλοφορικό σύστημα να σταματά να τροφοδοτεί τους μύες με οξυγόνο και θρεπτικά υλικά. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο για φυσιολογική αναπνοή, το μιτοχονδριακό σύστημα παύει να λειτουργεί σε όλα τα επιφανειακά κύτταρα .

Η παραγωγή ενέργειας από τα θρεπτικά συστατικά είναι πολύ περιορισμένη και αυτό επιφέρει γρήγορα σημαντικές αλλαγές στον μυϊκό ιστό. Για να αναπληρώσουν το ATP που υδρολύεται συνεχώς και να καλύψουν τις διάφορες ενεργειακά καταναλώτριες δραστηριότητες των κυττάρων βασίζονται στον αναερόβιο μεταβολισμό. Για τα περισσότερα ψάρια η γλυκόλυση είναι η μόνη πιθανή οδός για την παραγωγή ενέργειας όταν έχει διαταραχθεί το κυκλοφορικό σύστημα.



Η γλυκόλυση μπορεί να σταματήσει εξαιτίας της εξάντλησης υποστρωμάτων ή επειδή ορισμένα γλυκολυτικά ένζυμα παύουν να λειτουργούν λόγω της πτώσης του pH που προκαλείται από την υδρόλυση του ATP. Καθώς η γλυκολυτική δραστηριότητα επιβραδύνεται, η συγκέντρωση του ATP μειώνεται, κυρίως λόγω της συνεχιζόμενης δράσης διαφόρων ATPάσεων, με το μεγαλύτερο μέρος του νουκλεοτιδίου να εξαντλείται σε 24 ώρες ή και λιγότερο. (Lougonois, V.P. & Kyrana, V.R. 2005)

## 2.4 Αλλοίωση Λιπιδίων

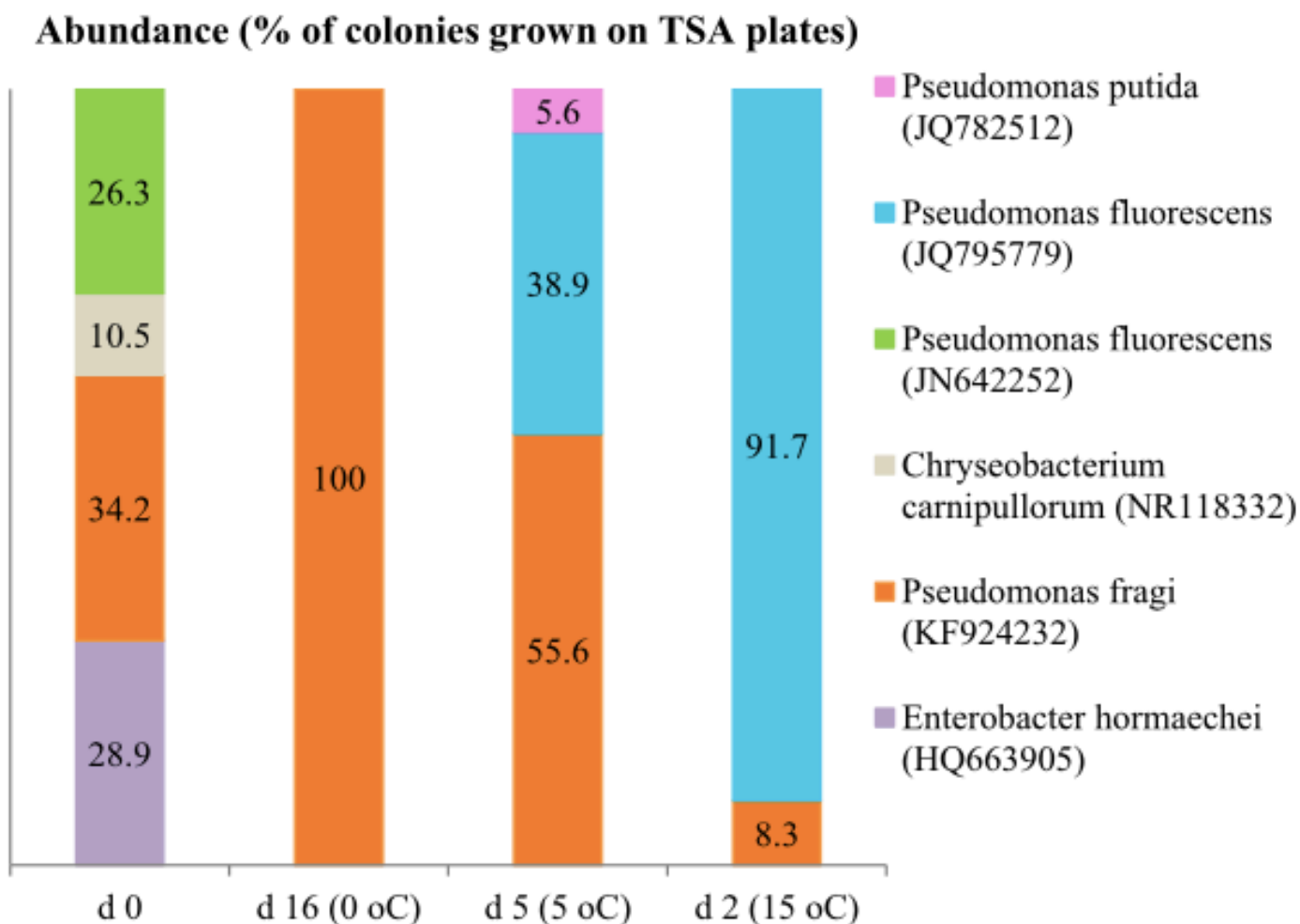
Μετά το θάνατο, τα λιπίδια των ψαριών υπόκεινται σε δύο μεγάλες αλλαγές, δηλαδή την υδρόλυση και την οξείδωση. Από τις δύο διεργασίες, η οξείδωση είναι η πιο σημαντική, ιδιαίτερα στην υποβάθμιση των κατεψυγμένων αλιευτικών προϊόντων, προσδίδοντας αλλαγές στη γεύση, το χρώμα, την υφή και τη θρεπτική αξία. Οι αντιδράσεις που ενέχονται στην οξείδωση και την υδρόλυση λιπιδίων είναι είτε μη ενζυμικές είτε καταλυόμενες από μικροβιακά ένζυμα ή από ενδοκυτταρικά ή πεπτικά ένζυμα του ίδιου του ιχθύος. Σε ποιο βαθμό αυτές οι αντιδράσεις θα επηρεάσουν το προφίλ αλλοίωσης θα εξαρτηθούν από παράγοντες όπως ο τύπος των ψαριών, η ωριμότητα, η εποχή (επίπεδα μετάλλων, λιπιδίων και τοκοφερόλης), το τμήμα ψαριών, η μερική πίεση οξυγόνου και η θερμοκρασία αποθήκευσης. (Lougonois, V.P. & Kyrana, V.R. 2005)

## 2.5 Μικροβιολογικές Αλλοιώσεις Τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι διαφορετικοί για κάθε αλίευμα και μπορεί να αποτελούνται μόνο από ένα είδος βακτηρίων. Στους ιχθύς από τη Μεσόγειο οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι συνήθως οι *Pseudomonas* sp. (Pacquit et al., 2006)

Είναι γνωστό ότι η φθορά των νωπών ψαριών είναι αποτέλεσμα μικροβιακής δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Οι *Pseudomonas* spp. έχουν βρεθεί ότι είναι η σημαντικότερη αλλοίωση των ψαριών από μικροοργανισμούς που προέρχονται από τη Μεσόγειο Θάλασσα και αποθυκαίβονται αερόβια σε ψυχρές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αλλοίωση της τσιπούρας εξαιτίας του κυρίαρχου είδους *Pseudomonas*, είτε *Pseudomonas fragi* σε ολόκληρο και φιλέτο τσιπούρας (Parlapani, Kormas, & Boziaris, 2015).

**Πίνακας 2.1:** Μικροβιολογικές Αλλοιώσεις Τσιπούρας από διάφορα στελέχη μικροοργανισμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης σε αερόβιο περιβάλλον (Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη 2013)



**Πίνακας 2.2:** Η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX), *Pseudomonas sp.*, *Shewanella putrefaciens* (που παράγουν H<sub>2</sub>S) ,*Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικών που καταμετρήθηκαν σε τσιπούρα σε θερμοκρασία συντήρησης 0 °C ( Ζουμπουλα Νικη 2010)

ΗΜΕΡΑ	OMX	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Shewanella putrefaciens (H<sub>2</sub>S)</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Οξυγαλακτικά
0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1,5</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1,5</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
4	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1,5</sup>	10 <sup>1</sup>
6	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1,6</sup>	10 <sup>1</sup>
8	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>1,7</sup>	10 <sup>1</sup>
10	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
12	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
14	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>

**Πίνακας 2.3:** Η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX), *Pseudomonas sp.*, *Shewanella putrefaciens* (που παράγουν H<sub>2</sub>S) ,*Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικών που καταμετρήθηκαν σε τσιπούρα σε θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. ( Ζουμπουλα Νικη 2010)

ΗΜΕΡΑ	OMX	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Shewanella putrefaciens (H<sub>2</sub>S)</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Οξυγαλακτικά
0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
2	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
4	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2,5</sup>	10 <sup>1</sup>
6	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup>
8	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>1</sup>

## Κεφάλαιο 3: Επεξεργασία και συσκευασία νωπής τσιπούρας

Τα ιχθυηρά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι από τα πιο ευαλλοίωτα τρόφιμα. Οι τρόποι αλλοίωσης τους είναι ο μικροβιολογικός ο χημικός και λόγω ενζυμικών αντιδράσεων. Στα φρέσκα ψάρια όμως λόγω της μικρής διάρκειας ζωής ο βασικότερος λόγος αλλοίωσης του προϊόντος είναι ο μικροβιολογικός παράγοντας.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι το βασικό προϊόν παραγωγής της Ελληνικής υδατοκαλλιέργειας εμφανίζοντας μεγάλη οικονομική σημασία. Η μέθοδος όπου συντηρείται η τσιπούρα είναι κατά κύριο λόγο με την παραδοσιακή μέθοδος όπου το ιχθυηρό συσκευάζεται σε φελιζόλ με πάγο, έχοντας σαν συνέπεια την ψύξη του ψαριού σε θερμοκρασία τηκόμενου πάγου επιβραδύνοντας και αδρανοποιώντας την μικροβιακή χλωρίδα που ευθύνεται για την αλλοίωση του ψαριού (Tsironi, T., Gogou, E., Velliou, E., and Taoukis, P. S. 2008).

Με το πέρασμα των χρόνων όμως και με την αύξηση της παγκόσμιας ανταγωνιστικότητας δημιουργήθηκε η ανάγκη για καινοτόμες ιδιαίες συσκευασίας όπου θα έχουν σαν βασικό στόχο την αύξηση της ασφάλειας της ποιότητας και του χρόνου ζωής με ταυτόχρονα μείωση της τιμής του προϊόντος. Ο λόγος όπου ανάγκασε τις εταιρείες για την εύρεση νέων μεθόδων συσκευασίας και επεξεργασίας των νωπών ψαριών είναι ότι υπάρχει η ανάγκη για μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των προϊόντων έχοντας σαν συνέπεια να μπορέσουν να εξάγουν το προϊόν τους σε καινούργιες αγορές αλλά και να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις ποιότητας των καταναλωτών.

Συγκεκριμένα οι τάσεις στην συσκευασία των τροφίμων είναι (i) η τάση της υγείας, (ii) η πράσινη κίνηση και (iii) η τάση για την ασφάλεια των τροφίμων. Οι τρεις κύριες τάσεις έχουν ως στόχο να ενσωματώσουν και να βελτιώσουν τα επίπεδα ευκολίας του καταναλωτή και να ανταποκριθούν στις ανάγκες του περιβάλλοντος. Αναδυόμενες έννοιες ενεργητικών και έξυπνων τεχνολογιών συσκευασίας παρέχουν όλες αυτές τις λειτουργίες και πολλές άλλες καινοτόμες λύσεις για την παράταση της διάρκειας ζωής και τη βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των προϊόντων τροφίμων (Tsironi, T. N., & Taoukis, P. S. 2018, Taoukis, P., and Tsironi, T. 2016).

### 3.1 Συντήρηση ιχθύων υπό ψύξη

Η ψύξη είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης των αλιευμάτων έχοντας ποιοτικά και οικονομικά αποτελέσματα. Με τον τρόπο της ψύξεως τα αλιεύματα συντηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υποβαθμίζεται σημαντικά

η ποιότητά τους. Με την μέθοδο αυτή το προϊόν δεν υποβάλλεται σε επεξεργασία όπου έχει σαν συνέπεια την αύξηση του κόστους παραγωγής του προϊόντος. Ο συνηθέστερος τρόπος όπου γίνεται η ψύξη του προϊόντος είναι με την χρήση πάγου όπου το ιχθυηρό έρχεται σε επαφή με τηκόμενο πάγο έχοντας σαν συνέπεια της ταχείας πτώσης της θερμοκρασίας. Το αρνητικό με αυτήν την μέθοδο είναι ότι υπάρχει αποχρωματισμός του ψαριού κυρίως των βραγχίων για τον λόγο ότι έρχεται σε επαφή με τηκόμενο πάγο όπου ξεπλένει το ψάρι. Για αυτό τον λόγο η ψύξη μπορεί να πραγματοποιηθεί με ψυχρό αέρα αλλά σε αυτήν την περίπτωση δεν διατηρούνται τα ψάρια έφυγρα.

Η συντήρηση σε ψύξη βασίζεται στο γεγονός ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ελαττώνεται ο ρυθμός των χημικών και μικροβιολογικών αλλοιώσεων, με αποτέλεσμα να επιμηκύνεται ο χρόνος διατήρησης των τροφίμων. Η διατηρησιμότητα των ιχθύων ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τη θερμοκρασία αποθήκευσης και την αρχική κατάσταση του προϊόντος. Πλήθος παραγόντων επηρεάζουν τη διατήρηση των αλιευμάτων με ψύξη, κυριότεροι εκ των οποίων είναι το είδος του αλιεύματος, η μέθοδος και η εποχή της αλιείας, η θερμοκρασία συντήρησης, η προκατεργασία (φιλετοποίηση, εκσπλαχνισμός) και η συσκευασία. Η παράταση της διατήρησης των αλιευμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη όταν ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρός. Στην περίπτωση που το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι υψηλό, παρά την εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών ο χρόνος ζωής περιορίζεται σημαντικά. Από το γεγονός αυτό προκύπτει η ανάγκη για άμεση και ταχεία ψύξη των αλιευμάτων αμέσως μετά την αλίευση, η οποία συνήθως επιτυγχάνεται με την εμβάπτιση των ψαριών σε ρευστό πάγο ελαττώνοντας έτσι ταχύτητα την θερμοκρασία του (Tsironi, T., and Taoukis, P. S. 2010, Tsironi, T., et. al., 2016).

### **3.2 Συντήρηση ιχθύων σε υπέρψυξη (superchilling)**

Η κατάψυξη είναι η μέθοδος διατήρησης των τροφίμων σε θερμοκρασίες χαμηλότερες του σημείου έναρξης κατάψυξης, έως  $-32^{\circ}\text{C}$ , οι οποίες προκαλούν την κρυστάλλωση του μεγαλύτερου μέρους των κυτταρικών υγρών. Με την μέθοδο της κατάψυξης έχουμε πλήρη αδρανοποίηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αλλά η οξειδωση των λιπαρών ιδιαίτερος των πολυακόρεστων συνεχίζει να υπάρχει.

Η διαδικασία της κατάψυξης είναι μια πολύπλοκη όπου σε περίπτωση που δεν γίνει σωστά υπάρχει μεγάλη πυθανότητα υποβάθμισης του προϊόντος. Ο μηχανισμός με τον οποίο σχηματίζονται οι κρύσταλλοι του πάγου σε ένα τρόφιμο κατά τη διάρκεια της κατάψυξης (το μέγεθος και ο αριθμός τους) επηρεάζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος σε σημαντικό βαθμό. Η διεργασία της κατάψυξης χωρίζεται σε τρία στάδια. Την προκατάψυξη, την κυρίως κατάψυξη και την ταπείνωση της θερμοκρασίας στη θερμοκρασία αποθήκευσης.

Κατά το στάδιο της προκατάψυξης, αφαιρείται από το τρόφιμο θερμότητα (αισθητή θερμότητα, sensible heat), ώστε να ελαττωθεί η θερμοκρασία από την αρχική της τιμή μέχρι το σημείο έναρξης της κατάψυξης. Κατά την κυρίως κατάψυξη, απομακρύνεται η λανθάνουσα θερμότητα σχηματισμού πάγου του μεγαλύτερου ποσού του νερού. Το στάδιο αυτό είναι συνήθως βραδύ και καταλήγει στο σημείο όπου το μη κατεψυγμένο τμήμα καθίσταται κορεσμένο και τα επιμέρους συστατικά του τροφίμου αποκτούν την ευτηκτική συγκέντρωσή τους. Στο τελικό στάδιο της βαθείας κατάψυξης αφαιρείται η αισθητή θερμότητα πάγου και του μη

κατεψυγμένου τμήματος, μέχρι την τελική θερμοκρασία αποθήκευσης, αλλά και ένα ποσό λανθάνουσας θερμότητας από την περαιτέρω πήξη ποσού νερού λόγω της ταπεινούμενης θερμοκρασίας. Η κατάψυξη έχει ολοκληρωθεί, όταν το μεγαλύτερο μέρος του νερού έχει μετατραπεί σε πάγο (Tsironi, T., and Taoukis, P. S. 2010, Tsironi, T., et. al., 2015).

### **3.3 Συντήρηση ιχθύων με προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών**

Σαν αντιμικροβιακό σύμφωνα με τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA), ορίζονται οι ουσίες που καθυστερούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συνεπώς την αλλοίωση των τροφίμων. Ο μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών βασίζεται σε αντίδραση με συστατικά της μεμβράνης, σε αδρανοποίηση διάφορων ενζύμων, ή σε καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού. Η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) και συνεπώς την επέκταση του χρόνου ζωής του τροφίμου (Davidson *et al.*, 2003).

Η χρήση των αντιμικροβιακών χωρίζεται σε δύο κατηγορίες στα χημικά και στα φυσικά. Τα χημικά έχουν κατηγορηθεί για εμφάνιση καρκινογένεσεων και είναι ύποπτα για την κακή τους δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιούνται στα προϊόντα και οι καταναλωτές τα αποφεύγουν. Σε αντίθεση όμως τα φυσικά αντιμικροβιακά όπου δεν εμφανίζουν κινδύνους στην υγεία των καταναλωτών εμφανίζουν αύξηση στη χρήση τους καθώς οι καταναλωτές το προτιμούν. Τα βασικότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι μπαχαρικά, βότανα και αιθέρια ελαία όπου εκτός από την αντιμικροβιακή τους δράση εμπλουτίζουν το προϊόν με φυσικά αντιοξειδωτικά αρώματα και διαφοροποίηση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Skerget *et al.*, 2005).

### **3.4 Συσκευασία ιχθύων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα**

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι η συσκευασία του ψαριού σε περιβάλλον όπου έχει μεταβληθεί η σύσταση του αέρος της συσκευασίας. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται επέκταση της διάρκειας ζωής του ψαριού χωρίς να έχουμε μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η μέθοδος της τροποποιημένης ατμόσφαιρας χρησιμοποιείται ευρέως στην συσκευασία της τσιπούρας και συνδυάζεται μαζί με την ψύξη. Αναλυτικότερα η συσκευασία της τροποποιημένης ατμόσφαιρας αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο καθώς είναι και η βασική μελέτη της παρούσας έρευνας (Pastoriza L, et.al 1996).



### 3.5 Συνδυασμός μεθόδων και η θεωρία των εμποδίων

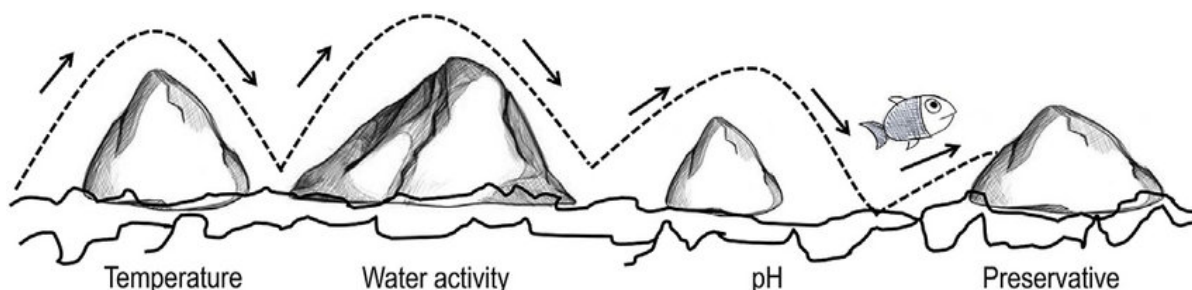
Όπως αναφερθήκαμε και προηγούμενος στην τσιπούρα όταν πρόκειται να συσκευαστεί ο πιο συνηθισμένος τρόπος συντήρησης της είναι η ψύξη σε πάγο. Σήμερα όμως χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων όπου μπορεί να συνδυάζεται και με μεθόδους επεξεργασίας.

Οι μέθοδοι επεξεργασίας μπορεί να μην επιφέρουν μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος όπου είναι ο εκσπλαχνησμός η αφαίρεση των βραγχίων των λεπιών η αποστείρωση με την χρήση υπερύψηλης πίεσης οι άλλων μεθόδων αποστείρωσης που δεν προκαλούν αλλοίωση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ψαριού.

Επίσης μπορεί να υποστεί το δείγμα επεξεργασίες όπου θα υπάρχουν μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά τέτοιες επεξεργασίες είναι η ξήρανση η ώσμωση η κάπνιση το μαρινάρισμα η παστερίωση με την χρήση υψηλής θερμοκρασίας, όμως σε αυτήν την περίπτωση παύει το ψάρι να είναι νωπό και υπάρχουν πολλές μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, για αυτό τον λόγο δεν αναφέρθηκαν και στο παρόν κεφάλαιο.

Ο συνδυασμός των μεθόδων συντήρησης έχει σαν συνέπεια να εκμεταλλευτούμε τα θετικά κάθε μεθόδου και να έχουμε καλύτερα αποτελέσματα. Στην τσιπούρα έχουν εφαρμοστεί όλοι οι παραπάνω μέθοδοι έχοντας κάθε φορά διαφορετικό αποτέλεσμα (Tsironi, et. al., 2015).

Σήμερα, οι καταναλωτές προτιμούν φρέσκα ή ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα υψηλής ποιότητας, πιο «φυσικά», που να παράγονται με την ελάχιστη ποσότητα πρόσθετων έχοντας μικροβιολογική ασφάλεια και επίσης να είναι θρεπτικά και υγιή. Η τεχνολογία των εμποδίων βασίζεται στον συνδυασμό μεθόδων και τεχνικών συντήρησης προκειμένου να δημιουργήσει μια σειρά συντηρητικών παραγόντων (εμπόδια) που οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να ξεπεράσουν. Τα πιο σημαντικά εμπόδια που χρησιμοποιούνται στη διατήρηση των τροφίμων είναι η θερμοκρασία (υψηλή ή χαμηλή), η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ), η οξύτητα (pH), το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh), τα συντηρητικά (π.χ. νιτρώδες, σορβικό) οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (π.χ. βακτήρια γαλακτικού οξέος), και η τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Tsironi, et. al. 2020).



**Εικόνα 3.1:** Αναπαράσταση της θεωρίας των εμποδίων.

## Κεφάλαιο 4: Αλλοιώσεις και MAP

Η σωστή διατροφή έχει πρωταρχική σημασία για την ποιότητα ζωής των ανθρώπων. Ως εκ τούτου, το κρέας ψαριού, λόγω της διατροφικής του αξίας, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή. Ένας αυξανόμενος αριθμός ανθρώπων γνωρίζει τη θρεπτική αξία των ψαριών, ειδικά δεδομένου ότι το κρέας ψαριών είναι σημαντικά λιγότερο επιβαρυνόμενο με τα διάφορα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη χοιροτροφία και πτηνοτροφία. Αυτό που καθιστά τα ψάρια ιδιαίτερα ελκυστικά για τους καταναλωτές είναι ότι, εκτός από την ευνοϊκή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, μέταλλα και βιταμίνες, είναι μια πολύ πλούσια πηγή βασικών λιπαρών οξέων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, το κρέας ψαριών είναι ένα από τα πιο πολύτιμα τρόφιμα (Giménez B, Roncalés P and Beltrán J A 2002).

Το γεγονός ότι τα φρέσκα ψάρια είναι μια πολύ ευπαθής τροφή ( $pH > 6.0$ ,  $a_w > 0.98$ ) έχει ωθήσει τους παραγωγούς να επικεντρωθούν στην εξεύρεση καλύτερων μεθόδων για τη διατήρηση των ψαριών. Τα τελευταία χρόνια, όμως, οι καταναλωτές σε όλο τον κόσμο απαιτούν όλο και περισσότερο να έχουν φρέσκο ψάρι ανά πάσα στιγμή, αφού αυτός ο τύπος ψαριού έχει τις πιο αποδεκτές αισθητικές ιδιότητες. Αυτή η τάση έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας για τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών, εξασφαλίζοντας έτσι μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των ψαριών και διατηρώντας τις βασικές παραμέτρους που σχετίζονται με τη φρεσκάδα των ψαριών. Η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου και επομένως του νωπού ψαριού μπορεί να οριστεί ως ο χρόνος μετά τη συσκευασία των τροφίμων κατά τη διάρκεια της οποίας το προϊόν είναι κατά κύριο λόγο ασφαλές για κατανάλωση και κατά το οποίο οι αισθητικές ιδιότητες του προϊόντος (χρώμα, οσμή, γεύση, υφή) και η διατροφική του αξία παραμένει αμετάβλητη και αποδεκτή από τον καταναλωτή (Sivertsvik M, Jeksrud W K and Rosnes J T 2002 ).

Το MAP χρησιμοποιείται σήμερα στην παραγωγή νωπών και διατηρημένων με απλή ψύξη τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του ακατέργαστου και θερμικώς επεξεργασμένου κρέατος, των πουλερικών, των ψαριών, των αρτοσκευασμάτων, των φρούτων και των λαχανικών και, πιο πρόσφατα, του καφέ, του τσαγιού και των προϊόντων αρτοποιίας (J Babic Milijasevic *et al* 2019, Tsironi, T., *et.al.*, 2011).

## 4.1 Αρχή του MAP

Το MAP μπορεί να οριστεί ως αφαίρεση αέρα από τη συσκευασία και αντικατάστασή του με ένα συγκεκριμένο αέριο ή μείγμα αερίων. Σκοπός αυτής της τεχνολογίας είναι η παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων με την παρεμπόδιση ή επιβράδυνση τόσο των βιοχημικών διεργασιών (οξειδωση λιπιδίων, αντιδράσεις που προκαλούνται από τις δραστηριότητες των ίδιων των ενζύμων) όσο και της ανάπτυξης βακτηρίων που προκαλούν αλλοίωση του προϊόντος.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αέρια στην τεχνολογία MAP είναι το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), το οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) και το άζωτο ( $\text{N}_2$ ). Αυτά τα αέρια χρησιμοποιούνται σε διάφορους συνδυασμούς και οι ρόλοι τους στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα διαφέρουν. Ενώ το  $\text{N}_2$  είναι ένα αδρανές και άγευστο αέριο με στόχο την πρόληψη της κατάρρευσης της συσκευασίας, το  $\text{CO}_2$  αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών τύπων μικροοργανισμών, ιδιαίτερα εκείνων που προκαλούν αλλοίωση και δυσάρεστες οσμές σε τρόφιμα αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες ψυγείου.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του  $\text{CO}_2$  είναι ότι δεν είναι τοξικό για τον άνθρωπο. Το  $\text{CO}_2$  είναι εξαιρετικά διαλυτό σε νερό και λίπος και η διαλυτότητα του αυξάνεται με μειωμένη θερμοκρασία. Επομένως, η αποτελεσματικότητα αυτού του αερίου εξαρτάται πάντοτε από τη θερμοκρασία αποθήκευσης τροφίμων, με αυξημένη αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης καθώς η θερμοκρασία μειώνεται. Η βακτηριοστατική επίδραση του  $\text{CO}_2$  εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του και τη θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύεται η τροφή. Ενώ οι μηχανισμοί δράσης βασίζονται σε αλλαγές στη διαπερατότητα της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης, στην αναστολή των ενζύμων, στη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και αλλαγή στο pH των βακτηριδιακών κυττάρων. (Pastoriza L, et.al 1996; Theofania N. Tsironi and Petros S. Taoukis 2018; Tsironi, T., Tsevdou, M., Velliou, E., Taoukis, P. 2008)

Το  $\text{O}_2$  παίζει σημαντικό ρόλο στο MAP, ειδικά στη συσκευασία νωπού κρέατος. Υψηλά επίπεδα  $\text{O}_2$  χρησιμοποιούνται στο MAP για το κόκκινο κρέας και το κόκκινο κρέας ψαριών (τόνος, φάλαινα) για τη διατήρηση της χρωστικής μυοσφαιρίνης στο κρέας με οξυγονωμένη μορφή, δίνοντας έτσι στο κρέας ένα έντονο κόκκινο χρώμα, αποδεκτό από τον καταναλωτή. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του  $\text{O}_2$  σε MAP διατηρείται κανονικά όσο το δυνατόν χαμηλότερη για να αναστείλει την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων αλλοίωσης (Goulas A E and Kontominas M G 2007, Tsironi, T., Tsevdou, M., Velliou, E., and Taoukis, P. 2008).

## 4.2 Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε ψάρια και προϊόντα ψαριών

Κατά την τελευταία δεκαετία, η προσοχή των ερευνητών που ασχολούνται με την επίλυση προβλημάτων που σχετίζονται με τη συσκευασία των ψαριών έχει

επικεντρωθεί κυρίως σε μείγματα αερίων με υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> και N<sub>2</sub>. Ο αντίκτυπος του MAP στη διάρκεια ζωής του φρέσκου ψαριού και το πλέον κατάλληλο μείγμα αερίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Όπου είναι το είδος του ψαριού, το υλικό συσκευασίας, την περιεκτικότητα σε λιπαρά, το αρχικό επίπεδο μικροβιολογικής μόλυνσης, το χειρισμό των ψαριών μετά το αλίευμα, την αναλογία όγκου αερίου προς τα ψάρια στη συσκευασία και, κυρίως, τη μέθοδο συσκευασίας και τις συνθήκες αποθήκευσης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, το MAP μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ποιότητα του συσκευασμένου ψαριού λόγω της διάλυσης του CO<sub>2</sub> στο κρέας των ψαριών, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ανθρακικού οξέος. Επιπλέον, σε χαμηλότερα pH, μειώνεται η ικανότητα του ψαριού να δεσμεύει το νερό, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του χυμού ψαριού από τα ψάρια στη συσκευασία, και αυτός ο χυμός αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλοίωσης .

Για τους λόγους αυτούς, πρέπει να προσδιοριστεί η βέλτιστη αναλογία αερίων στο μείγμα. Ο λόγος μεταξύ του όγκου του αερίου και του όγκου του προϊόντος διατροφής (λόγος G / P) θα πρέπει να είναι συνήθως 2: 1 ή 3: 1 (όγκος αερίου δύο ή τρεις φορές τον όγκο της τροφής). Αυτός ο υψηλός λόγος G / P είναι επίσης απαραίτητος για να αποφευχθεί η κατάρρευση της συσκευασίας, επειδή η διαλυτότητα του CO<sub>2</sub> στα τρόφιμα σημαίνει ότι ο όγκος του αερίου μειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του (Provincial L, Gil M et. al 2010).

Η διάρκεια ζωής των φρέσκων, διατηρημένων με απλή ψύξη ψαριών είναι σχετικά μικρή και σε θερμοκρασίες  $2 \pm 2$  ° C είναι περίπου 2 έως 3 ημέρες. Έχει επιβεβαιωθεί ότι η συσκευασία των ψαριών σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα επεκτείνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Η επίδραση του MAP στη διάρκεια ζωής των τροφίμων γενικά έχει αναθεωρηθεί από πολλούς συγγραφείς τις τελευταίες δεκαετίες.

Σε ατμόσφαιρα 100% CO<sub>2</sub>, τα ψάρια διατηρήθηκαν φρέσκα δύο έως τρεις φορές περισσότερο από τον έλεγχο των ψαριών στον αέρα στην ίδια θερμοκρασία. Ο νωπός μπακαλιάρος, ο γάδος, η γλώσσα, το προσφυγάκι και η ευρωπαϊκή γλώσσα διατηρήθηκαν πολύ αποτελεσματικά κάτω από 20-100% ατμόσφαιρες CO<sub>2</sub>, με βέλτιστες συνθήκες κάτω από 40-50% CO<sub>2</sub> (Coyne F P 1933). Από τις πρώτες αυτές έρευνες έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες σχετικά με αυτό το θέμα, μερικοί από τους οποίους αναφέρουν μια τεράστια αύξηση της διάρκειας ζωής, άλλοι που αναφέρουν ελάχιστη ή καθόλου επέκταση διατήρησης, αλλά συχνότερα, διάρκεια επέκτασης στο ράφι στο εύρος 30-60% για παρατηρούνται φρέσκα αλιευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούν ατμόσφαιρες με υψηλά επίπεδα CO<sub>2</sub> (Pantazi D, et. al 2008, Tsironi, T., Tsevdou, M., Velliou, E., and Taoukis, P. 2008).

#### **4.3 Μικροβιακοί παράμετροι για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται σε MAP**

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η σύνθεση της κυρίαρχης μικροχλωρίδας των ψαριών και των προϊόντων αλιείας MAP εξαρτάται από το μείγμα αερίων που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία. Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις

του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες αναστέλλονται σε συνθήκες MAP από το CO<sub>2</sub> και ως εκ τούτου ο ρόλος τους στην αλλοίωση των ψαριών στο μείγμα των αερίων MAP είναι ασήμαντος.

Γι' αυτό το λόγο η κυρίαρχη μικροχλωρίδα στα ψάρια που συσκευάζονται στο MAP είναι ανθεκτική στο CO<sub>2</sub>. Αντίθετα με τη συσκευασία υπό κενό των ψαριών, όπου οι συνθήκες είναι τέτοιες ώστε να διεγείρουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν οξειδίο τριμεθυλαμίνης (TMAO) ως πηγή O<sub>2</sub>. Το μίγμα των αερίων MAP αναστέλλει την ανάπτυξη τόσο των μικροοργανισμών που παράγουν τριμεθυλαμίνη (TMA) αλλά και αυτούς που παράγουν υδρόθειο.

Βασικά, τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι πολύ πιο ευαίσθητα στην ανασταλτική επίδραση του CO<sub>2</sub>. Αυτό επιβεβαιώθηκε στην έρευνα με τεμάχια κυπρίνων που συσκευάστηκαν σε διάφορα μείγματα αερίων (100% CO<sub>2</sub> και 60% N<sub>2</sub> + 40% CO<sub>2</sub>) και αποθηκεύτηκαν στους 3°C οι αριθμοί των μεσόφιλων βακτηριδίων ήταν χαμηλότεροι στον κυπρίνο που είχε συσκευαστεί σε MAP με 100% CO<sub>2</sub> σε σύγκριση με τον κυπρίνο που συσκευάστηκε σε MAP με 60% CO<sub>2</sub>. Σημειώθηκαν επίσης σημαντικές μειώσεις του συνολικού αριθμού των μεσοφιλικών βακτηρίων σε φρέσκα φιλέτα λαβρακιού, σαρδέλες και φιλέτα πέστροφας συσκευασμένα σε μίγματα αερίων MAP με υψηλά περιεκτικά σε CO<sub>2</sub> (Sivertsvik M, Jeksrud W K and Rosnes 2002).

Σύμφωνα με τις συστάσεις της Διεθνούς Επιτροπής για τις μικροβιολογικές προδιαγραφές για τα τρόφιμα, ο συνολικός αριθμός των μεσοφιλικών βακτηρίων σε νωπά ψάρια δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 7 log cfu/g.

Μια καλή συσχέτιση μεταξύ των αισθητήριων ιδιοτήτων και του αριθμού των μεσοφιλικών βακτηρίων σε φιλέτα κυπρίνων που συσκευάστηκαν στο MAP αναφέρθηκε: Ότι, τη στιγμή που τα ψάρια αξιολογήθηκαν ως απαράδεκτα από αισθητική άποψη, ο αριθμός των μεσοφιλικών βακτηριδίων ήταν υψηλότερος από αυτό το συνιστώμενο όριο (7 log cfu / g). Ο συνολικός αριθμός των μεσοφιλικών βακτηρίων είναι ένας καλός δείκτης συνολικής αποδοχής φιλέτων σολομού συσκευασμένων σε MAP με 40% CO<sub>2</sub> + 60% N<sub>2</sub> και αποθηκευμένη στους 0°C. Ωστόσο, στις φρέσκες σαρδέλες που συσκευάστηκαν σε ένα μείγμα αερίων MAP (60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>), σε κενό και αέρα, υπήρξε κακή συσχέτιση μεταξύ συνολικής αποδοχής και συνολικού αριθμού μεσοφιλικών βακτηρίων. Δεδομένου ότι ο συνολικός αριθμός βακτηρίων έφτασε στο μέγιστο το συνιστώμενο όριο, ενώ τα αισθητήρια χαρακτηριστικά των σαρδελών ήταν ακόμη αποδεκτά.

Το *Photobacterium phosphoreum*, ανθεκτικό στο CO<sub>2</sub>, είναι συνήθως υπεύθυνο για την αλλοίωση των ψαριών MAP. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα βακτηρίδια γαλακτικού οξέος, κυρίως *Lactobacillus spp.* και *Leuconostoc spp.* καθώς και το *Brochothrix thermosphacta* δεν είναι ευαίσθητα στην επίδραση του CO<sub>2</sub> και ως εκ τούτου, αυτά γίνονται τα κυρίαρχα γένη στα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών που συσκευάζονται σε μίγματα αερίων MAP. Αυτό έχει θετικές επιπτώσεις στη διάρκεια ζωής των ψαριών, καθώς αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν λιγότερες δυνατότητες να προκαλέσουν αλλοίωση. Πρέπει να σημειωθεί ότι το χαμηλό επίπεδο υδατανθράκων στο κρέας ψαριών αποτρέπει την εμφάνιση της ξινής γεύσης που προκύπτει από τη δραστηριότητα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος στη διαδικασία αποσύνθεσης των υδατανθράκων.

Γενικά, ο αρχικός αριθμός βακτηρίων γαλακτικού οξέος στο κρέας των ψαριών είναι χαμηλός και τα βακτήρια αυτά είναι σπάνια υπεύθυνα για την

αλλοίωση των ψαριών. Ωστόσο, όταν η ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων αναστέλλεται, είτε με την εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών είτε με την τροποποίηση της ατμόσφαιρας, τα βακτηρίδια γαλακτικού οξέος καθίστανται ο κυρίαρχος βακτηριακός πληθυσμός, όπως επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα μελετών σε κοπές κυπρίνων και εκσπλαχνισμένη πέστροφα. (Gimenéz B, Roncalés P et. al. 2002).

Κατά την αποθήκευση σε φιλέτα σκουμπριού Ατλαντικού σε συσκευασμένα σε MAP με 100% CO<sub>2</sub> στους -2°C, προσδιορίστηκε η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος προς το τέλος της μελέτης, τα οποία αποτελούν την κυρίαρχη μικροβιακή χλωρίδα. Τα αποτελέσματα πολυάριθμων μελετών έδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> (70-100%) έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυρίως ετεροφυτικών *Lactobacillus spp.* σε ψάρια MAP. Επίσης, τα βακτηρίδια γαλακτικού οξέος αποτελούν το 62-85% των μικροβίων που εμπλέκονται στην αλλοίωση των συσκευασμένων σε μείγματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> (90-100%) ιχθύων ( Provincial L, Gil M, Guillen E, et. al. 2010).

**Πίνακας 4.1: Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης και επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης και MAP (60% CO<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>) (Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη 2013).**

Προϊόν	Θερμοκρασία αποθήκευσης (°C)	Χρόνος απόρριψης (ημέρες)	Επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού (log cfu/g)
	0 (πάγος)	16	7,75
Ολόκληροι ιχθύες	5	5	7,56
	15	2	7,68
Φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες	0	14	7,78
	5	5	7,75
	15	2	7,53
Φιλέτα σε MAP	0	18	7,75
	5	8	7,94
	15	2	8,30

## 4.4 Χημικοί και φυσικοχημικοί παράμετροι σημαντικοί για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται στο MAP

### 4.4.1 Το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N)

Ο TVB-N είναι ένας χημικός δείκτης της φρεσκάδας των ψαριών. Το ολικό πτητικό N<sub>2</sub> αποτελείται από ενώσεις υπεύθυνες για τον σχηματισμό δυσάρεστης οσμής και γεύσης στο κρέας ψαριών, μεταξύ των οποίων αμμωνία, διμεθυλαμίνη (DMA), TMA, αμίνες προερχόμενες από την αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων και άλλες αζωτούχες ενώσεις που γίνονται πτητικές όταν μετατρέπονται στις αλκαλικές τους μορφές. Η αμμωνία σχηματίζεται στη διαδικασία της βακτηριακής αποσύνθεσης πρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων, καθώς και στην αυτολυτική αποσύνθεση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP). Η διμεθυλαμίνη και η TMA παράγονται με την αποικοδόμηση του TMAO, μιας ένωσης που παίζει σημαντικό ρόλο στον οσμоруθμό και η παρουσία του οποίου έχει αποδειχθεί σε όλα τα θαλάσσια και σε μεγάλο αριθμό ειδών ψαριών γλυκού νερού. Η δραστηριότητα ενδογενών ενζύμων ψαριών έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνθεση του TMAO και τον σχηματισμό DMA και φορμαλδεΐδης. Σε αναερόβιες συνθήκες και με τη χρήση του TMAO ως τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναερόβια αναπνοή, τα βακτήρια που προκαλούν αλλοίωση των ψαριών ενισχύουν το σχηματισμό του TMA, μιας ένωσης υπεύθυνης για τη χαρακτηριστική οσμή των ψαριών που έχουν αλλοιωθεί ( Goulas A. E., Kontominas M. G., 2007 ).

Η συσκευασία των ψαριών σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης της δημιουργίας του TVB-N. Μια χαμηλότερη μέση αύξηση του TVB-N βρέθηκε στον κυπρίνο και την πέστροφα σε MAP με 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>, σε σχέση με το MAP με χαμηλότερο ποσοστό CO<sub>2</sub> (40% CO<sub>2</sub> + 60% N<sub>2</sub>) ή σε κενό. Εξέταση πολλών διαφορετικών αέριων μιγμάτων στη διάρκεια ζωής των φιλέτων πέστροφας αποθηκευμένων στους 1 ° C σε σχέση με τον σχηματισμό του TVB-N, ανεξάρτητα από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου αέριου μείγματος συνιστάτε ότι 25 mg N / 100 g σε κρέας πέστροφας είναι το υψηλότερο αποδεκτό όριο για την TVB-N. Παρόλο αυτά η τιμή TVB-N δεν μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλος δείκτης της φρεσκάδας των μυών των ψαριών, διότι όταν τα ψάρια θεωρούνται ως αισθητικά απαράδεκτα, το TVB-N δεν υπερβαίνει αναγκαστικά τη συνιστώμενη τιμή των 25 mg N / 100 g (Stamatis N., Arkoudelos J. S., 2007 ).

#### 4.4.2 pH

Μια σημαντική φυσικοχημική παράμετρος που επηρεάζει την ποιότητα των ψαριών είναι το pH. Πολλοί συντάκτες δηλώνουν ότι το pH των ψαριών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ωστόσο, η ανάπτυξη βακτηρίων γαλακτικού οξέος είναι η κύρια αιτία της μείωσης του pH στα συσκευασμένα ψάρια. Σύμφωνα με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας, η μείωση του pH συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών συσκευάζονται σε αέρια που περιέχουν CO<sub>2</sub>. Από τη μία πλευρά, αυτό είναι συνέπεια της διαλυτότητας του CO<sub>2</sub> στους ιστούς, σχηματίζοντας ανθρακικό οξύ που με τη σειρά του μειώνει το pH. Από την άλλη πλευρά, οι μειώσεις του pH προκαλούνται από την αντιμικροβιακή δράση του CO<sub>2</sub>, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών με μεταβολική δραστηριότητα που οδηγεί στη συσσώρευση βασικών συστατικών (Pantazi D, Papavergou A, et. al. 2008 ).

#### 4.5 Αισθητήριοι παράμετροι σημαντικοί για τη διάρκεια ζωής των ψαριών που συσκευάζονται στο MAP

Οι καταναλωτές αξιολογούν το ψάρι με βάση ορισμένους παράγοντες, όπου οι σημαντικότεροι είναι η ασφάλεια, τα διατροφικά χαρακτηριστικά, η γεύση, η οσμή, το χρώμα, η υφή, η ευκολία για μαγειρική επεξεργασία και συντήρηση.

Οι μεταβολές στο κρέας των ψαριών αρχίζουν τη στιγμή που τα ψάρια πεθαίνουν ή και νωρίτερα κατά τη στιγμή της αλίευσης και είναι το αποτέλεσμα των δραστηριοτήτων των ίδιων των ενζύμων του ιχθύος, του μεταβολισμού των μικροοργανισμών και της οξειδωσης των λιπιδίων. Οι αλλαγές στα αισθητήρια χαρακτηριστικά των ψαριών συνήθως προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών.

Η αποσύνθεση των ψαριών και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών προκαλούν μια δυσάρεστη οσμή και γεύση, καθώς και την παραγωγή ορατών χρωστικών ή μη χρωματισμένων αποικιών. Η σύνθεση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών και των διάχυτων χρωστικών οδηγεί σε αισθητηριακές αλλαγές στη μορφή σχηματισμού βλεννογόνων και αποχρωματισμού . Από την άλλη πλευρά, οι χημικές μεταβολές όπως η αυτο-οξειδωση ή η ενζυματική υδρόλυση των λιπών μπορούν να προκαλέσουν την αύξηση της δυσάρεστης οσμής και γεύσης ή, στην τελευταία περίπτωση, η δραστηριότητα των ενζύμων των ιστών μπορεί να οδηγήσει σε πολύ μαλακή σάρκα των ψαριών (Masniyom P, Benjama O., Maneesri J., 2013 ).



**Πίνακας 4.2: Μικροβιολογικές μεταβολές σε φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε MAP (60% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>) σε συντήρηση στους 5 °C. ( Σάββα Αμαλία 2013)**

<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b>OMX</b>	<b><i>Pseudomonas sp.</i></b>	<b><i>Shewanella putrefaciens (H<sub>2</sub>S)</i></b>
<b>0</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>2</b>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3,7</sup>
<b>4</b>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4,3</sup>	10 <sup>4</sup>
<b>6</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
<b>8</b>	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
<b>10</b>	10 <sup>7,4</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>

<b>ΗΜΕΡΑ</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>Οξυγαλακτικά</b>	<b><i>Aeromonas spp.</i></b>
<b>0</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3,2</sup>
<b>2</b>	10 <sup>3,3</sup>	10 <sup>2,5</sup>	10 <sup>3,7</sup>
<b>4</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3,8</sup>
<b>6</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>5</sup>
<b>8</b>	10 <sup>4,2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6,5</sup>
<b>10</b>	10 <sup>4,4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>

## Κεφάλαιο 5: Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS)

### 5.1 Η ανάλυση DNA μέσω NGS

Η νέα μέθοδος Αλληλουχίας DNA Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS), αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα άλματα της μοριακής βιολογίας των τελευταίων 20 ετών. Η ανάλυση DNA μέσω NGS αποτελεί την πλέον σύγχρονη τεχνολογία ανάλυσης DNA με τις εφαρμογές της να πληθαίνουν καθημερινά τόσο στην έρευνα όσο και στην παροχή υπηρεσιών υγείας, στη βιομηχανία τροφίμων, στη βοτανική, στη μικροβιολογία, στην κτηνοτροφία, κ.α.

Η NGS επιτρέπει τη μαζική ταυτόχρονη αλληλούχιση DNA από μικρή ποσότητα δείγματος, με μεγάλη ακρίβεια και σε υποπολλαπλάσιο χρόνο σε σχέση με την κλασική μεθοδολογία (Sanger sequencing). Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν φέρει επανάσταση στην Βιολογία όσο αφορά στον προσανατολισμό ερευνών και εφαρμογών, στην ταχύτητα απαντήσεων σε αναλύσεις (Divoll, T. J., et.al 2018).

### 5.2 Η γονιδιωματική έρευνα

Η Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), περιγράφει μία αλληλουχία του DNA που έχει ευρεία εφαρμογή στη γονιδιωματική έρευνα. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία επόμενης γενιάς, ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να αλληλουχηθεί μέσα σε μία μόνο ημέρα. Σε αντίθεση με την προηγούμενη τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας Sanger, που χρησιμοποιείται για να αποκρυπτογραφήσει το ανθρώπινο γονιδίωμα, η οποία απαιτεί μια δεκαετία για να παραδώσει το τελικό σχέδιο. Οι πλατφόρμες NGS που χρησιμοποιούν διαφορετικές τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας είναι αρκετές. Ωστόσο, όλες οι πλατφόρμες NGS διεξάγουν παράλληλα την αντιστοίχιση εκατομμυρίων μικρών θραυσμάτων DNA.

Η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς, επιτρέπει την ανάλυση εκατοντάδων κομματιών DNA στον ίδιο χρόνο και είναι γνωστή ως Μαζική Παράλληλη Αλληλούχιση. Ο όρος Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS) δε σημαίνει μία ενιαία τεχνική, αλλά αναφέρεται σε συλλογή τεχνολογιών προσδιορισμού αλληλουχιών.

Η αλληλουχία DNA υψηλής ανάλυσης, που επέτρεψε η πρόοδος στην τεχνολογία αλληλούχισης (NGS), έχει φέρει επανάσταση σε πολλούς τομείς της βιολογίας, συμπεριλαμβανομένης της ιατρικής μικροβιολογίας, της γονιδιωματικής των φυτών και των ζώων, και της μελέτης της γονιδιακής μεταγραφής. Η καινοτομία στις τεχνολογίες αλληλουχίας συνεχίζεται και η πλατφόρμα υψηλότερης απόδοσης είναι τώρα ικανή να αναλύσει 18.000 ανθρώπινα γονιδιώματα σε ένα μόνο χρόνο. Με τη χρήση των συσκευών NGS μεγάλος αριθμός τμημάτων DNA μπορούν να

αλληλουχηθούν ταυτόχρονα και στην ίδια αντίδραση. Η αντίδραση αυτή καλείται μαζική παράλληλη αλληλούχιση.

### 5.3 Η πυροαλληλούχιση

Η πυροαλληλούχιση (pyrosequencing), η παλαιότερη από τις τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς, μπορούσε να αλληλουχίσει 500 εκατομμύρια βάσεις, με ακρίβεια 99% σε ένα μόλις τρέξιμο και η απόδοσή της ήταν 2000 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αλληλούχιση κατά Sanger.

Οι πιο πρόσφατες συσκευές έχουν πολύ μεγαλύτερη απόδοση. Οι πλατφόρμες NGS που χρησιμοποιούν διαφορετικές τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας είναι αρκετές ωστόσο, το κοινό τους γνώρισμα είναι ότι όλες οι πλατφόρμες NGS διεξάγουν παράλληλα την αλληλούχιση εκατομμυρίων μικρών θραυσμάτων DNA.

Κάποιες από τις τεχνολογίες (πλατφόρμες) που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται είναι η Roche 454 FLX, η Illumina Genome Analyzer (GA)/Solexa, η AB SOLiD και η PGM /Ion Torrent. Κάθε πλατφόρμα ενσωματώνει μια σύνθετη αλληλεπίδραση ενζυμολογίας, χημείας, υψηλής ανάλυσης ανίχνευση, υπολογιστικής και λογισμικής μηχανικής. Τα μέσα αυτά επιτρέπουν τη βελτιωμένη προετοιμασία του δείγματος πριν από την αλληλούχιση του DNA, την ίδια τη διαδικασία αλληλούχισης, αλλά και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εξοικονομώντας χρόνο και απαιτώντας ελάχιστο εξοπλισμό πέρα του αυτοματοποιημένου συστήματος.

Οι τεχνικές της αλληλούχισης και κυρίως το NGS χρησιμοποιούνται όταν είναι αναγκαία η εξέταση ολόκληρης μεγάλης γονιδιακής περιοχής χρωμοσωμάτων ή και ολόκληρου του γονιδιώματος σε ανθρώπους, ενώ η βιοπληροφορική είναι χρήσιμη για την ανάλυση τέτοιων μεγάλων δεδομένων (Tsironi, et. al. 2020).

## Κεφάλαιο 6: Υλικά και Μεθόδοι Α΄ πειραματικής διαδικασίας

### 6.1 Στόχος πειραματικής διαδικασίας

Ο στόχος της πειραματικής διαδικασίας είναι να γίνει ο εντοπισμός των μικροοργανισμών που επικρατούν στα δείγματα με την μέθοδο NGS. Ο λόγος που επιλέχθηκε η NGS για τον εντοπισμό των μικροοργανισμών είναι για τον λόγο ότι μέσω αυτής της μεθόδου μπορούμε να εντοπίσουμε με ακρίβεια τους μικροοργανισμούς που επικράτησαν στο δείγμα. Οι χρονικές στιγμές που θα γίνουν οι αναλύσεις του NGS είναι η πρώτη μέρα όπου η μικροβιακή χλωρίδα είναι η ίδια στο δείγμα που είναι στην αερόβια συσκευασία με το δείγμα που έχει συσκευαστεί σε MAP. Και την ημέρα όπου θα παρατηρηθεί η αλλοίωση του κάθε προϊόντος ξεχωριστά. Δηλαδή την ημέρα που θα κριθεί ακατάλληλο προς κατανάλωση το προϊόν που έχει συσκευαστεί σε MAP και σε αερόβια συσκευασία . Οι έλεγχοι που θα κρίνουν ότι το ψάρι είναι ακατάλληλο βασίζονται σε οργανοληπτικές αξιολογήσεις που γίνονται κατά κύριο λόγο έλεγχοι οσφρητικοί , αφής , όρασης.



**Εικόνα 5.1:** Συσκευασία δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα

## 6.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Τα δείγματα πάρθηκαν την Τετάρτη 11-03-2020, όπου τα ιχθυηρά εξαλιεύθηκαν την ίδια μέρα και θεωρείται και η μέρα μηδέν. Την Πέμπτη 12-03-2020 τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο όπου και συσκευάστηκαν. Πέντε δείγματα συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα όπου η σύσταση των αερίων ήταν 62,1% CO<sub>2</sub> , 9,2% O<sub>2</sub> , 28,7% N<sub>2</sub>. Τα ιχθυηρά συσκευάστηκαν σε ιδικά σακουλάκια πολυστρωματικού υλικού και διαπερατότητας:

- water vapor transmission (g/m<sup>2</sup>d)=2,7
- O<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>dbar)=56,7
- CO<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>dbar)=170
- N<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>dbar)=11 .

Τα δείγματα αμέσως μετά την συσκευασία μεταφέρθηκαν σε ψυγείο θερμοκρασίας 3°C και τα δείγματα τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία με μεγάλη ποσότητα πάγου έτσι ώστε τα ιχθυηρά να έρχονται σε επαφή με θερμοκρασία τηκόμενου πάγου δηλαδή 0°C.

## 6.3 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων

Τα δείγματα αφού έχουν συσκευαστεί και έχουν τοποθετηθεί σε ψυκτικό θάλαμο θα πρέπει ανά τακτά χρονικά διαστήματα να ελέγχονται ποιοτικώς έτσι ώστε να διαπιστωθεί πότε το δείγμα είναι αλλοιωμένο για να γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού βρίσκοντας με αυτόν τον τρόπο την μικροβιακή χλωρίδα των δειγμάτων. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα θα ελέγχονται και θα συγκρίνονται έτσι ώστε να συγκριθούν και να βρεθούν ενδείξεις αλλοίωσης όπου υποβαθμίζουν την ποιότητα του ιχθυηρού.

Αρχικά τα δείγματα λαμβάνονται από τον ψυκτικό θάλαμο όπου ελέγχεται η θερμοκρασία του ψυκτικού θαλάμου με την χρήση θερμομέτρου. Αφού ληφθούν τα δείγματα όπου βρίσκονται μέσα σε πλαστικά δοχεία με μεγάλη ποσότητα πάγου έτσι ώστε να έρχεται το ιχθυηρό σε έμεση επαφή με θερμοκρασία τηκόμενου πάγου. Τα δείγματα αφαιρούνται από το πλαστικό δοχείο και στην συνέχεια αφαιρούνται από το πλαστικό σακουλάκι. Για το ιχθυηρό που είναι συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα πριν γίνει οποιοσδήποτε έλεγχος θα πρέπει να ελέγξουμε ότι δεν υπάρχει διαρροή αερίου και ότι υπάρχει αέριο μέσα στην συσκευασία.

Αφού ληφθούν τα ψάρια ελέγχουμε την εξωτερική τους εμφάνιση. Αρχικά με την όραση ελέγχουμε τα χρώματα την γυαλάδα και το σχήμα του ιχθυηρού την κατάσταση των οφθαλμών, στην συνέχεια με την όσφρηση ελέγχουμε το άρωμα τους όπου μέσω του αρώματος μπορούμε να διαπιστώσουμε αλλοίωση. Έπειτα με την χρήση της αφής ελέγχουμε την σκληρότητα και την επιφάνεια του. Αφού έχει

τελειώσει ο εξωτερικός έλεγχος της εμφάνισης του ιχθυηρού ακολουθείτε έλεγχος στα εσωτερικά όργανα. Αρχικά ελέγχονται τα βράγχια όπου αφού ανασηκώθούν τα βραγχιακά επικαλύμματα θα πρέπει να ελεγχθεί η οσμή των βραγχίων έτσι ώστε να μην χαθούν οι πτητικές ουσίες. Αφού ελεγχθεί το άρωμα των βραγχίων στην συνέχεια ελέγχεται το χρώμα τους όπου είναι ένας από τους βασικότερους ελέγχους της ποιότητας των ιχθυηρών. Στην συνέχεια με την χρήση ενός κοφτερού αποστειρωμένου μαχαιριού ανοίγουμε την κοιλία του ψαριού και ελέγχουμε την κατάσταση των οργάνων. Αρχικά ελέγχουμε την μυρωδιά των εντοσθίων και στην συνέχεια ελέγχουμε με την χρήση της αφής την κατάσταση των εντοσθίων. Τέλος αφού γίνει ολοκληρωμένος έλεγχος των δειγμάτων τα ιχθυηρά με την χρήση ενός κοφτερού μαχαιριού φιλετοποιούνται έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της κατάστασης της σάρκας. Αφού πραγματοποιηθούν τα φιλέτα ελέγχεται το χρώμα τους η υφή τους και το άρωμα τους.

Αφού ολοκληρωθεί ο ποιοτικός έλεγχος και εντοπισθεί ποια είναι η διάρκεια ζωής του κάθε δείγματος. Την διάρκεια ζωής της κάθε μεθόδου θα την διαπιστώσουμε όταν τα δείγματα δεν θα είναι αποδεκτά από έναν καταναλωτή. Σε εκείνο το χρονικό διάστημα το δείγμα που θεωρείται ποια ακατάλληλο αποθηκεύεται στην κατάψυξη έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν περαιτέρω οι μικροοργανισμοί και να μπορέσουμε να διατηρήσουμε για αρκετό χρονικό διάστημα έτσι ώστε όταν θα γίνει η απομόνωση του DNA να μην υπάρχουν μεταβολές.

## **6.4 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων βασισμένο στην μέθοδο QIM**

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, πολλά οργανοληπτικά σχήματα ελέγχου έχουν αναπτυχθεί για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των φρέσκων ψαριών που διατηρούνται στον πάγο. Η πρώτη σύγχρονη, λεπτομερής μέθοδος οργανοληπτικής ανάλυσης αναπτύχθηκε από Βρετανούς ερευνητές στο Torry Research Station, Aberdeen, Scotland (Shewan et al., 1953).

Η πιο συνηθισμένη και ταχύτερη μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα είναι το QIM (Quality Index Method, QIM). Σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, οι κατάλληλα επιλεγμένες παράμετροι που αντικατοπτρίζουν τις ιδιαιτερότητες των εν λόγω ψαριών ελέγχονται διαδοχικά και βαθμολογούνται βάσει μιας κλίμακας δομημένου πρωτοκόλλου που μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 3. Σε αυτήν την κλίμακα, ο βαθμός εκφράζει τον αριθμό των ελαττωματικών σημείων (ελαττώματα ποιότητας) που δείχνουν το ελεγχόμενο κριτήριο φρεσκάδας. Με άλλα λόγια, ο βαθμός "0" υποδηλώνει την απουσία ελαττωμάτων (εξαιρετική φρεσκάδα), ενώ το μέγιστο της κλίμακας αντιπροσωπεύει το απορριφθέν. Συνολικά, οι βαθμολογίες των επιμέρους κριτηρίων δίνουν τον δείκτη ποιότητας (δείκτης ποιότητας, QI), ο οποίος αυξάνεται γραμμικά κατά τη διατήρηση των ψαριών στον πάγο. Όλα τα κριτήρια που εισάγουν τη διαμόρφωση του δείκτη έχουν παρόμοιο βάρος, ενώ για κάθε ψάρι απαιτείται η ανάπτυξη ενός ειδικού για το είδος σχήματος. Η μέθοδος περιγράφει με ακρίβεια τα διαφορετικά επίπεδα οργανοληπτικής ποιότητας και παρέχει πληροφορίες σχετικά με το ισοδύναμο κατακράτησης πάγου και υπολειμματικής διάρκειας ζωής των ψαριών (Lougouois et al., 2003; Botta, 1995; Hyldig & Nielsen, 1997).

Ο λόγος που σε αυτήν την μελέτη δεν βασίστηκε μόνο στην μέθοδο QIM για τον έλεγχο της ποιότητας είναι ότι η μέθοδος QIM δεν ελέγχει καθόλου τα

εντόσθια του δείγματος. Για αυτό τον λόγο η ποιότητα βασίστηκε σε παραπάνω κριτήρια από αυτά που προβλέπει η μέθοδος QIM, όπως είναι ο λεπτομερής έλεγχος των εντοσθίων και ο έλεγχος των φιλέτων που δημιουργούνται από τα δείγματα. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαμε να έχουμε καλύτερα κριτήρια για να καταλήξουμε ποιό από τα δύο δείγματα είναι ποιό ποιοτικό.

**Πίνακας 6.1: Μέθοδος QIM για ολόκληρη, μη εκσπλαχνισμένη τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας (Lougonois et al., 2003)**

Parameter being assessed	Defined characteristic	Demerit points
Appearance	Bright, shining, iridescent	0
	Less bright, some loss of iridescence	1
	Pale, dull	2
Body stiffness	Very stiff, hard (in rigor)	0
	Firm, elastic (post-rigor)	1
	Some softening	2
Odour	Fresh	0
	Neutral	1
	Slight off-odours	2
	Spoiled	3
<i>Eyes</i>		
Cornea	Clear, translucent	0
	Cloudy	1
	Opaque	2
Pupil	Black, bright, shiny	0
	Slightly greyish	1
	Grey - white	2
<i>Gills</i>		
Appearance	Uniformly dark red	0
	Brownish red	1
	Discoloured/faded	2
Odour	Fresh	0
	Neutral	1
	Slight off-odours	2
	Spoiled	3
Total demerit points		0–16



## 6.5 Απομόνωση DNA

Αφού έχει γίνει ο ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων και έχουμε εντοπίσει σε ποια χρονική στιγμή τα δείγματα έχουν αλλοιωθεί και δεν είναι αποδεκτά προς κατανάλωση τότε θα πρέπει να γίνει και η απομόνωση του γενετικού υλικού έτσι ώστε να διαπιστώσουμε ποιο είναι οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την απομόνωση του DNA αναλύεται παρακάτω με μεγάλη λεπτομέρεια σύμφωνα με την MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Protocol-at-a-glance (Rev.17).

- Αρχικά λαμβάνονται τα δείγματα και παραλαμβάνεται τμήμα από διάφορα σημεία της σάρκας από τα βράγχια και από τα εντόσθια.
- Πολτοποιούμε τα τρία διαφορετικά δείγματα ξεχωριστά έτσι ώστε να γίνει ομογενοποίηση του κάθε δείγματος ξεχωριστά.
- Ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό τα δείγματα και προσθέτουμε σε κάθε tube από 0,05 γραμμάρια δείγματος, όπου κάθε tube το αριθμούμε και καταγράφεται τι δείγμα είναι έτσι ώστε να γνωρίζουμε από που προήλθε το δείγμα.
- Προστίθεται στα αριθμημένα tubes με την χρήση μικροπιπέτας 180  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα T1 ( Lysis Buffer). Το T1 το προστίθεται με την πιπέτα όπου κάθε φορά θα πρέπει να αλλάζει και να απορρίπτονται τα χρησιμοποιημένα tips για να εξαλειφθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης ενός δείγματος με ένα άλλο.
- Τοποθετείται στα αριθμημένα tubes με την χρήση μικροπιπέτας 25  $\mu\text{L}$  Proteinase K. Μετά την τοποθέτηση της Proteinase K τα tips πετιούνται και δεν ξαναχρησιμοποιούνται. Η Proteinase K είναι χλωτροπικό ένζυμο όπου καταστρέφει όλες τις κυτταρικές μεμβράνες έχοντας σαν συνέπεια να απελευθερώνεται το DNA.
- Τα αριθμημένα tubes υποβάλλονται σε vortex έτσι ώστε να γίνει πλήρης ανάδευση των συστατικών.
- Αφήνονται τα δείγματα για 1-3 ώρες στους 56  $^{\circ}\text{C}$ .
- Παραλαμβάνονται τα δείγματα από την θερμαινόμενη πλάκα.
- Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  B3 με πιπέτα όπου κάθε φορά απορρίπτονται τα χρησιμοποιημένα tips , το B3 το τοποθετώ για να γίνει η τελική λύση της κυτταρικής μεμβράνης
- Γίνεται vortex για κάθε δείγμα για 30 δευτερόλεπτα.
- Θερμούνται τα δείγματα για 10 λεπτά στους 70  $^{\circ}\text{C}$ .
- Προστίθενται 210  $\mu\text{L}$  ethanol (αιθανόλη) για να γίνει η κατακρήμνιση του DNA.
- Σε ένα άλλο στατό τοποθετούνται οι δυπλοστίλες όπου είναι όσες είναι και τα αρχικά δείγματα και αριθμούνται με τους ίδιους αριθμούς που έχουν και τα αρχικά δείγματα και θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να γίνει σωστή μεταφορά.
- Από τα αρχικά αριθμημένα tubes μεταφέρονται με μικροπιπέτα 650  $\mu\text{L}$  και όχι παραπάνω διότι το πάνω μέρος της δυπλοστίλης χωράει μέχρι 700  $\mu\text{L}$ . Κάθε φορά που θα γίνεται η μεταφορά θα πρέπει να ελέγχεται ότι μεταφέρω το δείγμα στην σωστή δυπλοστίλη και πετάω το tip.

- Τοποθετούνται οι δυπλοστίλες για φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές όπου στο πάνω μέρος της δυπλοστίλης θα κατακρατηθούν το DNA και οι πρωτεΐνες ενώ στο κάτω μέρος τα υπόλοιπα ανεπιθύμητα συστατικά. Ο λόγος όπου κατακρατείται το DNA και οι πρωτεΐνες είναι ότι η στήλη είναι κατασκευασμένη από οξείδιο του πυριτίου όπου είναι θετικά φορτισμένη και κατακρατά έτσι το DNA και οι πρωτεΐνες που είναι αρνητικά φορτισμένες.
- Παραλαμβάνονται τα δείγματα από την φυγοκέντρηση και απορρίπτεται στα απόβλητα το ρευστό που έχει συσσωρευθεί στο κάτω μέρος της δυπλοστίλης.
- Προστίθεται με μικροπιπέτα 500  $\mu\text{L}$  B4 όπου κάθε φορά αλλάζω το κίτ.
- Τοποθετούνται οι δυπλοστίλες για φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000 στροφές.
- Παραλαμβάνονται οι δυπλοστίλες από την φυγοκέντρηση και απορρίπτεται το ρευστό που έχει συσσωρευθεί στο κάτω μέρος της δυπλοστίλης
- Προστίθεται 600  $\mu\text{L}$  από το B5 όπου κάθε φορά αλλάζω το κίτ
- Τοποθετούνται τις δυπλοστίλες για φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000 στροφές.
- Απορρίπτεται ότι συσσωρεύεται στο κάτω μέρος της δυπλοστίλης
- Γίνεται φυγοκέντρηση των δυπλοστίλων χωρίς να προστίθεται τίποτα για 2 λεπτά στις 11.000 στροφές.
- Απορρίπτεται το κάτω μέρος από τις δυπλοστίλες στα απόβλητα ( το επάνω μέρος το κρατάω για τον λόγο ότι εκεί βρίσκεται το DNA).
- Τοποθετείται καινούργια tubes στο κάτω μέρος της δυπλοστίλης .
- Τοποθετείται 50  $\mu\text{L}$  στην δυπλοστίλη από το BE (Elution Buffer) όπου κάθε φορά αλλάζουν το tips.
- Γίνεται φυγοκέντρηση των δυπλοστίλων για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές ( μετά από την φυγοκέντρηση δεν πετάω τίποτα).
- Τοποθετείται 50  $\mu\text{L}$  στην δυπλοστίλη από το BE (Elution Buffer) όπου κάθε φορά αλλάζω το κίτ.
- Γίνεται φυγοκέντρηση των δυπλοστίλων για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές
- Απορρίπτεται το πάνω μέρος της δυπλοστίλης για τον λόγο ότι το DNA τώρα βρίσκεται στο κάτω μέρος της δυπλοστίλης.
- Μεταφέρεται το κατακρισμένο DNA σε καινούργια tubes όπου πρέπει να τα αριθμήσω και να τα μεταφέρω ορθά αλλάζοντας κάθε φορά τα tips.
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στο φωτόμετρο όπου κάθε φορά μεταφέρουμε 5  $\mu\text{L}$  όπου κάθε φορά αλλάζω το κίτ.
- Καταγράφονται τις μετρήσεις (  $A_{260} \Rightarrow$  DNA ,  $A_{280} \Rightarrow$  πρωτεΐνες ,  $A_{260}/A_{280}=1,7-2,0$ )

## Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα Α΄ πειραματικής διαδικασίας

### 7.1 Οργανοληπτικά αποτελέσματα

Τα δείγματα εξαλιεύθηκαν την Τετάρτη 11/03/2020 όπου και θεωρείται η μέρα μηδέν την επόμενη μέρα Πέμπτη 12/03/2020 έγινε το MAP στο Μετσόβιο πολυτεχνείο. Τα δείγματα ήταν τοποθετημένα σε ψυγείο όπου η θερμοκρασία του χώρου είναι 3 °C και τα δείγματα είναι τοποθετημένα σε λεκάνες με μεγάλη ποσότητα πάγου έτσι ώστε τα δείγματα να έρχονται σε επαφή με τηκόμενο πάγο θερμοκρασίας 0 °C. Στις επόμενες μέρες γίνονται ποιοτικοί έλεγχοι έτσι ώστε να διαπιστωθεί η συνολική διάρκεια των δειγμάτων.

#### 7.1.1 ΠΡΩΤΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο πρώτος ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων έγινε την Δευτέρα 16/03/2020 όπου είναι η πέμπτη ημέρα από την στιγμή που εξαλιεύτηκαν και τέταρτη από την μέρα που έγινε το MAP.

Τα δείγματα αφού λήφθηκαν από το ψυγείο αρχικά μετρήθηκε η θερμοκρασία του ιχθυού στο γεωμετρικό τους κέντρο. Η θερμοκρασία και στα δύο δείγματα ήταν 0 °C.



**Εικόνα 7.1:** Θερμοκρασία ψαριού στο γεωμετρικό κέντρο.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος ξεκινώντας από την εξωτερική εμφάνιση του ψαριού. Και τα δύο δείγματα βρίσκονταν σε αποδεκτό επίπεδο έχοντας ευχάριστη οσμή και λαμπερό χρώμα, οι οφθαλμοί δεν παρουσίαζαν σημάδια αλλοίωσης η μοναδική διαφορά που υπήρχε μεταξύ των δύο δειγμάτων ήταν ότι το ψάρι που ήταν συσκευασμένο σε MAP ήταν λίγο πιο σκληρό και πιο συμπαγές από αυτό που βρισκόταν σε αερόβιο περιβάλλον.

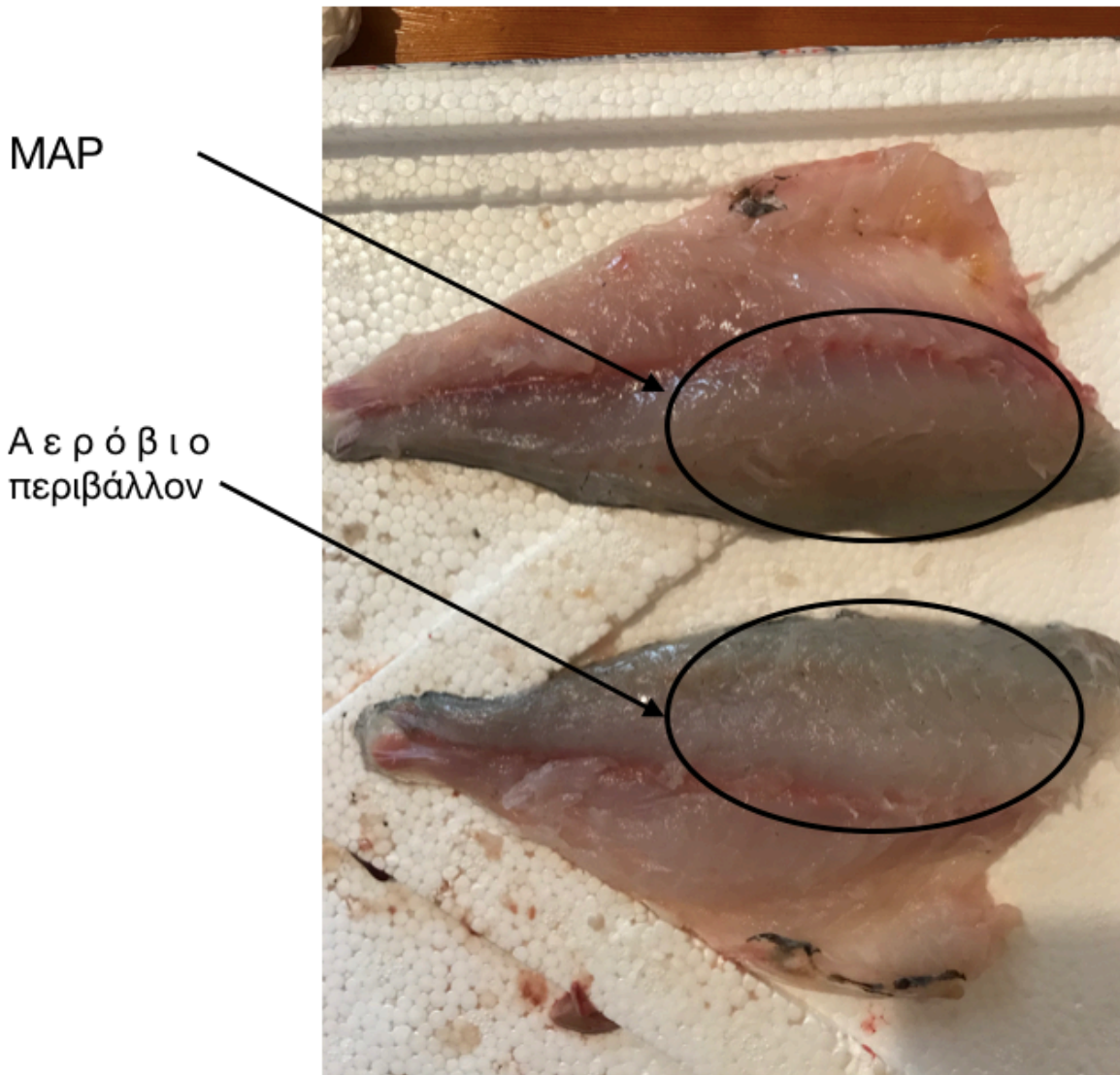
Αφού έγινε ο εξωτερικός έλεγχος τα δείγματα στην συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητα των βραγχίων. Και στα δύο δείγματα το χρώμα ήταν σε αποδεκτό επίπεδο έχοντας ερυθρό χρώμα και ευχάριστη οσμή.

Στην συνέχεια τα δείγματα εκσπλαχνίστηκαν ελέγχοντας την οσμή των εντοσθίων όπου κανένα από τα δύο δείγματα δεν είχε δυσάρεστη οσμή και σημάδια αλλοίωσης.



**Εικόνα 7.2:** Βράγχια και εντόσθια ψαριού πέμπτης ημέρας

Τέλος τα δείγματα φιλετοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της σάρκας του ψαριού. Η διαφορά που υπήρχε στα δύο δείγματα ήταν ότι το ψάρι που βρισκόταν σε αερόβιο περιβάλλον είχε σημάδια ρηγματώσης, και η υφή του ήταν πιο τραχιά σε σχέση με το φιλέτο που προήλθε από το ιχθυηρό που βρισκόταν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.



**Εικόνα 7.3 :** Εμφάνιση φιλέτων πέμπτης ημέρας



### 7.1.2 ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ

Ο δεύτερος ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων έγινε την Πέμπτη 19/03/2020 όπου είναι η όγδοη ημέρα από την στιγμή που εξαλιεύτικαν και έβδομη από την μέρα που έγινε το MAP. Τα δείγματα αρχικός ελέγχθηκαν με την χρήση θερμομέτρου όπως έγινε και στον πρώτο ποιοτικό έλεγχο και η θερμοκρασία στο γεωμετρικό κέντρο ήταν 0 °C. Στην συνέχεια ελέγχθηκε η εξωτερική εμφάνιση των ψαριών. Η οσμή τους βρισκόταν σε αποδεκτά επίπεδα και στα δύο δείγματα, το χρώμα διατηρούσε την αρχική γυαλάδα, οι οφθαλμοί και στα δύο ιχθυηρά ήταν λαμπερά αλλά όμως είχαν κυρτό σχήμα (βαθούλωμα) και τέλος η σάρκα των ψαριών είχε μαλακώσει έχοντας μεγάλη διαφορά από την προηγούμενη φορά που είχαν ελεγχθεί.



**Εικόνα 7.4:** Εμφάνιση δειγμάτων όγδοης ημέρας (Στα δεξιά MAP στα αριστερά αερόβιο)

Αφού έγινε ο εξωτερικός έλεγχος των δειγμάτων στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα βράγχια όπου και στα δύο ψάρια το χρώμα ήταν ροζ προς καφέ και η οσμή ήταν αποδεκτή. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα εντόσθια όπου παρατηρήθηκε ποιο άσχημη οσμή του δείγματος που είχε αποθηκευτεί σε αερόβιο περιβάλλον, αλλά όσο αφορά στην εμφάνιση των εντοσθίων δεν υπήρχε καμία διαφορά.

Τέλος τα δείγματα με την χρήση του ίδιου μαχαιριού φιλετοποιήθηκαν όπου το τελικό αποτέλεσμα του φιλέτου ήταν πολύ ποιο άσχημο συγκρίνοντας με την

εμφάνιση του φιλέτου της πέμπτης ημέρας. Και στα δύο φιλέτα υπήρχαν εμφανή σημάδια ρηγματώσης και η σάρκα ήταν αρκετά πιο μαλακή από ότι ήταν την πέμπτη ημέρα, παρόλο αυτά το άρωμα τους ήταν αποδεκτό.

κυρτότητα οφθαλμού



**Εικονα 7.5:** Εμφάνιση δείγματος όγδοης ημέρας (σε αερόβιο περιβάλλον)



**Εικονα 7.6:** Εμφάνιση φιλέτων όγδοης ημέρας(Στα δεξιά MAP στα αριστερά αερόβιο)



### 7.1.3 ΤΡΙΤΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο τρίτος ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων έγινε το Σάββατο 21/03/2020 όπου είναι η δέκατη ημέρα από την στιγμή που εξαλιεύτηκαν και η ένατη από την μέρα που έγινε το MAP. Τα δείγματα αρχικός ελέγχθηκαν με την χρήση θερμομέτρου όπως έγινε και στον πρώτο ποιοτικό έλεγχο και η θερμοκρασία στο γεωμετρικό κέντρο ήταν 0 °C. Στην συνέχεια ελέγχθηκε η εξωτερική εμφάνιση των ψαριών.

Ο πρώτος έλεγχος που πραγματοποιήθηκε αφαιρώντας τα δείγματα από την συσκευασία ήταν ο έλεγχος της οσμής. Το αποτέλεσμα του οσφρητικού ελέγχου του δείγματος που βρισκόταν σε MAP ήταν αποτρεπτικός, η μυρωδιά του ψαριού ήταν αρκετά άσχημη. Το δείγμα όμως που είχε αποθηκευτεί σε αερόβιο περιβάλλον η κατάσταση της οσμής είχε σημάδια αλλοίωσης αλλά όμως δεν ήταν τόσο έντονη όσο του δείγματος που είχε συσκευαστεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Αφού ολοκληρώθηκε ο οσφρητικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γενικής εμφάνισης. Η εξωτερική εμφάνιση ήταν πιο καλή στο δείγμα που βρισκόταν σε MAP αλλά σημαντική διαφορά είχαν οι οφθαλμοί όπου το δείγμα που είχε συσκευαστεί σε MAP είχε σαφέστερα καλύτερη εμφάνιση του οφθαλμού. Η κατάσταση της σάρκας και στα δύο δείγματα ήταν αρκετά μαλακή , όπου όταν πιεζόταν η σάρκα σε ένα σημείο δεν υπήρχε επαρκής ελαστικότητα έτσι ώστε να επιστρέψει στο αρχικό σχήμα.



**Εικόνα 7.7** Εμφάνιση δειγμάτων δέκατης ημέρας Στα δεξιά MAP στα αριστερά αερόβιο.



Αφού έγινε ο εξωτερικός έλεγχος των δειγμάτων στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα βράγχια. Το δείγμα που είχε συσκευαστεί σε MAP τα βράγχια είχαν μη αποδεκτό χρώμα και δυσάρεστη οσμή. Σε αντίθεση με το δείγμα που είχε συσκευαστεί σε αερόβιο περιβάλλον όπου ακόμα το χρώμα βρισκόταν σε αποδεκτό επίπεδο με ουδέτερη οσμή. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα εντόσθια όπου το δείγμα που βρισκόταν σε MAP είχαν δυσάρεστη οσμή ενώ το δείγμα που βρισκόταν σε αερόβια περιβάλλον είχε αλλοιωμένη οσμή σε καλύτερο επίπεδο.

Αφού διαπίστωση ότι το MAP βρισκόταν σε μη αποδεκτό επίπεδο από ότι το αερόβιο επανέλαβα το πείραμα με καινούργια δείγματα όπου όλα τα αποτελέσματα ήταν ίδια με μοναδική διαφορά ότι τα βράγχια του ψαριού που βρισκόταν συσκευασμένο σε MAP είχαν λίγο καλύτερο χρώμα αλλά όμως η οσμή ήταν μη αποδεκτή. Όλοι οι άλλοι έλεγχοι είχαν τα ίδια αποτελέσματα.



**Εικόνα 7.8:** Βράγχια MAP δέκατης ημέρας

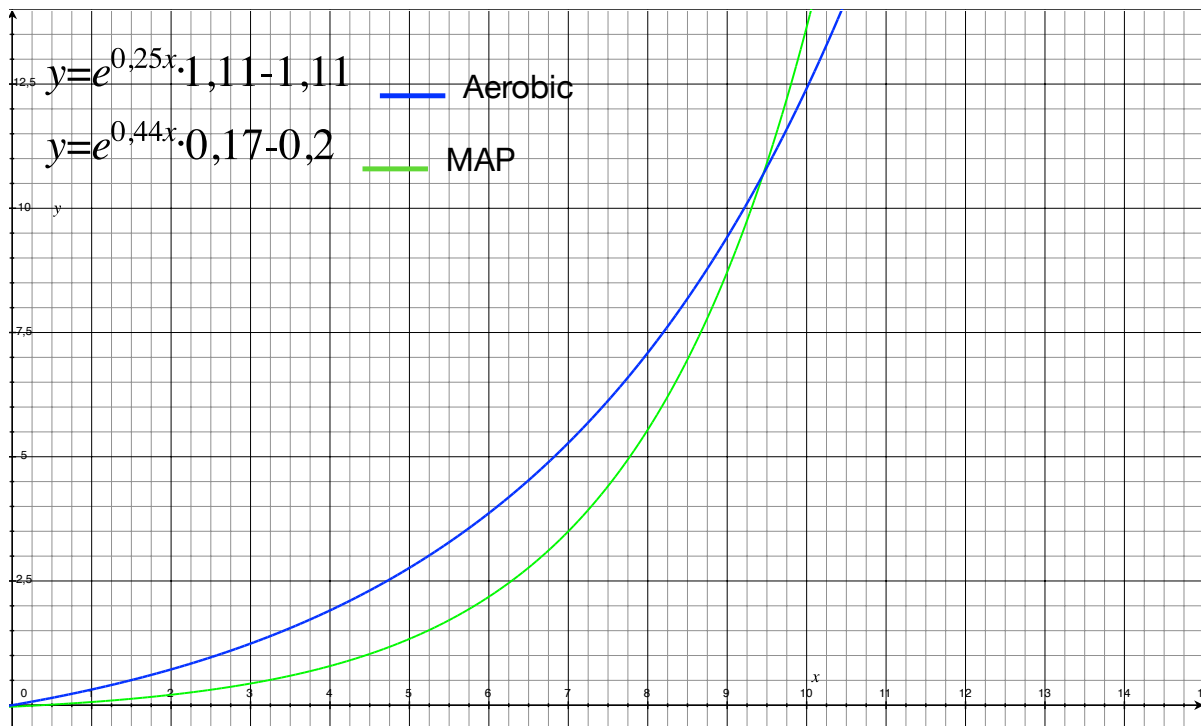


**Εικόνα 7.9:** Εντόσθια Δειγμάτων Άνω MAP Κάτω Αερόβια

## 7.2 Ποιοτικοί έλεγχοι δειγμάτων βασισμένο στην μέθοδο QIM

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα μεθόδου QIM για ολόκληρη, μη εκσπλαχνισμένη τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας.

Parameter being assessed	DAY 0		DAY 5		DAY 8		DAY 10	
	MAP	Aerobic	MAP	Aerobic	MAP	Aerobic	MAP	Aerobic
Appearance	0	0	0	0	0	1	1	2
Body stiffness	0	0	0	1	1	1	2	2
Odour	0	0	1	1	1	1	3	2
Eyes Cornea	0	0	0	0	0	1	1	2
Eyes Pupil	0	0	0	0	0	1	1	2
Gills Appearance	0	0	0	0	1	1	2	1
Gills Odour	0	0	0	1	1	1	3	1
Total demerit points	0	0	1	3	4	7	13	12



Σχημα 7.1: Το σύνολο των ελαττωματικών σημείων συνάρτηση του χρόνου

## 7.3 Συμπεράσματα Ποιοτικών Ελέγχων

### Ποιοτικοί Έλεγχοι

Αερόβιο

Ελεγχοι

MAP



## Κεφάλαιο 8: Απομόνωση και αποτελέσματα NGS

### 8.1 Απομόνωση DNA

Αφού ακολουθήθηκε πιστά το πρωτόκολλο της απομόνωσης του DNA (κεφ. 5) τα αποτελέσματα που πάρθηκαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα. Τα συνολικά δείγματα είναι εννιά όπου τα πρώτα τρία δείγματα απευθύνονται στην πρώτη ημέρα και τα υπόλοιπα έξι στην δέκατη ημέρα όπου είναι και η ημέρα που τα ιχθυηρά είχαν αλλοιωθεί. Ο στόχος της εφαρμογής του NGS είναι να διακριθούν τα στελέχη των μικροοργανισμών που επικράτησαν και πως μεταβλήθηκαν με την πάροδο του χρόνου σε διαφορετικά μίγματα αερίων. Οι συγκρίσεις που θα γίνουν θα είναι μεταξύ της σάρκας του ιχθυηρού της ημέρας μηδέν με την σάρκα του ιχθυηρού της δέκατης ημέρας που είχε συσκευαστεί σε αερόβιο περιβάλλον και με την σάρκα του ιχθυηρού της δέκατης ημέρας που είχε συσκευαστεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (60% CO<sub>2</sub>, 30% N, 10% O<sub>2</sub>). Παράλληλα θα γίνουν και οι συγκρίσεις για τα βράγχια και για τα εντόσθια.

**Πίνακας 8.1: Συγκεντρώσεις DNA για κάθε δείγμα**

Κωδικός δείγματος	Πληροφορίες δείγματος	A260/A280	ngDNA/μL
<u>Δείγματα Ημέρας 0</u>			
1	Σάρκα	1,798	47,814
2	Βράγχια	2,011	522,697
3	Εντόσθια	1,932	768,528
<u>Δείγματα Ημέρας 10 Αερόβια Συσκευασία</u>			
4	Σάρκα	1,871	184,292
5	Βράγχια	2,052	674,585
6	Εντόσθια	2,04	733,132
<u>Δείγματα Ημέρας 10 Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας</u>			
7	Σάρκα	1,55	35,419
8	Βράγχια	2,084	1126,31
9	Εντόσθια	2,007	936,347

## 8.2 Αποτελέσματα NGS

Στους παρακάτω πίνακες θα μελετηθούν οι ποσοστιαίες διακυμάνσεις των μικροοργανισμών για κάθε δείγμα ξεχωριστά ( σάρκα, βράγχια και εντόσθια). Σε κάθε πίνακα θα εμφανίζεται το όνομα του μικροοργανισμού στην πρώτη στήλη. Στις υπόλοιπες στήλες θα εμφανίζονται τα ποσοστά του κάθε μικροοργανισμού καθώς και η μεταβολή που έχουν από την πρώτη ημέρα.

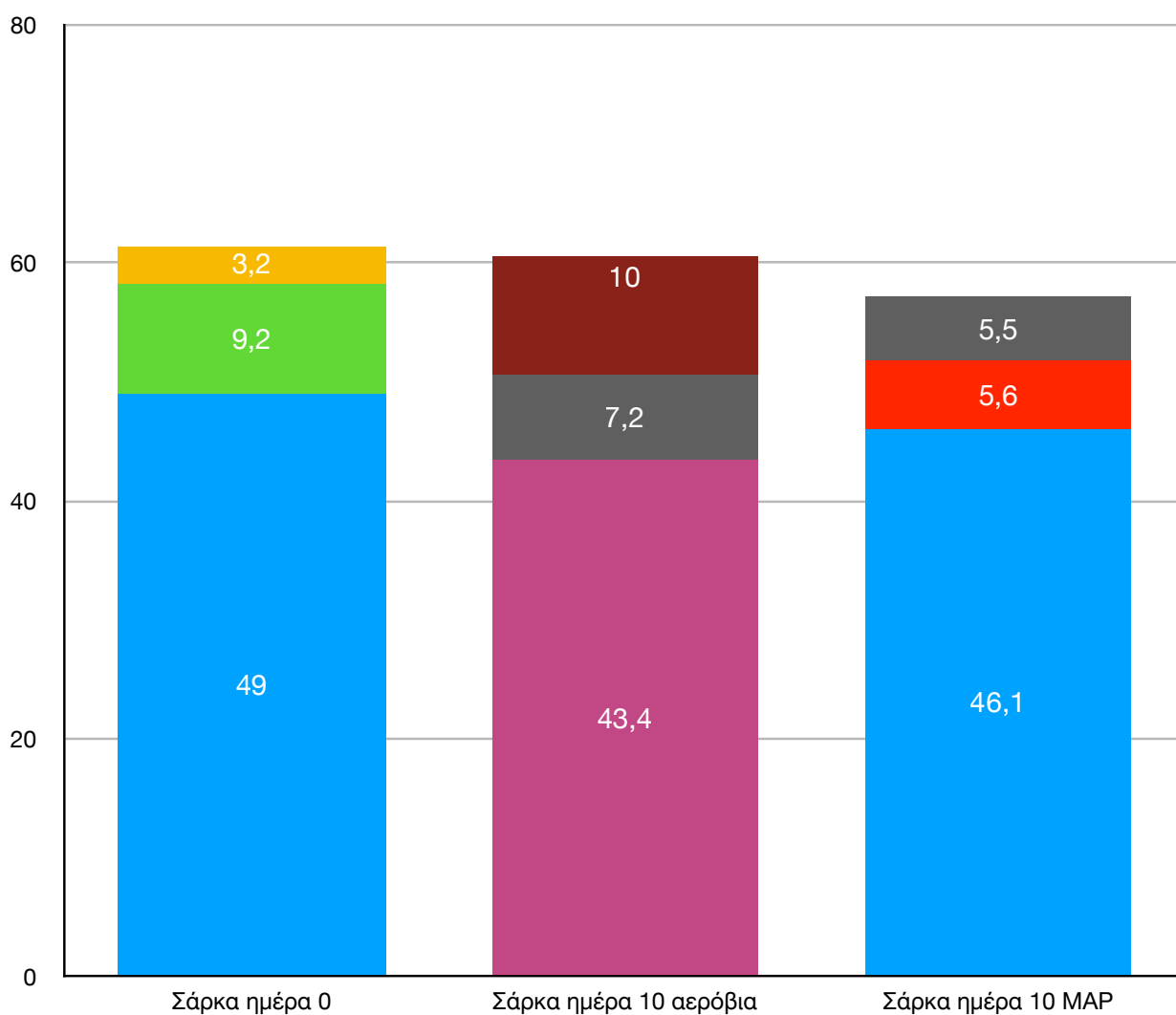
### 8.2.1 Ποσοστιαίες μεταβολές στην σάρκα τσιπούρας

**Πίνακας 8.2:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

species	Σάρκα ημέρα 0	Σάρκα ημέρα 10 αερόβια	Σάρκα ημέρα 10 MAP
hylemonella spp.	49,0	0,6	-98,8%
shigella sonnei	9,2	1,5	-83,7%
acinetobacter johnsonii	3,2	0,9	-71,9%
cloacibacterium spp.	2,0	0,3	-85,0%
alicycliphilus spp.	2,0	0,1	-95,0%
dietzia spp.	1,8	0,0	-100,0%
brachymonas spp.	1,5	0,2	-86,7%
roseomonas gilardii	1,4	0,0	-100,0%
shigella flexneri	1,3	0,0	-100,0%
corynebacterium tuberculostearic	1,2	0,0	-100,0%
staphylococcus pasteurii	1,1	0,2	-81,8%
halospirulina sp.	1,1	0,0	-100,0%
lactobacillus iners	1,0	0,0	-100,0%
tepidimonas spp.	1,0	0,0	-100,0%
streptococcus sanguinis	0,9	0,0	-100,0%
rhodocyclus tenuis	0,7	0,0	-100,0%
pseudomonas straminea	0,7	0,0	-100,0%
methylobacterium thiocyanatum	0,7	0,0	-100,0%
acinetobacter baumannii	0,7	0,0	-100,0%
citrobacter werkmanii	0,6	0,0	-100,0%
paracoccus sp.	0,5	0,0	-100,0%
clostridium spp.	0,4	0,0	-100,0%
streptococcus parasanguinis	0,3	0,0	-100,0%
pseudoalteromonas spongia	0,2	43,4	21600,0%
shewanella sp.	0,2	7,2	3500,0%
parabacteroides distasonis	0,2	0,9	350,0%
shewanella vesiculosa	0,0	10,0	∞
halomonas spp.	0,0	2,1	∞
pseudoalteromonas spp.	0,0	2,0	∞
shewanella marinus	0,0	1,9	∞
streptococcus spp.	0,0	1,7	∞

shewanella gaetbuli	0,0	1,6	∞	0,4	∞
shewanella livingstonensis	0,0	0,7	∞	0,4	∞
porphyromonas sp.	0,0	0,5	∞	2,6	∞
shewanella frigidimarina	0,0	0,2	∞	0,9	∞
pseudomonas sp.	0,0	0,0	∞	0,7	∞
others	17,1	24,0		16,7	
Total	100,0	100,0		100,0	

■ hylemonella spp.     ■ shigella sonnei     ■ acinetobacter johnsonii     ■ brachymonas spp.  
■ pseudoalteromonas spongia     ■ shewanella sp.     ■ shewanella vesiculosa

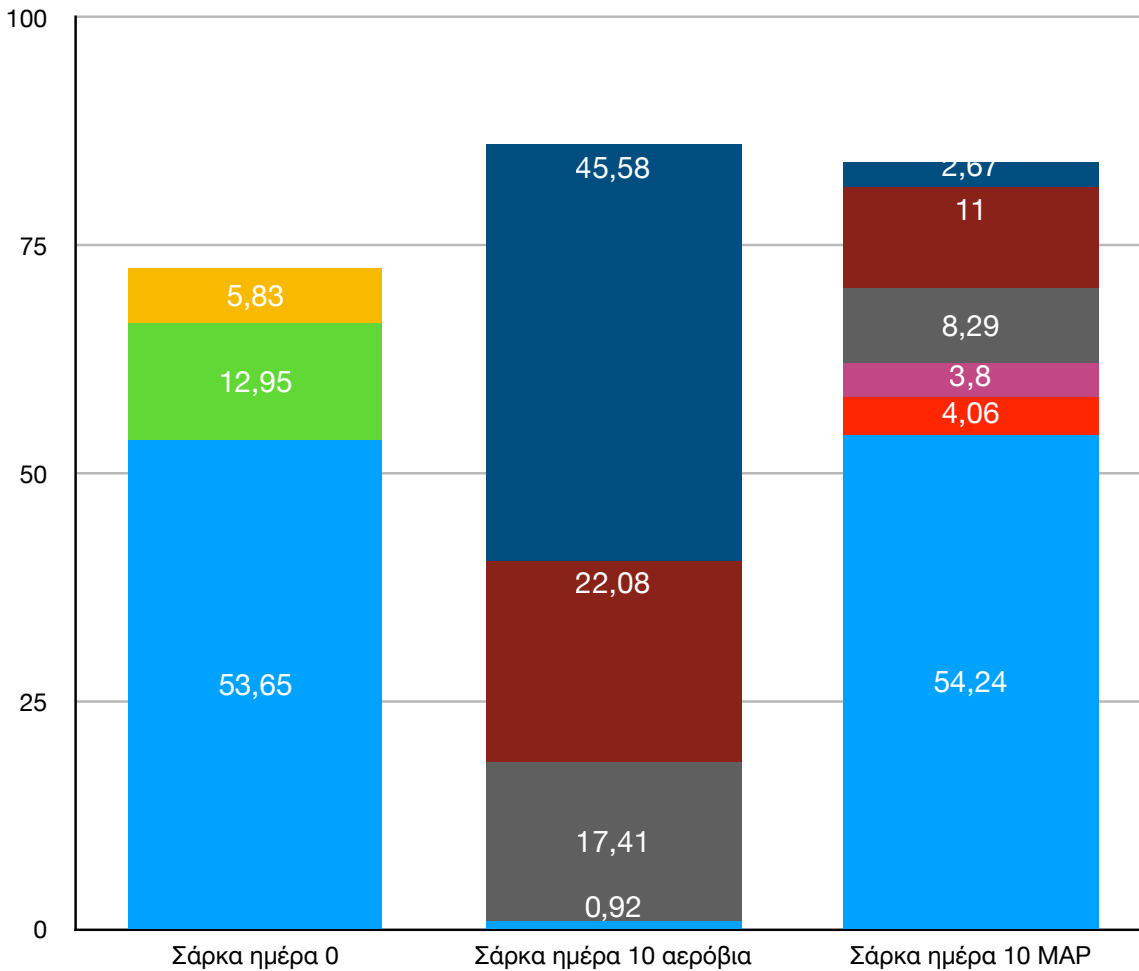


**Σχημα 8.1:** Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.3: Ποσοστιαίες μεταβολές κατά family για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.**

Family	Σάρκα ημέρα 0	Σάρκα ημέρα 10 αερόβια	Σάρκα ημέρα 10 MAP
comamonadaceae	53,65	0,92	54,24
enterobacteriaceae	12,95	1,79	4,20
moraxellaceae	5,83	1,44	2,19
flavobacteriaceae	2,83	0,45	3,51
corynebacteriaceae	2,38	0,00	4,06
dietziaceae	1,88	0,00	0,91
burkholderiales	1,52	0,00	0,26
streptococcaceae	1,43	1,68	0,15
pseudomonadaceae	1,41	0,97	1,73
acetobacteraceae	1,40	0,00	0,00
ruminococcaceae	1,39	0,03	0,06
rhodocyclaceae	1,17	0,00	3,80
staphylococcaceae	1,14	0,16	0,85
lactobacillaceae	0,97	0,00	0,00
lachnospiraceae	0,86	0,00	0,00
clostridiaceae	0,86	1,05	0,02
porphyromonadaceae	0,75	1,99	0,00
bacillaceae	0,73	0,00	0,20
rhodobacteraceae	0,71	0,41	0,05
methylobacteriaceae	0,70	0,00	0,05
micrococcaceae	0,40	0,00	0,37
bacteroidaceae	0,37	0,85	0,05
psychromonadaceae	0,23	17,41	8,29
shewanellaceae	0,19	22,08	11,00
pseudoalteromonadaceae	0,17	45,58	2,67
halomonadaceae	0,00	2,14	0,41
others	4,09	1,06	0,93
total	100,00	100,00	100,00

■ comamonadaceae    ■ enterobacteriaceae    ■ moraxellaceae    ■ corynebacteriaceae  
■ rhodocyclaceae    ■ psychromonadaceae    ■ shewanellaceae    ■ pseudoalteromonadaceae



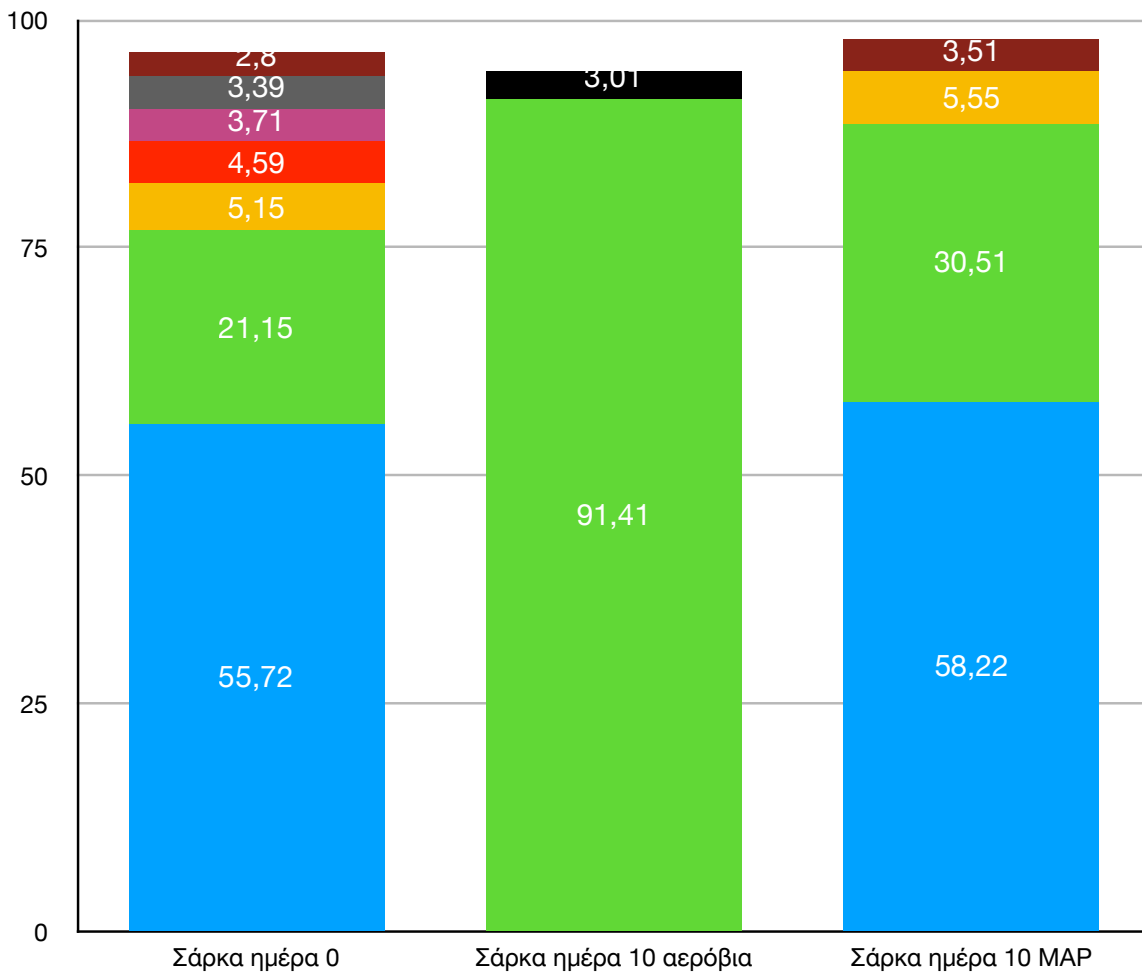
**Σχημα 8.2:** Τα Families που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.4:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά class για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

class	Σάρκα ημέρα 0	Σάρκα ημέρα 10 αερόβια	Σάρκα ημέρα 10 MAP
betaproteobacteria	55,72	0,93	58,22
gammaproteobacteria	21,15	91,41	30,51
actinobacteria	5,15	0,13	5,55
bacilli	4,59	1,84	1,22
clostridia	3,71	1,83	0,20
alphaproteobacteria	3,39	0,41	0,47
flavobacteriia	2,80	0,45	3,51
bacteroidia	1,71	3,01	0,06
cyanobacteria	1,11	0,00	0,12
others	0,67	0,00	0,14
total	100,00	100,00	100,00



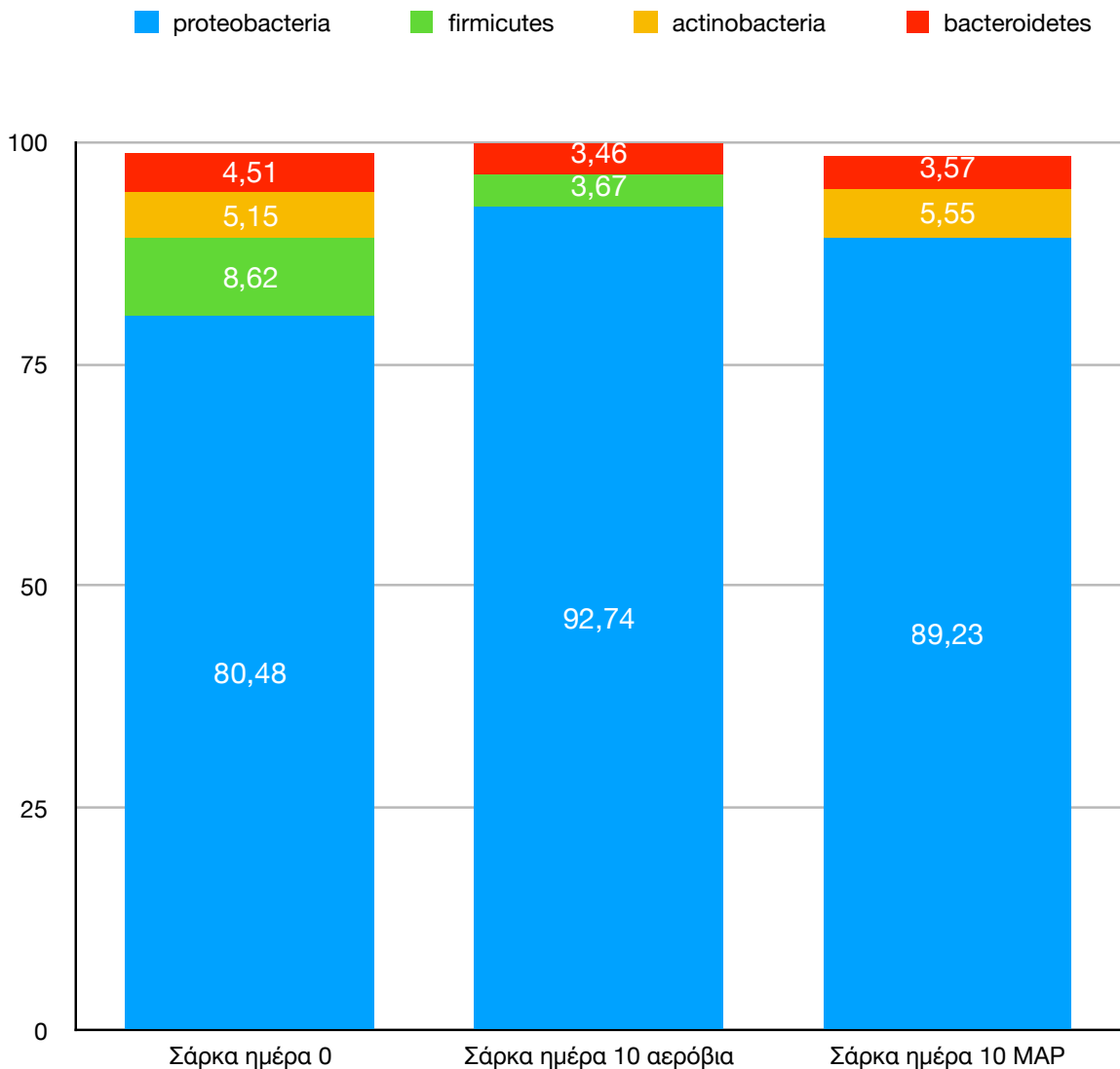
■ betaproteobacteria    ■ gammaproteobacteria    ■ actinobacteria    ■ bacilli    ■ clostridia  
■ alphaproteobacteria    ■ flavobacteria    ■ bacteroidia



**Σχημα 8.3:** Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.5:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για την σάρκα τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

phylum	Σάρκα ημέρα 0	Σάρκα ημέρα 10 αερόβια	Σάρκα ημέρα 10 MAP
proteobacteria	80,48	92,74	89,23
firmicutes	8,62	3,67	1,51
actinobacteria	5,15	0,13	5,55
bacteroidetes	4,51	3,46	3,57
cyanobacteria	1,11	0,00	0,12
others	0,13	0,00	0,03
total	100,00	100,00	100,00



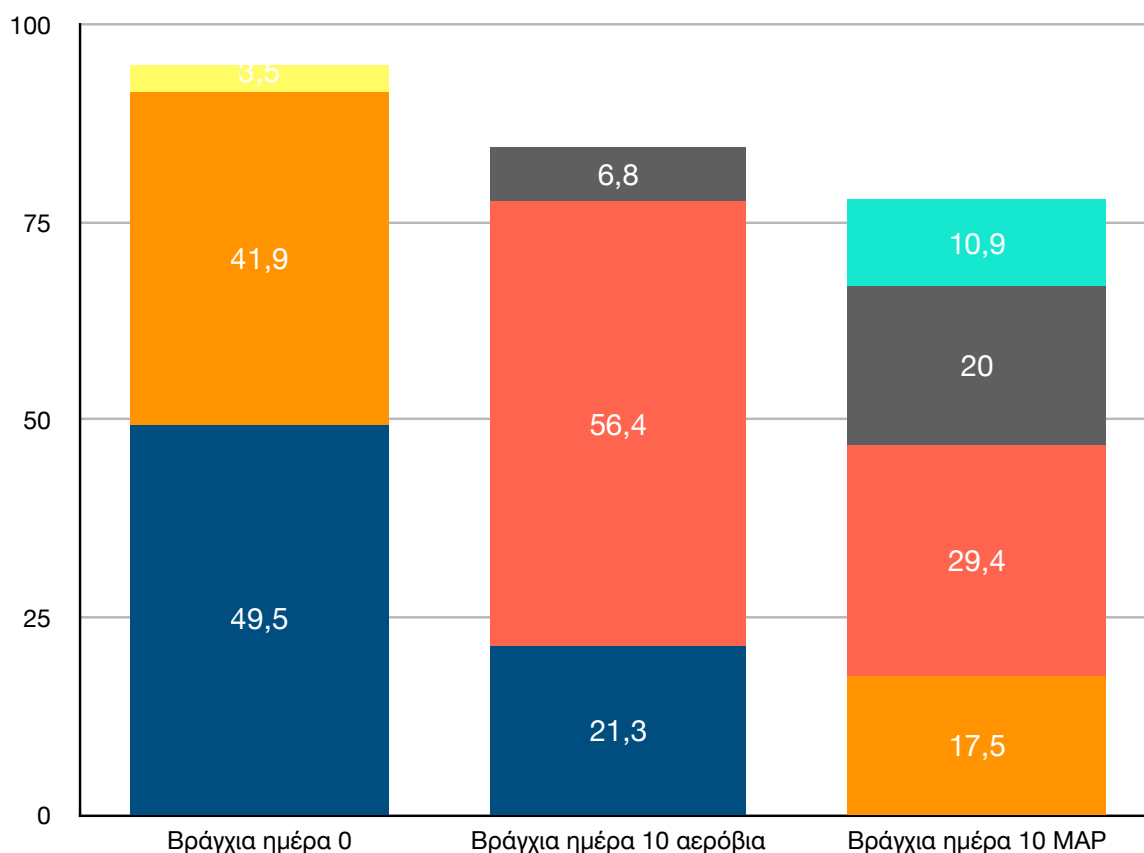
**Σχημα 8.4:** Τα επικρατέστερα phylum που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας.

## 8.2.2 Ποσοστιαίες μεταβολές στα βράγχια τσιπούρας

**Πίνακας 8.6:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για στα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

species	Βράγχια ημέρα 0	Βράγχια ημέρα 10 αερόβια		Βράγχια ημέρα 10 MAP	
zoogloea oryzae	49,5	21,3	-57,0%	4,1	-91,7%
rhodocyclus tenuis	41,9	0,6	-98,6%	17,5	-58,2%
dechloromonas agitata	3,5	0,0	-100,0%	0,5	-85,7%
allobaculum sp	0,9	0,0	-100,0%	0,1	-88,9%
psychrobacter psychroph	0,2	0,0	-100,0%	1,2	500,0%
psychrobacter spp.	0,2	0,1	-50,0%	0,9	350,0%

psychrobacter sp.	0,1	0,1	-	1,2	1100,0%
thiobacter spp.	0,1	2,7	2600,0%	0,1	-
psychrobacter glacincola	0,0	0,1	∞	1,6	∞
psychromonas arctica	0,0	56,4	∞	29,4	∞
shewanella sp.	0,0	6,8	∞	20,0	∞
psychrobacter okhotsken	0,0	0,0	∞	0,7	∞
shewanella frigidimarina	0,0	0,9	∞	1,5	∞
shewanella gaetbuli	0,0	1,6	∞	0,4	∞
porphyromonas sp.	0,0	2,1	∞	10,9	∞
shewanella vesiculosa	0,0	2,0	∞	1,3	∞
shewanella livingstonens	0,0	2,3	∞	2,1	∞
shewanella baltica	0,0	0,4	∞	1,1	∞
others	3,6	2,6		5,4	
total	100,0	100,0		100,0	

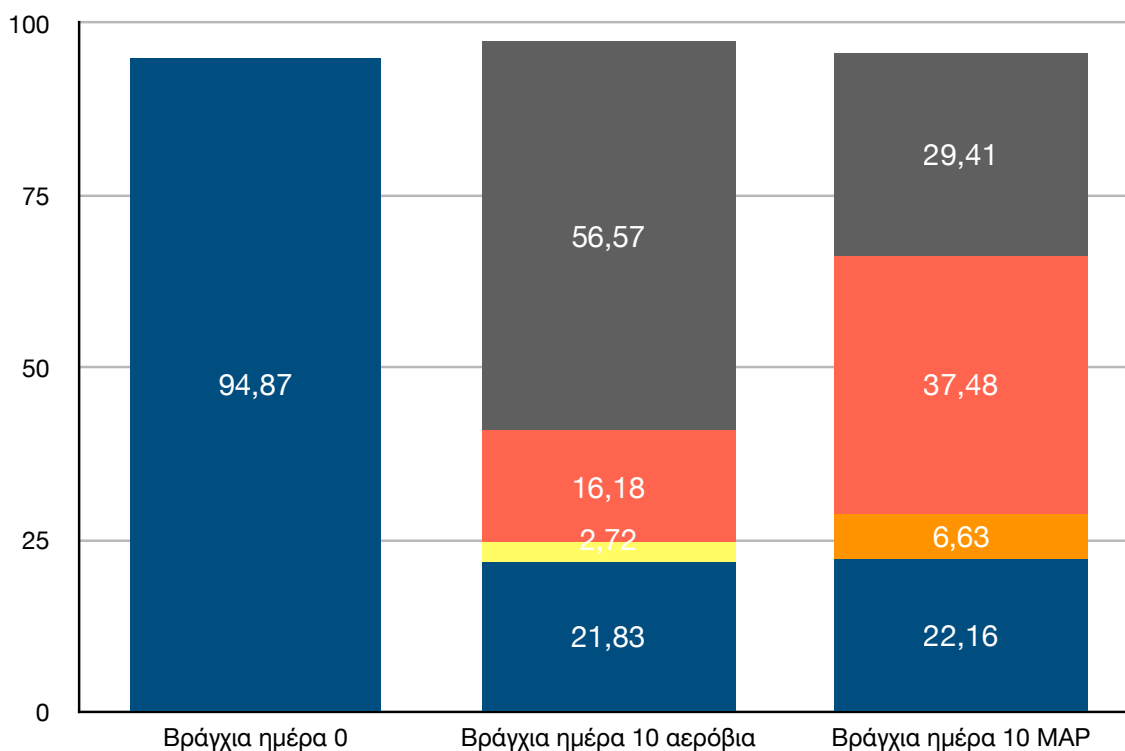


**Σχημα 8.5: Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στα βράγγια της τσιπούρας.**

**Πίνακας 8.7:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά Family για στα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

Family	Βράγχια ημέρα 0	Βράγχια ημέρα 10 αερόβια	Βράγχια ημέρα 10 MAP
rhodocyclaceae	94,87	21,83	22,16
moraxellaceae	1,03	0,46	6,63
erysipelotrichaceae	0,86	0,00	0,10
comamonadaceae	0,37	0,08	0,51
burkholderiales	0,10	2,72	0,10
shewanellaceae	0,04	16,18	37,48
psychromonadaceae	0,00	56,57	29,41
campylobacteraceae	0,00	0,65	0,26
others	2,73	1,51	3,34
total	100,00	100,00	100,00

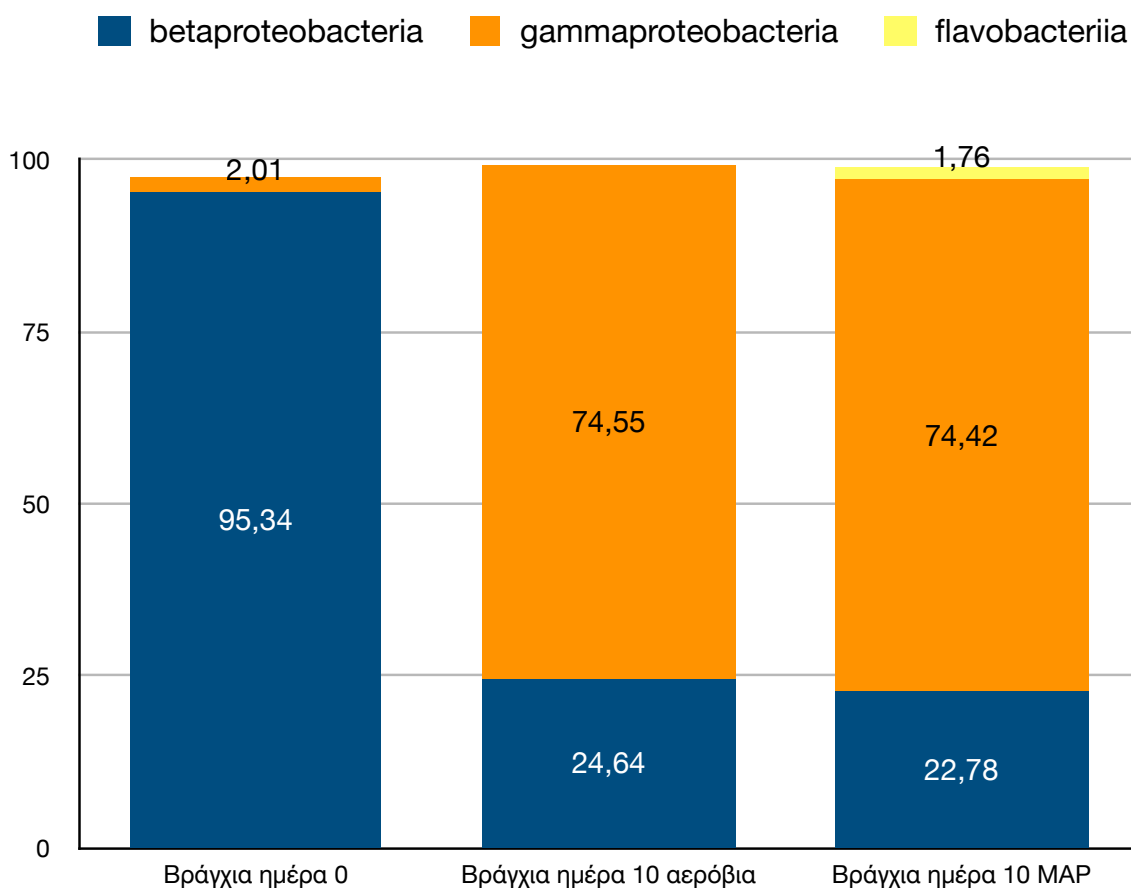
■ rhodocyclaceae     ■ moraxellaceae     ■ burkholderiales  
■ shewanellaceae     ■ psychromonadaceae



**Σχήμα 8.6:** Τα επικρατέστερα families που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.8:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά class για τα βράγχια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

class	Βράγχια ημέρα 0	Βράγχια ημέρα 10 αερόβια	Βράγχια ημέρα 10 MAP
betaproteobacteria	95,34	24,64	22,78
gammaproteobacteria	2,01	74,55	74,42
erysipelotrichia	0,86	0,00	0,10
actinobacteria	0,84	0,02	0,12
flavobacteriia	0,12	0,08	1,76
epsilonproteobacteria	0,00	0,65	0,26
others	0,83	0,06	0,56
total	100,00	100,00	100,00



**Σχήμα 8.7:** Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στα βράγχια της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.9:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για τα βράγγια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

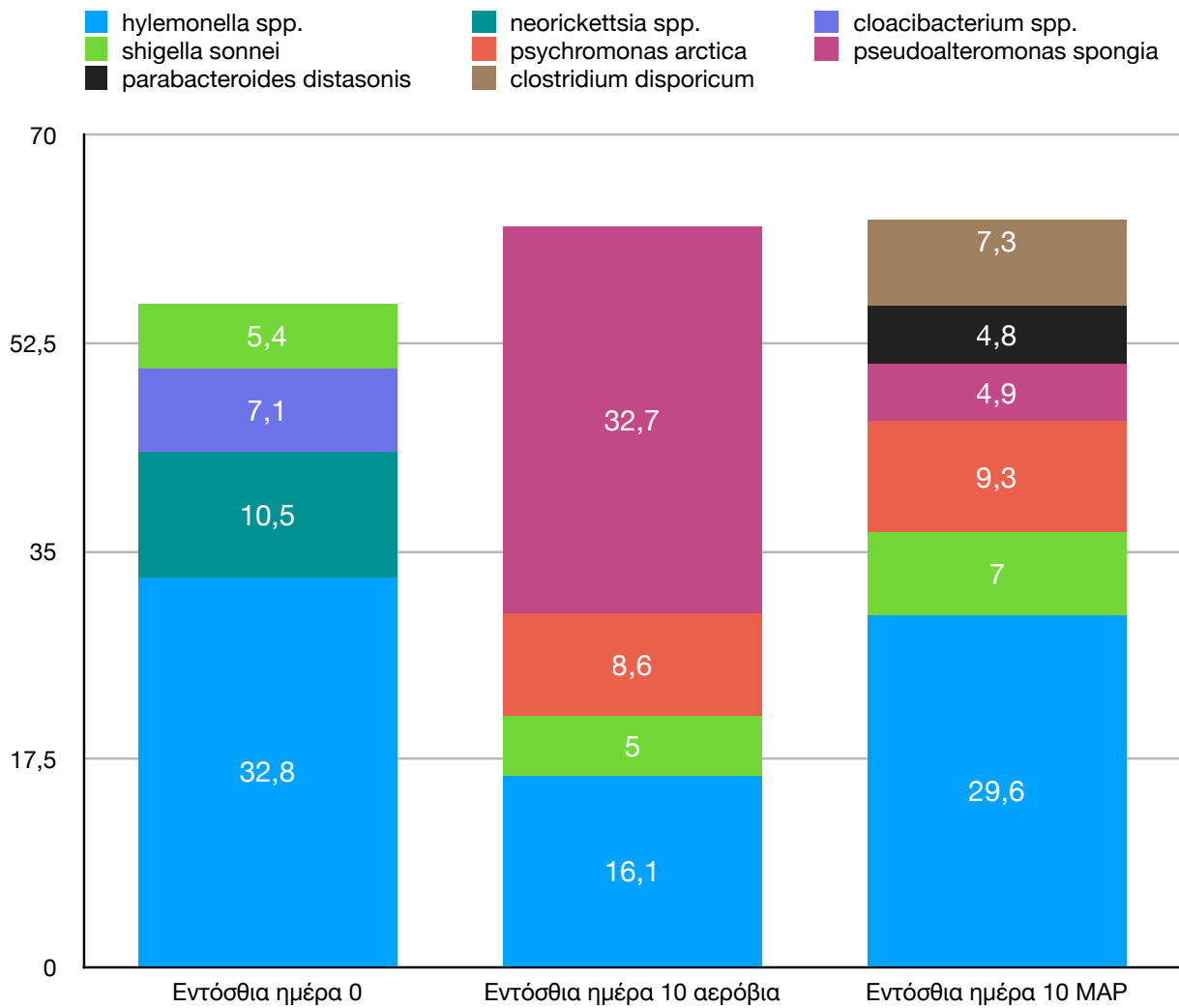
phylum	Βράγγια ημέρα 0	Βράγγια ημέρα 10 αερόβια	Βράγγια ημέρα 10 MAP
proteobacteria	97,82	99,87	97,54
bacteroidetes	0,43	0,08	1,89
others	1,75	0,05	0,57
total	100,00	100,00	100,00

### 8.2.3 Ποσοστιαίες μεταβολές στα εντόσθια τσιπούρας

**Πίνακας 8.10:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά species για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

species	Εντόσθια ημέρα 0	Εντόσθια ημέρα 10 αερόβια	Εντόσθια ημέρα 10 MAP		
hylemonella spp.	32,8	16,1	-50,9%	29,6	-9,8%
neorickettsia spp.	10,5	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
cloacibacterium spp.	7,1	0,5	-93,0%	3,1	-56,3%
shigella sonnei	5,4	5,0	-7,4%	7,0	29,6%
acinetobacter lwoffii	4,8	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
pseudomonas straminea	4,6	0,3	-93,5%	0,9	-80,4%
tepidimonas spp.	4,4	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
anoxybacillus voinovskiensis	4,4	0,0	∞	0,0	-100,0%
bacillus thermoamylovorans	2,8	0,0	∞	0,0	-100,0%
staphylococcus pasteurii	2,4	1,3	∞	1,5	-37,5%
jonesia sp.	2,3	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
empedobacter sp.	1,9	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
thermicanus aegyptius	1,5	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
enterococcus cecorum	1,4	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
anaerococcus spp.	1,4	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
thermicanus spp.	1,3	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
bacillus sp.	1,3	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
corynebacterium segmentosu	0,9	0,0	-100,0%	0,0	-100,0%
shigella flexneri	0,6	0,4	-33,3%	0,3	-50,0%

alicycliphilus spp.	0,5	2,3	360,0%	0,6	20,0%
pseudomonas putida	0,5	0,0	-100,0%	1,7	240,0%
brachymonas spp.	0,4	2,8	600,0%	0,9	125,0%
serratia spp.	0,2	0,7	250,0%	0,1	-50,0%
acinetobacter johnsonii	0,1	0,0	-100,0%	2,9	2800,0%
anoxybacillus tunensis	0,1	0,9	800,0%	0,0	-100,0%
dietzia spp.	0,0	1,3	∞	0,0	-
barnesiella spp.	0,0	0,0	-	3,9	∞
allobaculum sp	0,0	3,2	∞	1,0	∞
psychromonas arctica	0,0	8,6	∞	9,3	∞
pseudomonas syringae	0,0	0,0	-	1,2	∞
corynebacterium pseudodiphth	0,0	1,3	∞	0,0	-
pasteurella pneumotropica	0,0	0,0	-	0,8	∞
shewanella sp.	0,0	2,7	∞	0,1	∞
serratia marcescens	0,0	3,7	∞	0,0	-
pseudoalteromonas spongia	0,0	32,7	∞	4,9	∞
parabacteroides distasonis	0,0	0,0	-	4,8	∞
micrococcus luteus	0,0	0,0	-	1,6	∞
lactococcus lactis	0,0	1,9	∞	1,1	∞
escherichia coli	0,0	0,9	∞	0,1	∞
odoribacter splanchnicus	0,0	0,0	-	2,8	∞
halomonas spp.	0,0	1,7	∞	0,2	∞
pseudoalteromonas tetraodor	0,0	0,9	∞	0,1	∞
pseudomonas fluorescens	0,0	0,7	∞	0,0	-
clostridium disporicum	0,0	0,0	-	7,3	∞
lachnoclostridium clostridium	0,0	0,0	-	3,6	∞
rothia mucilaginosa	0,0	0,0	-	1,8	∞
chryseobacterium sp.	0,0	0,0	-	1,3	∞
neisseria subflava	0,0	0,0	-	1,2	∞
ralstonia solanacearum	0,0	0,0	-	1,2	∞
vibrio ponticus	0,0	0,0	-	0,8	∞
stenotrophomonas maltophil	0,0	1,8	∞	0,0	-
ruminococcus spp.	0,0	0,9	∞	0	-
total	93,6	92,6		97,7	



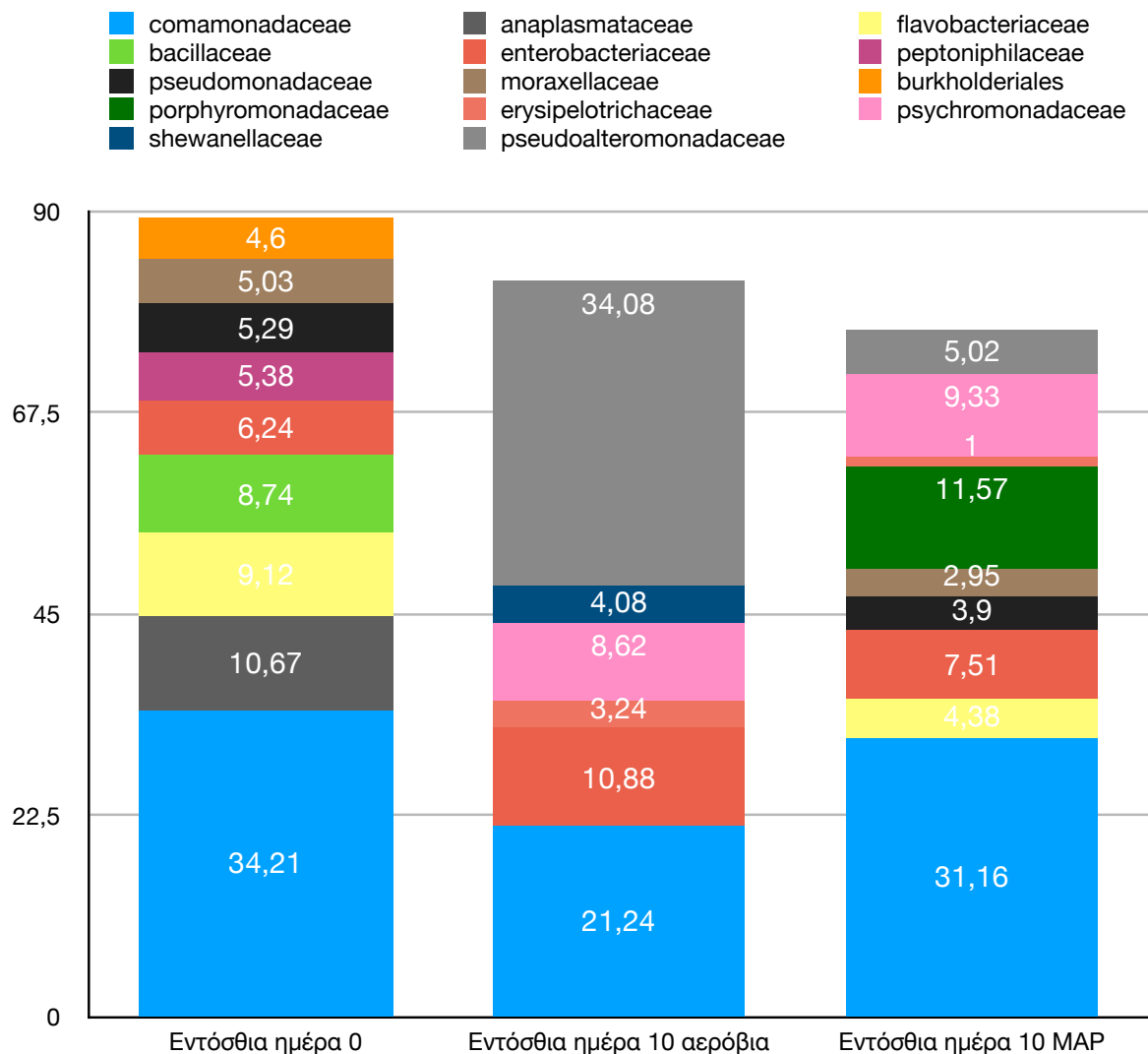
**Σχημα 8.8:** Τα επικρατέστερα species που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.11:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά Family για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

Family	Εντόσθια ημέρα 0	Εντόσθια ημέρα 10 αερόβια	Εντόσθια ημέρα 10 MAP
comamonadaceae	34,21	21,24	31,16
anaplasmataceae	10,67	0,00	0,00
flavobacteriaceae	9,12	0,57	4,38
bacillaceae	8,74	0,89	0,00



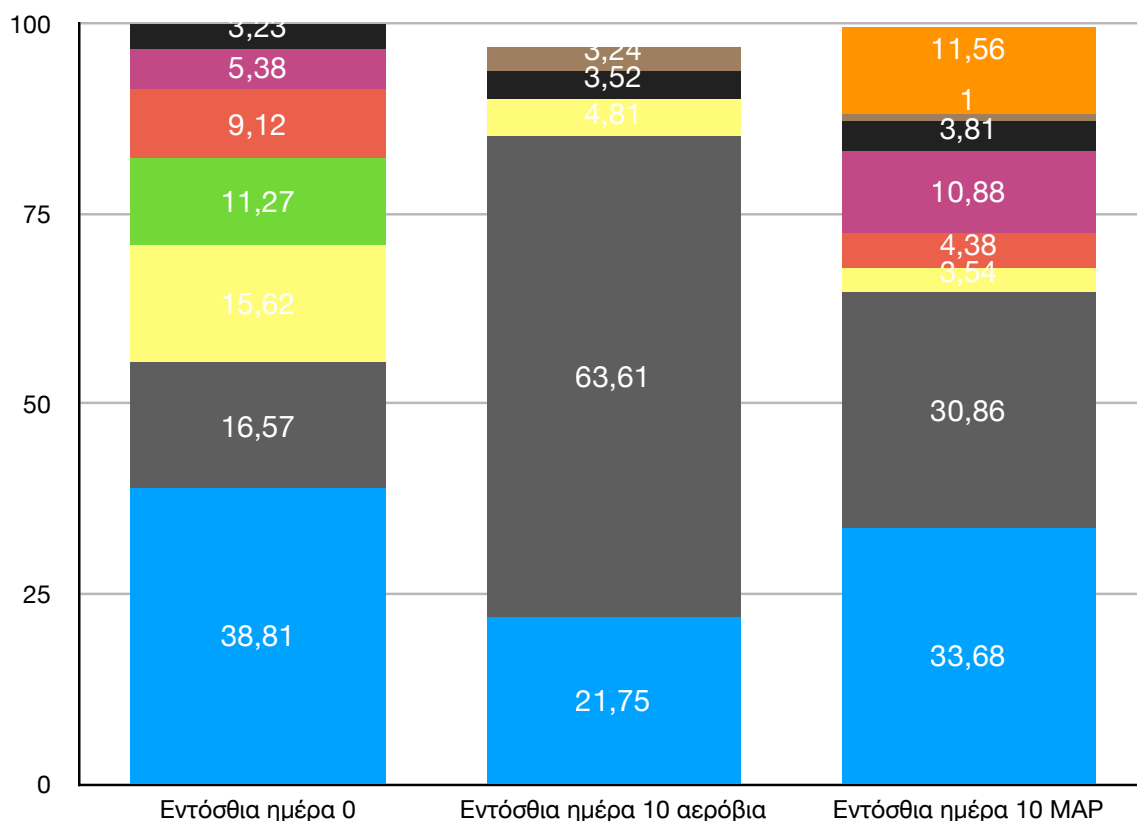
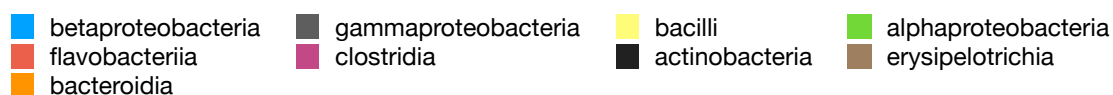
enterobacteriaceae	6,24	10,88	7,51
peptoniphilaceae	5,38	0,00	0,00
pseudomonadaceae	5,29	1,08	3,90
moraxellaceae	5,03	0,25	2,95
burkholderiales	4,60	0,50	0,04
bacillales family x. incerta	2,84	0,00	0,00
staphylococcaceae	2,58	1,40	1,50
jonesiaceae	2,32	0,00	0,00
enterococcaceae	1,46	0,00	0,00
corynebacteriaceae	0,90	2,05	0,00
dietziaceae	0,00	1,31	0,00
streptococcaceae	0,00	1,88	1,43
ruminococcaceae	0,00	1,43	0,00
lachnospiraceae	0,00	0,38	3,58
clostridiaceae	0,00	0,00	7,31
porphyromonadaceae	0,00	0,00	11,57
micrococcaceae	0,00	0,00	3,40
erysipelotrichaceae	0,00	3,24	1,00
psychromonadaceae	0,00	8,62	9,33
shewanellaceae	0,00	4,08	0,30
pseudoalteromonadaceae	0,00	34,08	5,02
halomonadaceae	0,00	1,73	0,16
neisseriaceae	0,00	0,00	1,25
burkholderiaceae	0,00	0,00	1,25
xanthomonadaceae	0,00	2,26	0,00
vibrionaceae	0,00	0,62	0,86
others	0,60	1,52	2,09
total	100,00	100,00	100,00



**Σχημα 8.9:** Τα επικρατέστερα Families που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.12:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά classes για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

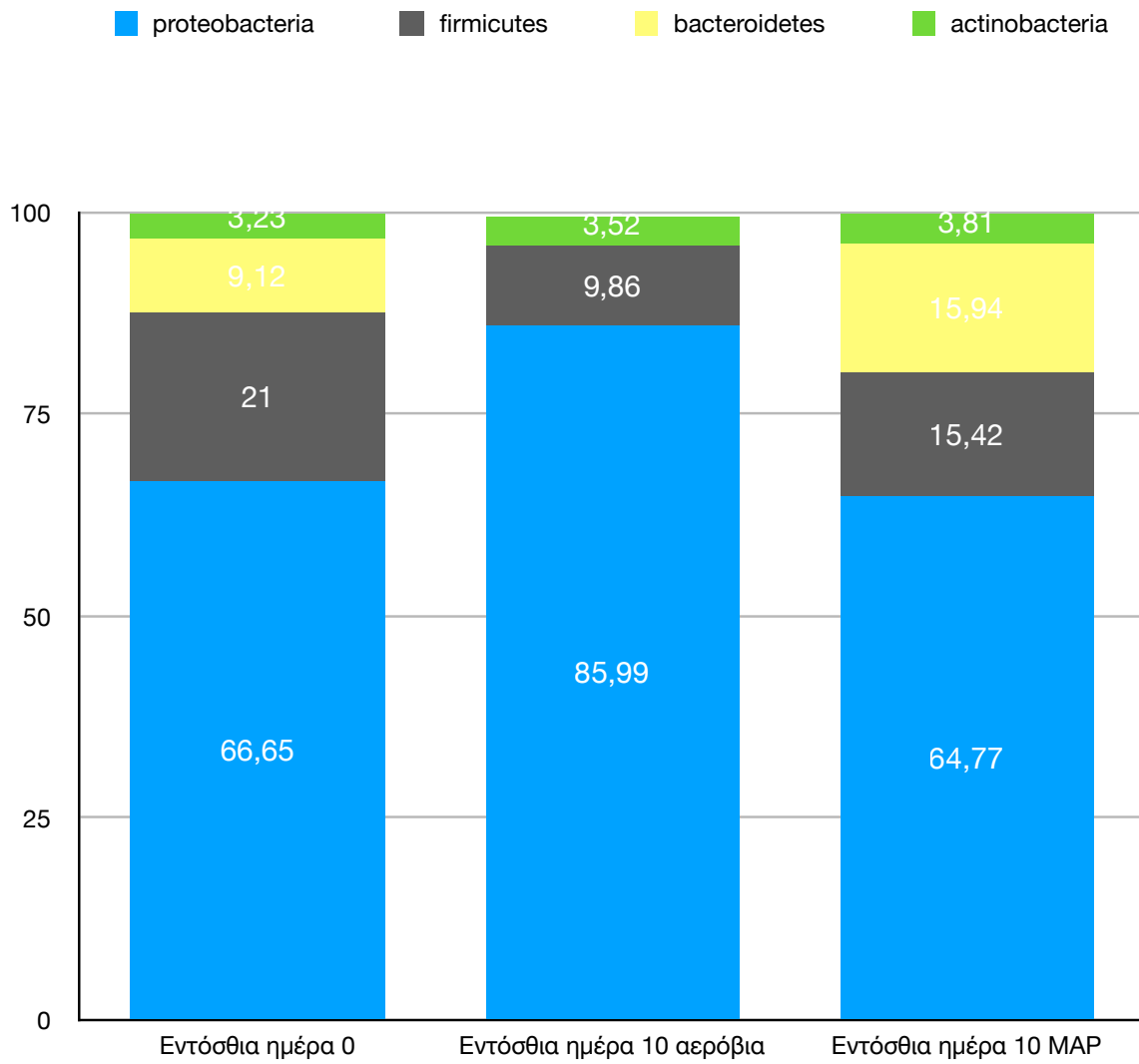
class	Εντόσθια ημέρα 0	Εντόσθια ημέρα 10 αερόβια	Εντόσθια ημέρα 10 MAP
betaproteobacteria	38,81	21,75	33,68
gammaproteobacter	16,57	63,61	30,86
bacilli	15,62	4,81	3,54
alphaproteobacteria	11,27	0,62	0,00
flavobacteriia	9,12	0,57	4,38
clostridia	5,38	1,81	10,88
actinobacteria	3,23	3,52	3,81
erysipelotrichia	0,00	3,24	1,00
bacteroidia	0,00	0,06	11,56
others	0,00	0,02	0,30
total	100,00	100,00	100,00



**Σχημα 8.10:** Τα επικρατέστερα classes που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.

**Πίνακας 8.13:** Ποσοστιαίες μεταβολές κατά phylum για τα εντόσθια τσιπούρας την ημέρα 0 και την ημέρα 10 για αερόβια και για MAP συσκευασία.

phylum	Εντόσθια ημέρα 0	Εντόσθια ημέρα 10 αερόβια	Εντόσθια ημέρα 10 MAP
proteobacteria	66,65	85,99	64,77
firmicutes	21,00	9,86	15,42
bacteroidetes	9,12	0,63	15,94
actinobacteria	3,23	3,52	3,81
others	0,00	0,00	0,07
total	100,00	100,00	100,00



**Σχημα 8.11:** Τα επικρατέστερα phylum που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας.

## Κεφάλαιο 9: Σχολιασμός αποτελεσμάτων NGS

### 9.1 Ο στόχος της έρευνας

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν η συσκευασία ολόκληρης τσιπούρας (gilthead sea bream), λίγο μετά την εξαλίευση, σε συσκευασία MAP, σε συνδυασμό με αποθήκευση σε πάγο θα επηρεάσει τα οργανοληπτικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Θα σχολιαστεί ως προς την διαφορά που θα έχει με την κλασική μέθοδο συσκευασίας όπου το ιχθυηρό συσκευάζεται σε κουτιά από φελιζόλ και τοποθετείται πάγος.

Η ιδέα του MAP προήλθε από το γεγονός ότι πολλές και περισσότερες νέες εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές χωρίς επιτόπιες μονάδες επεξεργασίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η χρήση MAP σε ολόκληρη φρέσκια τσιπούρα μπορεί να έχει πλεονεκτήματα όσον αφορά τη διατήρηση της ποιότητας των ψαριών κατά τη μεταφορά σε κεντρικές μονάδες επεξεργασίας, καθώς η βακτηριοστατική δράση του CO<sub>2</sub> και η ανασταλτική επίδραση του MAP στην υποβάθμιση της ποιότητας των αλλοιώσιμων προϊόντων ψαριών είναι καλά τεκμηριωμένη ( Zhuang et al., 2020; Tsironi et al., 2019b).

### 9.2 Η Ανάλυση ως προς Phylum

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ένας από τους κύριους και γρηγορότερους παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας των ψαριών είναι βακτηριακής προέλευσης, τα μικρόβια στο δέρμα, τα βράγχια και τα έντερα της τσιπούρας εντοπίστηκαν από την NGS στην αρχή και στο τέλος της διάρκειας ζωής τους.

Συγκεκριμένα, η ανάλυση μικροβίων πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά τη εξαλίευση και συσκευασία ψαριών σε κουτιά από πολυστυρένιο γεμάτα με νιφάδες πάγου, καθώς και 10 ημέρες αργότερα για καθεμία από τις δοκιμές συσκευασίας που δοκιμάστηκαν (AIR / MAP). Η ανάλυση του μικροβιακού φορτίου με την μέθοδο NGS για το δέρμα, τα βράγχια και τα έντερα, αρχικά σε επίπεδο phylum, έδειξε ότι τα *proteobacteria* ήταν κυρίαρχα σε δείγματα ψαριών 24 ώρες μετά την αλίευση και την αποθήκευσή τους σε πάγο. Το ίδιο phylum ήταν επίσης, κυρίαρχο 10 ημέρες μετά την αποθήκευση στους 0 ° C σε δείγματα που είτε αποθηκεύθηκαν αερόβια (Μέθοδος A) είτε υπό MAP (Μέθοδος B).

Η κοινή παρουσία των Πρωτεοβακτηρίων στα ψάρια υδατοκαλλιέργειας έχει τεκμηριωθεί για την τσιπούρα και από άλλους ερευνητές (Salgueiro et al., 2020), σολομό (Lokesh και Kiron 2016) και σολομό Chinook (Steiner et al., 2021). Πρόσφατα, επίσης, οι Rosado et al. (2019) ανέφεραν το μικρόβιο του δέρματος και των βραγχίων του λαβρακιού και της τσιπούρας, όπου κυριαρχούν τα *Proteobacteria* και τα *Bacteroidetes*. Όσον αφορά το μικρόβιο των εντέρων, το κύριο φυλό των ψαριών ήταν τα *Proteobacteria* μαζί με τα *Firmicutes* και τα

*Actinobacteria*, που έχουν επίσης αναφερθεί από τους Estruch et al. (2015) για το γαστρεντερικό μικρόβιο της τσιπούρας.

### 9.3 Η Ανάλυση ως προς Family

Η ανάλυση NGS στο επόμενο χαμηλότερο ταξινομικό επίπεδο, εκείνο της οικογένειας (family), έδειξε ότι το δέρμα της τσιπούρας αρχικά (αρχική κατάσταση) αποτελούταν από 49 διαφορετικές οικογένειες, πίστευαν ότι μόνο τρεις από αυτές ήταν κυρίαρχες: *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* και *Moraxellaceae*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Salgueiro et al. (2020) όπου έλεγξε το μικροβιακό φορτίο της τσιπούρας που συλλέχθηκε από μια δεξαμενή εδάφους.

Όσον αφορά το αρχικό εντερικό μικροβιογόνο τσιπούρα, αποτελείται από 29 διαφορετικές οικογένειες όπου επικράτησαν οι *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* και *Porphyromonadaceae*. Μετά από στατιστικές αναλύσεις, βρέθηκε θετικός συσχετισμός μεταξύ μικροβίου δέρματος και εντέρου. Αυτός ο τύπος συσχέτισης έχει επίσης αναφερθεί από τους Chaillou et al. (2015) που ανέλυσε τα μικρόβια αλλοίωσης θαλασσινών και ανέφερε ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των μικροοργανισμών που βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα με αυτά που υπάρχουν στο δέρμα. Παρομοίως, οι Wong and Rawls (2012) ανέφεραν ότι τα εντερικά μικρόβια ψαριών επηρεάζονται από τα μικρόβια και το έδειξε ότι το περιβάλλον εκτροφής επηρέασε το μικροβιακό έντερο στον γόνο τιλάπιας.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροβίων του θαλάσσιου νερού, του μικροβίου του εντέρου και του μικροβίου του δέρματος των ψαριών είναι εμφανής Giatsis et al. (2015). Εν συντομία, αυτή η αλληλεπίδραση έχει αποδοθεί σε ψάρια που τρέφονται ταυτόχρονα και αργότερα, σχεδόν ταυτόχρονα, αδειάζουν το εντερικό τους περιεχόμενο στη θάλασσα. Αυτό σημαίνει για ένα χρονικό διάστημα, ανάλογα με τα θαλάσσια ρεύματα, ο βακτηριακός πληθυσμός στο νερό της υδατοκαλλιέργειας επηρεάζεται έντονα από το εντερικό μικροβιακό φορτίο, και μέρος αυτού, παραμένει στο δέρμα της τσιπούρας.

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των βραγχίων τσιπούρας κυριάρχησε σχεδόν πλήρως (94,9%) από την οικογένεια *Rhodocyclaceae*. Βακτήρια αυτής της οικογένειας έχουν εντοπιστεί από τους Giatsis et al. (2015) σε συστήματα ανακυκλοφορίας υδατοκαλλιέργειας (RAS) καθώς και σε ανοιχτά συστήματα. Το Family *Rhodocyclaceae* αποτελείται από 12 γένη που παρουσιάζουν ευέλικτο μεταβολισμό. Γενικά αυτή η οικογένεια έχει απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, όπως εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, λίμνες και ποτάμια και συμμετέχουν στη βιοαποκατάσταση οργανικών αποβλήτων (Oren, 2014).

Η κυριαρχία αυτής της οικογένειας στα βράγχια θα μπορούσε, πιθανότατα, να αποδοθεί στην υψηλή συγκέντρωση αζώτου στο περιβάλλον υδατοκαλλιέργειας εκτροφής. Στις υδατοκαλλιέργειες το άζωτο προέρχεται από δύο πηγές: την τροφή που διασκορπίζεται άφθονα στη θάλασσα καθώς και τα κόπρανα των ψαριών. Επιπλέον, πρέπει να θεωρηθεί ότι, για λόγους παραγωγικότητας, η πυκνότητα των ψαριών στα κλουβιά είναι αρκετά υψηλή, και επομένως τα θαλάσσια ρεύματα είναι συχνά αδύναμα για την αναπλήρωση νερού σε κλουβιά, και

έτσι το περιβάλλον είναι ιδανικό για την ανάπτυξη αναερόβιων ή αερόβια βακτηρίων όπως αυτά της οικογένειας Rhodocyclaceae (Haro-Moreno, 2020).

## 9.4 Η επίδραση του MAP

Αρκετές εργασίες έχουν δείξει τη θετική επίδραση της εφαρμογής MAP στην ποιότητα των ψαριών όπως αναθεωρήθηκε από τους Mendez, (2018) και Zhuang et al., (2020). Τα περισσότερα από αυτά τα έργα ασχολήθηκαν με ψάρια που είχαν υποβληθεί σε κάποιο είδος επεξεργασίας πριν συσκευαστούν, έτσι ώστε το μικροβιακό φορτίο τους είχε μεταβληθεί.

Η διαφορά αυτής της εργασίας είναι ότι τα ψάρια συσκευάστηκαν καθώς βγήκαν από τη θάλασσα χωρίς κανένα στάδιο προεπεξεργασίας. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης 10 ημερών της τσιπούρας στον αέρα ή σε συσκευασία MAP, υπήρξε μια ποιοτική και ποσοτική διαφοροποίηση στο μικρόβιο δέρματος, βράγχων και εντέρων. Συγκεκριμένα, οι στατιστικές αναλύσεις του οικογενειακού πληθυσμού έδειξαν ότι η Μέθοδος A (AIR) και B (MAP) διέκριναν τον συνολικό αριθμό οικογενειών μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού - αυτό σημαίνει μικρότερος αριθμός οικογενειών σε κάθε πείραμα - εκτός από τη μέθοδο της εφαρμογής MAP στα βράγχια. Επιπλέον, οι αναλύσεις της ποικιλομορφίας των οικογενειών έδειξαν ότι τόσο η αερόβια όσο και η συσκευασία MAP επηρέασαν τον αριθμό των οικογενειών σε κάθε μικρόβιο (δέρμα, βράγχια και έντερα) καθώς και την αφθονία κάθε οικογένειας.

Η αυξημένη ποικιλομορφία μικροβίων που αναπτύχθηκε υπό συνθήκες MAP έχει αναφερθεί από τους Drosinos et al., (1996). Γενικά, κατά τη διάρκεια της 10-ήμερας ψυχρής αποθήκευσης, ευνοήθηκαν και καλλιεργήθηκαν ψυχρότροφες και ψυχρόφιλες οικογένειες βακτηρίων και αρκετές οικογένειες που κυριάρχησαν στο αρχικό μικρόβιο, αντικαταστάθηκαν στο τέλος της διάρκειας ζωής των ψαριών. Για παράδειγμα, στο δέρμα των ψαριών, οι αρχικά κυρίαρχες οικογένειες *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* και *Moraxellaceae* μετά από 10 ημέρες αερόβιας αποθήκευσης αντικαταστάθηκαν από τις οικογένειες *Pseudoalteromonadaceae*, *Psychromonadaceae* και *Shewanellaceae* που όλες ήταν ψυχρότροφοι και ψυχόφιλοι. Μαζί με το κρύο, η χρήση του MAP ήταν επίσης ένας παράγοντας που διαφοροποίησε το μικροβιακό φορτίο των ψαριών.

Η περίπτωση της οικογένειας *Pseudoalteromonadaceae* ήταν διακριτική δεδομένου ότι την τελευταία ημέρα της διάρκειας ζωής επικράτησε (45,5%) στο δέρμα των ψαριών που ήταν αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες και ουσιαστικά απουσίαζε από τα δείγματα MAP. Τα μέλη της οικογένειας *Pseudoalteromonadaceae* είναι αερόβια, και αυτός είναι ο λόγος που δεν αναπτύχθηκε βάσει του MAP συνθήκες. Μια αντίθετη περίπτωση είναι αυτή της οικογένειας *Comamonadaceae*, η οποία ουσιαστικά παρέμεινε ανεπηρέαστη από την εφαρμογή MAP τόσο στο δέρμα όσο και στα έντερα των μικροβίων. Επίσης, στην περίπτωση μικροβίων στα βράγχια, μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης MAP στους 0 °C, η αρχικά σχεδόν απόλυτη κυρίαρχη οικογένεια *Rhodocyclaceae* αν και μειώθηκε σημαντικά και αντικαταστάθηκε από τις οικογένειες *Psychromonadaceae*, *Shewanellaceae*, δεν εξαλείφθηκε. Φαίνεται ότι ο MAP μπορεί, πράγματι, να τροποποιήσει το μικρόβιο των ψαριών, αλλά μόνο στο

πλαίσιο του αρχικού μικροβίου, καθώς ομάδες βακτηρίων ενδέχεται να μην αναστέλλονται από την τροποποίηση της ατμόσφαιρας.

## 9.5 Διάρκεια ζωής δειγμάτων

Όσον αφορά τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων, η αισθητηριακή αξιολόγηση η βαθμολογία έδειξε ότι έως την 8η ημέρα αποθήκευσης στους 0 ° C, τα δείγματα MAP εμφάνισαν υψηλότερη βαθμολογία αισθητηρίων από τη συμβατική αερόβια αποθήκευση.

Ωστόσο, δύο ημέρες αργότερα (10η ημέρα αποθήκευσης) και τα δύο δείγματα AIR και MAP απορρίφθηκαν αισθητικά. Υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με τη διάρκεια ζωής των προϊόντων θαλασσινών (Zhuang et al., 2020, Odeyemi, 2018), καθώς και gilthead seabream, συσκευασμένα με MAP ή συμβατικά στον αέρα (Mendes, 2018). Ενδεικτικά, οι Lougonois et al. (2003) ανέφεραν ότι ολόκληρη η τσιπούρα gilthead που αποθηκεύτηκε αερόβια σε πάγο ήταν ακόμα αισθητή αποδεκτή μετά από 14-15 ημέρες. Επίσης, οι Cakli et al., (2006) ανέφεραν διάρκεια ζωής 14 ημερών για ολόκληρο, εκσπλαχτισμένο και χωρίς βράγχια τσιπούρα και τσιπούρα αποθηκευμένα σε πάγο.

Αξίζει να σημειωθεί στο τελευταίο πείραμα ότι τα δείγματα είχαν πλυθεί μία φορά με νερό βρύσης πριν από τον πείραμα. Ωστόσο, είναι αδιαμφισβήτητο, ότι η διάρκεια ζωής των θαλασσινών που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, είτε με MAP / κενό είτε όχι, εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών εκτροφής, της μεθόδου σφαγής, των πρωτοκόλλων χειρισμού και της πιθανής εφαρμογής των προ-επεξεργασιών πλύσης απολύμανσης .

Ωστόσο, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι μεταξύ των σημαντικών παραμέτρων που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των ψαριών είναι το αρχικό τους μικροβιακό φορτίο, ο τύπος βακτηρίων που συνθέτουν την μικροβιακή χλωρίδα, η επεξεργασία ως προεπεξεργασία (εκσπλαχτισμένο, φιλέτο κ.λπ.), οι συνθήκες συσκευασίας επίσης οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά και αποθήκευσή τους.

Σε αυτό το πείραμα ο κύριος λόγος της απόρριψης τσιπούρα από τους εκτιμητές ήταν η δυσάρεστη οσμή, τόσο στο δέρμα όσο και στα βράγχια, κυρίως στα δείγματα που συσκευάστηκαν με MAP. Η οσμή των δειγμάτων MAP μπορεί να αποδοθεί κυρίως στις βασικές οικογένειες που εντοπίστηκαν στο τέλος της 10ης ημέρας αποθήκευσης, δηλαδή *Comamonadaceae*, *Shewanellaceae* και *Psychromonadaceae*.

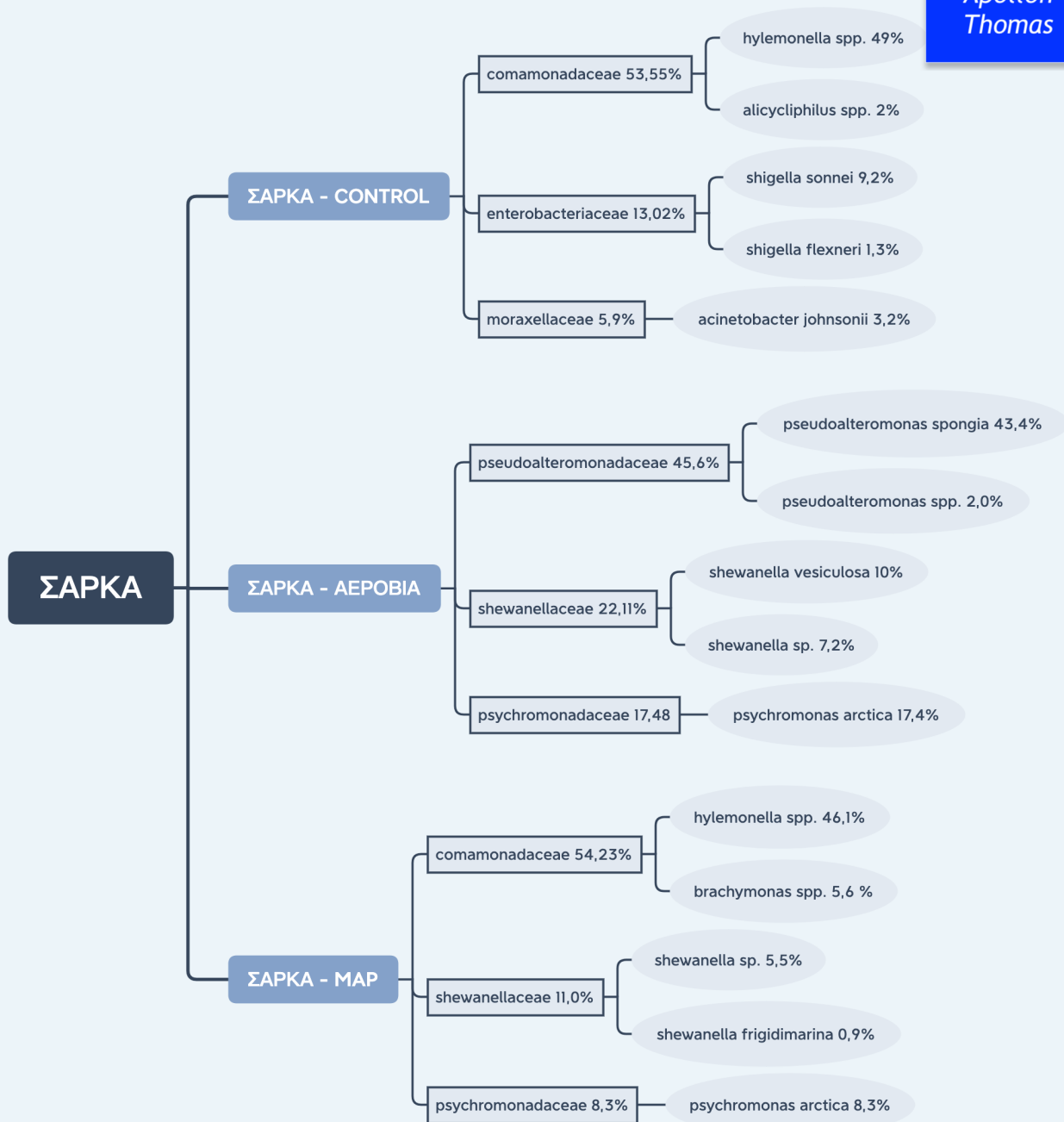
Τα βακτήρια της οικογένειας *Comamonadaceae* είχαν πρωταρχική παρουσία στην τσιπούρα, τόσο στο δέρμα όσο και στα έντερα, και δεν επηρεάστηκαν από το MAP. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει αναερόβια απονιτρωτικά και βακτήρια απομάκρυνσης του φωσφόρου, συχνά απομονωμένα από το έδαφος και λίμνες (Willems, 2014). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η χαμηλή συγκέντρωση νερού σε διαλυμένο οξυγόνο (<1 mg · L<sup>-1</sup>) ευνοεί την παρουσία της (Sadaie, 2007). Η ξεχωριστή παρουσία αυτής της οικογένειας στα ψάρια MAP ίσως θα μπορούσε να αποδοθεί στην τροφή (άζωτο και φώσφορο) που δεν καταναλώνονται από τα ψάρια και το χαμηλό ρεύμα της θάλασσας.



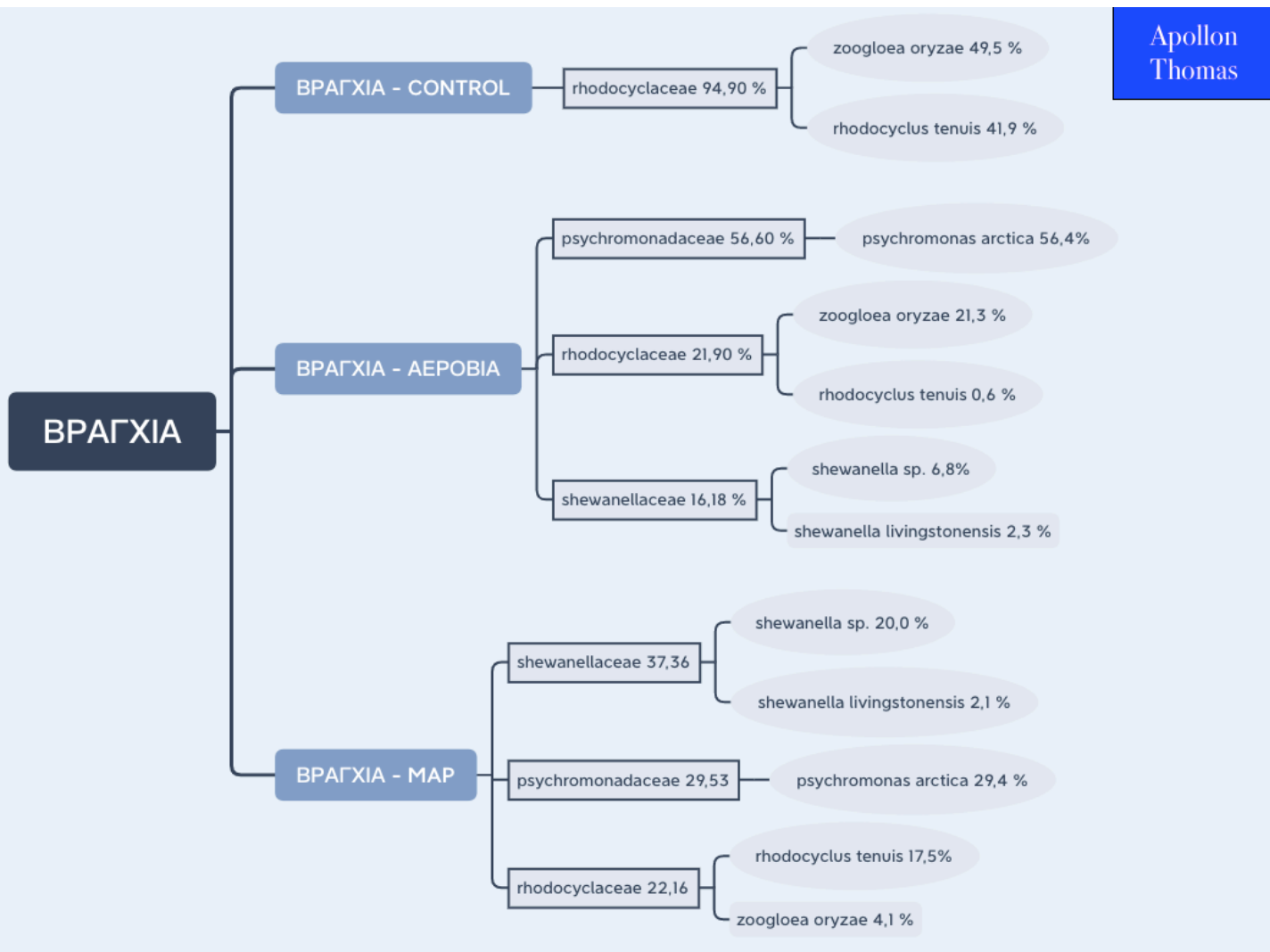
Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία αυτών των βακτηρίων σε εγκαταστάσεις καλλιέργειας θεωρείται θετική επειδή μπορεί να αφαιρέσει τις υπερβολικές ποσότητες αζώτου και φωσφόρου και να βελτιώσει την ποιότητα του νερού (Li, 2017). Αυτή η οικογένεια ήταν μία από τις επικρατούσες, του εντερικού μικροβίου της τσιπούρας, και όπως αποδείχθηκε στατιστικά, υπήρχε υψηλή συσχέτιση μεταξύ του δέρματος και του εντερικού μικροβίου.

Η οικογένεια *Shewanellaceae* - επίσης μία από τις κυρίαρχες οικογένειες τόσο στα δείγματα AIR (μέθοδος A) όσο και σε δείγματα MAP (μέθοδος B) - περιλαμβάνει ψυχρότροφα, βακτήρια αλλοίωσης που είναι πιθανά αναερόβια και πιο ανθεκτικά στο CO<sub>2</sub> από ό, τι τα *Pseudomonas* και έτσι μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες MAP (Antunes-Rohling, 2019) παράγοντας H<sub>2</sub>S καθώς και ενώσεις τριμεθυλαμίνης (Satomi et al., 2007).

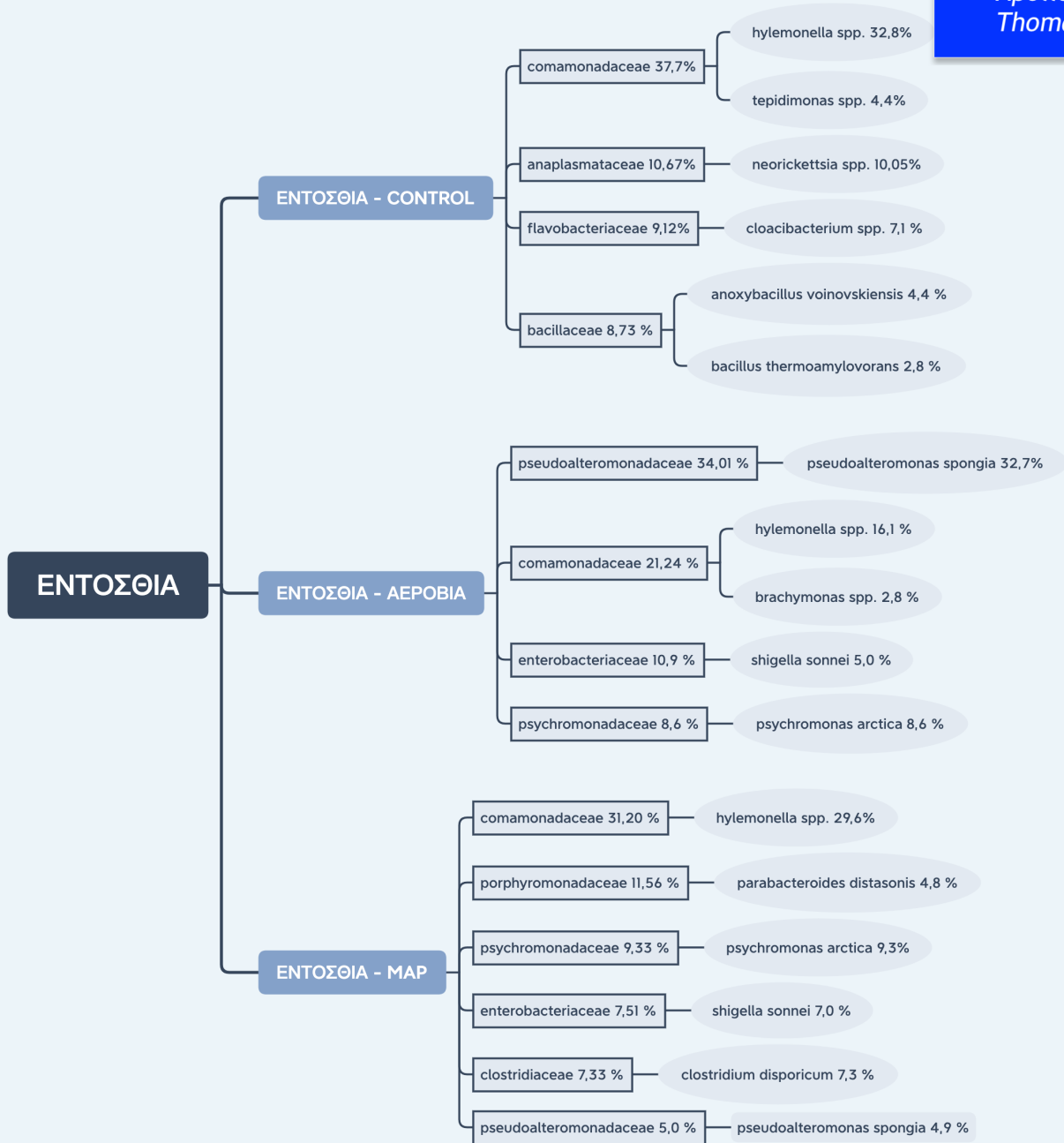
Όσον αφορά τα βακτήρια της οικογένειας *Psychromonadaceae*, είναι κάτοικοι θαλάσσιου πάγου και υδάτινων περιβαλλόντων. Είναι προαιρετικά αναερόβια, αλλά ορισμένα είδη μπορεί να είναι αερολυτικά ή αερόβια. Τα βακτήρια αυτής της οικογένειας υπήρξαν μέρος της μικροβιακής αλλοίωσης σε στρείδια του Ειρηνικού και στρείδια της Ανατολής κατά την αποθήκευση σε ψυγείο (Chen, 2019).



**Σχημα 9.1:** Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στην σάρκα της τσιπούρας



**Σχημα 9.2:** Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στα βράγchia της τσιπούρας



**Σχhμα 9.3:** Τα επικρατέστερα Family και η αντιστοιχία σε species που υπάρχουν στα εντόσθια της τσιπούρας

# Βιβλιογραφία

Achenbach L. A., Michaelidou U., Bruce R. A., Fryman J., Coates J. D. 2001; *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *Int J Syst Evol Microbiology* ,51, 527–533

Adriana Antunes-Rohling, Ángela Artaiz, Silvia Calero ,Nabil Halaihel ,Silvia Guillén, Javier Raso, Ignacio Álvarez ,Guillermo Cebriána 2019 Modelling microbial growth in modified-atmosphere-packed hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at different temperatures *Food Research International* Volume 122, August 2019, Pages 506-516 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691930328X?via%3Dihub>

Anderson, J.L., 2002. Aquaculture and the future: why fisheries economist should care. *Marine Resource Economic* 17 : 345-357

Asche, F., 2008. Farming the sea. *Marine Resource Economics*

Ashie, I.N.A., Smith, J.P., Simpson, B.K., 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 87-121

B. Belton, S.R. Bush, D.C. Little, (2018) .Not just for the wealthy: Rethinking farmed fish consumption in the Global South, *Glob. Food Sec.* 16, 85-92

Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T. & Tolasa S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18, 391–397. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2005.11.005>.

Cao SJ, Deng CP, Li BZ, Dong XQ, Yuan HL. 2010 *Cloacibacterium rupense* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*

Chaillou S., Chaulot-Talmon A., Caekebeke H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., Desmots M.H., Dousset X., Feurer C., Hamon E., Joffraud J.J., La Carbona S., Leroi F., Leroy S., Lorre S., Macé S., Pilet M.F., Prévost H., Rivollier M., Roux D., Talon R., Zagorec M. & Champomier-Vergès M.C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal*, 9(5), 1105-1118. doi: 10.1038/ismej.2014.202.

Chen H., Wang M., Yang C., Wan X., Ding H.H., Shi Y., Zhao C. (2019). Bacterial spoilage profiles in the gills of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Eastern oysters (*C. virginica*) during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 82, 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.008>.

Coyne F P 1933 The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part II *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52 19-24

Dalgaard, P. (2003) Spoilage of Seafood. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.). Elsevier Science Ltd/ Academic Press, London, UK. 2462-2471.

Davidson, P. M., & Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. In P. Zeuthen, & L. Bøgh-Sørensen (Eds.), Food preservation techniques. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

Divoll, T. J., Brown, V. A., Kinne, J., & McCracken, G. F. (2018). Disparities in second- generation DNA metabarcoding results exposed with accessible and repeatable workflows. *Molecular Ecology Resources* 18 (3), 590-601

Drosinos E.H. & Nychas G.E. (1996). *Brochothrix Thermosphacta*, a Dominant Microorganism in Mediterranean Fresh Fish (*Sparus Aurata*) Stored under Modified Atmosphere. *Italian Journal of Food Science*, 8(4), 323–329.

Egan S., Holmström C., Kjelleberg S. 2001; *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol* 2, 565-574

Ester Gutiérrez Sebastián ,Lozano Jordi Guillén , *Aquaculture* (2020)

Estruch G., Collado M., Peñaranda D., Vidal A.T., Cerdá M.J., Martínez G. P., et al. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One* 10, e0136389. doi: 10.1371/journal.pone.0136389

European Commission, 2016b. Summary of the 27 Multiannual National Aquaculture Plans. Publications Office of the European Union, Luxembourg Available at :[http://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/27-multiannual-national-aquaculture-plans-summary\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/27-multiannual-national-aquaculture-plans-summary_en.pdf).

F. Asche 2008. Farming the Sea. *Marine Resource Economics* 23:159-185

FAO (2010): [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Spaurus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Spaurus_aurata/en)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2008 Current World Fertilizer Trends and Outlook to 2011/12 (available from: <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/cwfto11.pdf>)

FAO 2001. Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 27 September 2001.

FAO, 2015. Fisheries and Aquaculture Department: Global Statistical Collections. Διαθέσιμο: <http://www.fao.org/fishery/statistics/>

FAO, Fishery and Aquaculture Statistics 2017, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome,

FAO, The World's Mangroves 1980–2005, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2007

G.J. Tacon, M. Metian, (2009) Fishing for feed or fishing for food: Increasing global competition for small pelagic foragefish, *AMBIO A J. Hum. Environ.* 38(6): 294-302

- Giatsis C., Sipkema D., Smidt H., Heilig H., Benvenuti G., Verreth J., et al. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports* 5, 18206. <https://doi.org/10.1038/srep18206>
- Gillis, A. and Tidswell, O. (2017). "Evolution: Origin of vertebrate gills". *Nature*. 542 (7642): 394.
- Giménez B, Roncalés P and Beltrán J A 2002 Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout *J. Sci. Food Agric.* 82 1154- 1159
- Goulas A E and Kontominas M G 2007 Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf-life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes *Eur. Food Res. Technol.* 224: 545-563
- Gram, L., 1992. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *International Journal of Food Microbiology* 16: 25–39.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33 :121- 37
- Haro-Moreno J.H., Hernandez Coutinho F., Zaragoza-Solas A., Picazo A., Almagro-Moreno A. & López-Pérez M. (2020). Dysbiosis in marine aquaculture revealed through microbiome analysis: reverse ecology for environmental sustainability. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12), fiae218, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae218>
- Hassanpour, B., Ismail, M.M., Mohammed, Z., Kamarulzaman, N.H., 2010. Source of pro-ductivity growth in rainbow trout aquaculture in Iran: technical efficiency changeor technological progress? *Aquaculture Economics and Management.* 14: 218-234
- Hiraishi A., Shin Y. K., Sugiyama J. 1997; Proposal to reclassify *Zoogloea ramigera* IAM 12670 (P. R. Dugan 115) as *Duganella zoogloeoides* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* ,47: 1249-1252
- Hiraishi, A., Shin, Y. K. & Sugiyama, J. ( 1995a; ). *Brachymonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., an aerobic chemoorganotrophic bacterium which contains ridoquinones, and evolutionary relationships of ridoquinone producers to bacterial species with various quinone classes. *J Gen Appl Microbiol* 35: 311–318
- Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th edn. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 112 401-403
- Huss, H.H., Reilly, A., Karim Ben Embarek, P., 2000. Prevention and control of hazards in sea- food. *Food Control.* 111: 49-156
- Imhoff, J. F., and H. G. Triiper. 1989. Genus *Rhodocyclus* Pfennig ,*Bergey's manual of systematic bacteriology*,. 3: 763-774
- Ioannis S.Boziaris Foteini F.Parlapani. 2017 *The Microbiological Quality of Food Foodborne Spoilers* ,Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.122-145

J Babic Milijasevic<sup>1</sup>, M Milijasevic<sup>1</sup> and V Djordjevic<sup>1</sup> 2019 <sup>1</sup> Institute of Meat Hygiene and Technology, Kacanskog 13, Belgrade, Serbia.

Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E., 1999. Chemical and sensory changes associated with micro- bial flora of Mediterranean Boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 698-706

Lalitha, K.V., Surendram, P.K., 2006. Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. *Food Control*.

Laura Provincial Mario Gil Elena Guillén Verónica Alonso Pedro Roncalés Jose A. Beltrán 2010. Effect of modified atmosphere packaging using different CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. 45(9) :1828-1836

Ledward, D. A. (1985). Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Science* 15 (3)149-171

Li Z., Che J., Xie J., Wang G., Yu E., Xia Y., Yu D. & Zhang K. (2017). Microbial succession in biofilms growing on artificial substratum in subtropical freshwater aquaculture ponds. *FEMS Microbiol Letters*, 1;364(4). doi: 10.1093/femsle/fnx017. PMID: 28130371.

Liston, J., 1980. Microbiology in fishery science. In: Connell, J.J., Staff of Torry Research Station (Eds.), *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books, Farnham, Surrey.

Lokesh J. & Kiron V. (2016). Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Scientific Reports*,

Lougovois, V.P. & Kyranas, V.R. (2005). Freshness Quality and Spoilage of Chill-Stored Fish. In: *Food Policy, Control and Research* (edited by A.P. Riley). New York: Nova Science Publishers, Inc.

Lougovois, V.P., Kyranas, E.R. & Kyranas, V.R. (2003). Comparison of Selected Methods of Assessing Freshness Quality and Remaining Storage Life of Iced Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*.

Malik, K. A. & Schlegel, H. G. (1981). Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N<sub>2</sub>-fixing conditions. *FEMS Microbiol Lett* 11, 63–67

Martinez-Alvarez, O., Lopez-Caballero, M.E., Montero, P., Gomez-Guillen, M.C., 2007. Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. *Food Chem*.

Masniyom P, Benjama O and Maneesri J 2013 Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on quality changes of refrigerated tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets *Int. Food Res. J.*

Mendes R. (2019) Technological processing of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*): A review of quality changes, *Food Reviews International*, 35(1), 20-53. DOI: 10.1080/87559129.2018.1441298



- Mountfort D. O., Rainey F. A., Burghardt J., Kaspar H. F., Stackebrandt E. 1998; *Psychromonas antarcticus* gen. novsp nov., a new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica . Arch Microbiol
- N. Ahmed, (2013) Linking prawn and shrimp farming towards a green economy in Bangladesh: confronting climate change, Ocean Coast. Manag.
- N. Horn, (1987) *Clostridium disporicum* sp. nov., a Saccharolytic species able to form two spores per cell, isolated from a Rat cecum, Int. J. Syst. Bacteriol.
- Odeyemi O.A., Burke C.M., Bolch C.C.J. & Stanley R. (2018). Seafood spoilage microbiota and associated volatile organic compounds at different storage temperatures and packaging conditions, International Journal of Food Microbiology, 280, 87-99, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.029>.
- Oren A. (2014). The Family Rhodocyclaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_292](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_292)
- Pacquit, A., Lau. K.T., MacLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B., Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. Talanta, 515-520.
- Pai H., Choi E., Lee H., Hong J. Y., Jacoby G. A. 2001; Identification of CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$  -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei* , *Escherichia coli* , and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Clin Microbiol Vol. 39, No. 10 p.3747–3749
- Pantazi D, Papavergou A, Pournisa N, Kontominasa M G and Savvaidis I N 2008 Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes *Food Microbiol*.
- Parlapani, F. F., Kormas, K. Ar, & Boziaris, I. S. 2015. 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 (12) 2386-2394
- Parlapani, F.F., Boziaris, I.S., 2016. Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. LWT-Food Sci. Technol.
- Parlapani, F.F., Meziti, A., Kormas, K.A., Boziaris, I.S., 2013. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. Food Microbiol. 33(1) :85-89
- Paster B. J., Dewhirst F. E., Olsen I., Fraser G. J. 1994; Phylogeny of *Bacteroides* , *Prevotella* , and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J Bacteriol

Rokhbakhsh-Zamin, F.; Sachdev, D.P.; Kazemi-Pour, N.; Engineer, A.; Zinjarde, S.S.; Dhakephalkar, P.K.; Chopade, B.A. (2012). "Characterization of plant growth promoting traits of Acinetobacter species isolated from rhizosphere of Pennisetum glaucum". J Microbiol Biotechnol.

S.E. Greiman, V.V. Tkach, E. Pulis, T.J. Fayton, S.S. Curran, 2014 Large scale screening of digeneans for Neorickettsia endosymbionts using real-time PCR reveals new Neorickettsia genotypes, host associations and geographic records.

Sadaie T., Sadaie A., Takada M., Hamano, K., Ohnishi J., Ohta N., Matsumoto K. & Sadaie Y. (2007). Reducing sludge production and the domination of Comamonadaceae by reducing the oxygen supply in the wastewater treatment procedure of a food processing factory. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71, 791–799. <https://doi.org/10.1271/bbb.60632>

Salgueiro V., Manageiro V., Bandarra N.M., Reis L., Ferreira E. & Caniça M. (2020). Bacterial Diversity and Antibiotic Susceptibility of Sparus aurata from Aquaculture. Microorganisms. 8(9), 1343.

Satomi, M., Vogel, B.F., Venkateswaran, K. & Gram, L. (2007). Description of Shewanella glacialipiscicola sp. nov. and Shewanella algidipiscicola sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that Shewanella affinis is a later heterotypic synonym of Shewanella colwelliana. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(2), 347-352. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64708-0>

Sivertsvik M, Jeksrud W K and Rosnes J T 2002 A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety *Int. J. Food Sci. Technol.* 37(2): 107-127

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. Food Chemistry.

Smith, M.D., Asche, F., Guttormsen, A.G., Wiener, J.B., 2010. Genetically modified salmon and full impact assessment. Science. 330 :1052-1053

Stamatis N and Arkoudelos J S 2007 Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbial, chemical and sensory quality indicators of fresh, filleted *Sardina pilchardus* at 3°C *J. Sci. Food Agric.*

Steiner K., Heasman K., Laroche O., Pochon X., Preece M., Bowman J., Walker S.P. & Jane E. (2021). Symonds, The microbiome of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in a recirculation aquaculture system, Aquaculture, 534, 736227,

T. Cashion, P. Tyedmers, R.W.R. Parker, Global reduction fisheries and their products in the context of sustainable limits, Fish Fish.

Taoukis, P., and Tsironi, T. 2016. Smart packaging for monitoring and managing food and beverage shelf life, chapter 5. Food and Beverage Stability and Shelf Life. Kilcast, D., and Subramaniam, P., Eds. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited. 141-168

Theofania N. Tsironi and Petros S. Taoukis 2018. Current Practice and Innovations in Fish Packaging, *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 27(10) :1024-1047

Tsironi T., Lougovois V., Simou V., Mexi A., Koussissis S., Tsakali E., Papatheodorou S., Stefanou V., Van Impe J. & Houhoula D. (2019b). Next Generation Sequencing (NGS) for the Determination of Fish Flesh Microbiota, *Journal of Food Research*, 8(4), 101-110. DOI:10.5539/jfr.v8n4p101

Tsironi, T., and Taoukis, P. S. 2010. Modelling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging and nisin on shelf life. *J. Food Sci.* 75(4): 243-251.

Tsironi, T., Anjos, L., Pinto, P. I. S., Dimopoulos, G., Santos, S., Santa, C., et al. (2019). High pressure processing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring. *Journal of Food Engineering*.

Tsironi, T., Giannoglou, M., Ntzimani, A., Kallioupi, K., Evaggelopoulou, A. M., and Taoukis, P. 2017b. Application of smart TTI labels for seafood safety monitoring in the cold chain. *Seafood Safety: New Findings and Innovation Challenges*. Brussels, Belgium.

Tsironi, T., Giannoglou, M., Platakou, E., and Taoukis, P. 2016. Evaluation of time temperature integrators for shelf- life monitoring of frozen seafood under real cold chain conditions. *Food Packaging and Shelf Life*.10: 46-53

Tsironi, T., Giannoglou, M., Platakou, E., and Taoukis, P. S. 2015a. Training of SMEs for frozen food shelf life testing and novel smart packaging application for cold chain monitoring. *Int. J. Food Stud.* 4 :148-152

Tsironi, T., Gogou, E., Velliou, E., and Taoukis, P. S. 2008a. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna slices. *Int. J. Food Microbiol.* 128(1), 108-115.

Tsironi, T., Houhoula, D., Taoukis, P. 2020 Hurdle technology for fish preservation. *Aquaculture and Fisheries* 5(2) :65-71

Tsironi, T., Maltezou, I., Tsevdou, M., Katsaros, G., and Taoukis, P. S. 2015b. High pressure cold pasteurization of gilthead seabream fillets: selection of process conditions and validation of shelf-life extension. *Food and Bioprocess Technology*. 8: 681-690

Tsironi, T., Ronnow, P., Giannoglou, M., and Taoukis, P. 2017a. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements. The Case of *Vibrio Spp.* Growth during Transportation of Oysters. *Food Control*.

Tsironi, T., Stamatiou, A., Giannoglou, M., Velliou, E., and Taoukis, P. S. 2011. Predictive modelling and selection of time temperature integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. *LWT-Food Sci. Technol.*

Tsironi, T., Tsevdou, M., Velliou, E., and Taoukis, P. 2008b. Modelling the effect of temperature and CO<sub>2</sub> on microbial spoilage of chilled gilthead seabream fillets. *Acta Hort.* 802, 345-350.

Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA et al. 1999 Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999

Willems A. (2014) The Family Comamonadaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_238](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_238)

Wong S. & Rawls J.F. (2012). Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Molecular Ecology*, 21(13), 3100-2. doi: 10.1111/j.1365-294x.2012.05646.x.

Zhuang S., Hong H., Zhang L. & Luo Y. (2020). Spoilage-related microbiota in fish and crustaceans during storage: Research progress and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1–37. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12659>

<<Αλληλεπίδραση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύων και του παθογόνου *Yersinia enterocolitica* σε φιλέτο τσιπούρας και μοντέλο υπόστρωμα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας>> Σάββα Αμαλία Βόλος, 2013 , σελ 20-32

<<Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδραση τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα >> Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη Βόλος 2013, σελ 60-80.

<<Μικροβιολογικές και οργανοληπτικές μεταβολές και χημικοί δείκτες αλλοίωσης κατά την συντήρηση της νωπής τσιπούρας>> Ζουμπουλα Νίκη Βόλος 2013, σελ 32-36.

Νεοφύτου, Χ. (2007). Βιολογία Υδρόβιων Σπονδυλωτών Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Βόλος.

Παπουτσόγλου, Ε. (2008). Διατροφή Ιχθύων, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα