



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ
ΘΑΛΑΣΣΙΝΩΝ»**

“ASSESSMENT OF THE MICROBIAL DIVERSITY OF SEAFOOD”

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : ΚΑΡΑΛΗ ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ

ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΟΛΓΑ

NAME OF STUDENT: KARALI MARIA ELENI

NAME OF SUPERVISOR: PAPADOPOULOU OLGA

ΑΙΓΑΛΕΩ 2023/ AIGALEO 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας των θαλασσινών» που παρουσιάστηκε από την Καραλή Μαρία Ελένη και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία παρουσίασης : 29/09/2023	Όνομα επιβλέπουσας Παπαδοπούλου Όλγα	Υπογραφή
	Όνομα μέλους επιτροπής Μπρατάκος Σωτήρης	Υπογραφή
	Όνομα μέλους επιτροπής Κοντελής Σπύρος	Υπογραφή

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

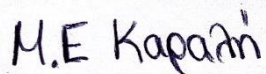
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Καραλή Μαρία Ελένη του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 18684054 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της 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».

Η Δηλούσα,

Καραλή Μαρία Ελένη



M.E. Καραλή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η παρουσίαση των βασικότερων αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων που συνθέτουν την μικροβιακή χλωρίδα της κλάσης των μαλακίων. Τα μαλάκια ως μέλος των θαλασσινών αποτελούν εξαιρετικά ευαλοίωτα τρόφιμα. Η αυξημένη ευπάθεια τους σε αλλοιώσεις οφείλεται κυρίως στην χημική τους σύσταση καθώς είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (λιπαρά, πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα) και αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα ανάπτυξης για τους μικροοργανισμούς.

Η αλλοίωση των μαλακίων προκαλείται κυρίως από τα γένη *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Moraxella* και εκδηλώνεται με δυσάρεστες οσμές και γεύσεις που οφείλονται στην βακτηριακή αποικοδόμηση των συστατικών του τροφίμου. Οι μεταβολίτες που παράγονται από αυτές τις αντιδράσεις χρησιμοποιούνται ως χημικοί δείκτες για τον προσδιορισμό του βαθμού αλλοίωσης. Οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (ΕΑΜ) των μαλακίων φαίνεται να είναι τα βακτήρια *Pseudomonas* και *Shewanella*, με το πρώτο να κυριαρχεί στα μαλάκια μεσογειακών νερών και το δεύτερο σε μαλάκια ψυχρών υδάτων.

Όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς στα μαλάκια, ενδέχεται είτε να αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του τροφίμου (ενδογενείς παθογόνοι) όπως *Vibrio* και *Aeromonas* είτε να προέρχονται από επιμόλυνση των υδάτων (εξωγενείς παθογόνοι) όπως *Salmonella* και *Escherichia coli*. Διασταυρούμενη επιμόλυνση μπορεί επίσης να συμβεί από τον άνθρωπο σε όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής εάν δεν εφαρμόζονται ορθοί κανόνες υγιεινής.

Οι παθογόνοι που αναπτύσσονται στα τρόφιμα ευθύνονται για πληθώρα τροφολοιμώξεων και τροφοτοξινώσεων με σοβαρότερες αυτών την επιδημία της χολέρας από *V. cholerae* και την αιμορραγική κολίτιδα από το *E. coli* O157:H7.

Για την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και την επιμήκυνση της εμπορικής διάρκειας ζωής των τροφίμων χρησιμοποιούνται συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, με ρυθμιζόμενες συγκεντρώσεις O₂, CO₂ και N₂. Αν και οι περισσότεροι αλλοιογόνοι και παθογόνοι μικροοργανισμοί καταστέλλονται ή θανατώνονται με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, υπάρχουν και κάποιοι που είναι ανθεκτικοί, αποτελώντας δυνητικό κίνδυνο για τα προϊόντα MAP.

Abstract

The aim of this thesis is to present the main spoilage and pathogenic bacteria that represent the microbiota of the mollusk class. As a member of the seafood family, mollusks are highly perishable foods. Their increased susceptibility to spoilage is mainly due to their chemical composition, as they are rich in nutrients (fats, proteins, vitamins, minerals) and provide an ideal growth medium for microorganisms.

The spoilage of mollusks is mainly caused by the genera *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Moraxella* and is characterized by off odors and flavors due to the bacterial degradation of the food components. The metabolites produced by these reactions are used as chemical indicators to determine the degree of spoilage. The Specific Spoilage Organisms (SSOs) of mollusks appear to be the bacteria *Pseudomonas* and *Shewanella*, with the former being predominant in Mediterranean mollusks and the latter in cold-water mollusks.

Regarding pathogens in mollusks, they may either be part of the natural microbiota of the food (indigenous pathogens) such as *Vibrio* and *Aeromonas* or they may originate from water contamination (nonindigenous pathogens) such as *Salmonella* and *Escherichia coli*. Cross-contamination can also occur from humans at all stages of the production chain if proper hygiene rules are not applied.

Foodborne pathogens are responsible for a variety of foodborne illnesses and food poisoning, the most serious of which are the cholera epidemic caused by *V. cholerae* and hemorrhagic colitis caused by *E. coli* O157:H7.

To inhibit the growth of microorganisms and prolong the shelf life of food products, modified atmosphere packaging with adjustable concentrations of O₂, CO₂ and N₂ is used. Although most spoiling and pathogenic micro-organisms are suppressed or destroyed by this method, there are some that are resistant, posing a potential risk to MAP products.

Λέξεις κλειδιά

Μαλάκια, αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, παθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλοίωση, Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), μικροχλωρίδα, MAP (Modified Atmosphere Packaging)

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
Abstract.....	5
Λέξεις κλειδιά.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Θαλασσινά	7
1.2 Σύσταση και Θρεπτική Αξία	9
1.3 Αλλοίωση των θαλασσινών	12
2. Μικροοργανισμοί στα μαλάκια	13
2.1 Γενικά στοιχεία για τα βακτήρια	13
2.2 Αρχική μικροχλωρίδα	15
2.3 Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM)	16
2.4 Μικροβιακή Αλλοίωση	17
2.5 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης	19
3. Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί στα μαλάκια	22
3.1 Γενικά.....	22
3.2 <i>Pseudomonas</i> spp.....	25
3.3 <i>Shewanella</i> spp.	27
3.4 <i>Acinetobacter</i>	32
3.5 <i>Moraxella</i>	34
4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα μαλάκια	36
4.1 Ενδογενείς Παθογόνοι Μικροοργανισμοί	40
4.1.1 <i>Vibrio</i> spp.	40
4.1.2 <i>Aeromonas</i> spp.	45
4.2 Εξωγενείς Παθογόνοι Μικροοργανισμοί.....	47
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	47
5. Επίδραση μεθόδων συσκευασίας στην μικροχλωρίδα των θαλασσινών	51
6. Συμπεράσματα.....	54
7. Βιβλιογραφία	56

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θαλασσινά

Τα θαλασσινά αποτελούν μια εξαιρετικά ανομοιογενή ομάδα ζωικών οργανισμών με κοινό χαρακτηριστικό την διαβίωση στο θαλάσσιο περιβάλλον. Εμφανίζουν πολύπλοκη μικροβιακή οικολογία και δέχονται έντονες περιβαλλοντικές επιδράσεις (Λουγκοβόης, 2021). Αποτελούν μεγάλο μέρος της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής καθώς γίνονται όλο και πιο διαδεδομένα στην διατροφή του ανθρώπου.

Οι βασικές κατηγορίες των θαλασσινών είναι τα μαλάκια, τα καρκινοειδή, τα εχινόδερμα, τα κνιδόζωα και τα ψάρια.

Τα μαλάκια είναι ασπόνδυλα ζώα αμφίπλευρης συμμετρίας με ή χωρίς κεφαλή τα οποία συνήθως περικλείονται πλήρως ή μερικώς σε κέλυφος ανθρακικού ασβεστίου (Pallardy, 2016). Το κέλυφος εκκρίνεται από αδενικό στρώμα μανδύα (επιδερμίδα) και μπορεί να είναι είτε εξωτερικό (δίθυρα, ορισμένα γαστερόποδα) είτε εσωτερικό (σουπιές, καλαμάρια, θράψαλα) είτε να απουσιάζει εντελώς (γυμνοβράγχια γαστερόποδα, χταπόδια) (Δ. Κουτσούμπας, n.d.). Μαζί με τα έντομα και τα σπονδυλωτά, τα μαλάκια αποτελούν το πολυπληθέστερο φύλο του ζωικού βασιλείου, με σχεδόν 100.000 (πιθανώς και 150.000) περιγραφόμενα είδη (Pallardy, 2016). Είναι ζώα με μαλακό σώμα τα οποία ζουν στην ξηρά (γαστερόποδα), στα γλυκά νερά (γαστερόποδα, δίθυρα) και πολλά από αυτά στη θάλασσα. (Δ. Κουτσούμπας, n.d.)

Οι κύριες κλάσεις των μαλακίων είναι τα:

- κεφαλόποδα (χταπόδια, σουπιές, καλαμάρια, θράψαλα)
- δίθυρα μαλάκια/ ελασματοβράγχια (μύδια, στρείδια, χτένια, γυαλιστερές)
- μονόθυρα μαλάκια/ γαστερόποδα (κοχλίες, πεταλίδες).

Τα καρκινοειδή είναι υδρόβια αρθρόποδα με βραγχιακή αναπνοή (Αναγνωστόπουλος, 2016). Το σώμα των περισσότερων καρκινοειδών διαχωρίζεται σε κεφαλή, θώρακα και κοιλιά. Σε πληθώρα όμως καρκινοειδών, όπως η караβίδα κ.ά., η κεφαλή και ο θώρακας ενώνονται, διαμορφώνοντας τον κεφαλοθώρακα (Πλαστήρας, 2016). Εξωτερικά τα καρκινοειδή προστατεύονται από σκληρό κέλυφος που δημιουργείται από χιτίνη η οποία παράγεται από την επιδερμίδα και εμποτίζεται με άλατα ανθρακικού και φωσφορικού ασβεστίου που συμβάλλουν στη σκληρότητα και ακαμψία του (Αναγνωστόπουλος, 2016).

Τα καρκινοειδή περιλαμβάνουν δύο ομάδες:

A) Εντομόστρακα

B) Μαλακόστρακα.

Από εμπορική και τεχνολογική άποψη ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μαλακόστρακα που ανήκουν στην τάξη των δεκάποδων τα οποία διακρίνονται σε μακρόουρα (καραβίδες, αστακοί, γαρίδες) και βραχύουρα (καβούρια) (Λαζαρίδου, 2018).

Τα εχινόδερμα είναι ένα από τα Φύλα των Ασπόνδυλων στο οποίο περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, ορισμένα είδη όπως οι αστερίες, οι αχινοί και τα ολοθούρια (αγγούρια της θάλασσας). Το σώμα τους εμφανίζει ακτινωτή συμμετρία και παρουσιάζει μια σειρά αγκαθιών και εξογκωμάτων που τους προσδίδει μια αγκαθωτή εμφάνιση, δικαιολογώντας το όνομά τους - εχινόδερμα (ακανθώδες δέρμα). Όλα τα εχινόδερμα χαρακτηρίζονται από έναν ασβεστολιθικό δερμοσκελετό ο οποίος αποτελείται από ενωμένες πλάκες και βρίσκεται εσωτερικά των ιστών. (Δ. Κουτσούμπας, n.d.)

Τα κνιδόζωα είναι τα κατώτερα εξελικτικά από τα Ευμετάζωα και εμφανίζουν επίπεδο οργάνωσης ιστών. Παρουσιάζουν ακτινωτή συμμετρία και διαθέτουν ένα εξειδικευμένο τύπο κυττάρων τα κνιδοκύτταρα ή νηματοκύστες. Διαθέτουν την δυνατότητα εμφάνισης με 2 μορφές είτε ως πολύποδες (ασκοειδές προσκολλημένο στάδιο) είτε ως μέδουσες. Οι πολυπληθέστερες ομάδες κνιδόζωων είναι τα ανθόζωα τα οποία ζουν είτε μεμονωμένα (ανεμώνες) είτε σε αποικίες (κοράλλια) και τα σκυφόζωα (μέδουσες) που μπορούν, λόγω της μερικής ικανότητας κολύμβησης που διαθέτουν, να εξαπλωθούν σε όλες τις θάλασσες. (Δ. Κουτσούμπας, n.d.)

Τα ψάρια είναι υδρόβια σπονδυλωτά ζώα, τα οποία αποτελούν τη δεύτερη κατά σειρά ομοταξία των σπονδυλωτών και εμφανίζουν τεράστια ποικιλία ανατομικών και φυσιολογικών χαρακτήρων. Διαθέτουν πτερύγια στηριζόμενα σε ακτίνες και αναπνέουν με βράγχια, τα οποία διατάσσονται κατά μήκος σχισμών του φάρυγγα που επιτρέπουν την επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον. Το σώμα τους παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία και περιβάλλεται από δέρμα το οποίο φέρει βλεννογόνους αδένες και ιριδοφόρα κύτταρα. Στα περισσότερα είδη το δέρμα καλύπτεται από λέπια, ενώ σε κάποια προστατεύεται από βλέννα. Τα ψάρια ταξινομούνται σε τρεις κλάσεις: Άγναθα, Χονδριχθύες και Οστεϊχθύες. Η κλάση των οστεϊχθύων περιλαμβάνει τα περισσότερα και πλέον εξελιγμένα ψάρια με οστέινο σκελετό. Τα ψάρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σύμφωνα με το σχήμα τους σε στρογγυλά, επίπεδα, χέλια κοκ ή ανάλογα με την εμφάνιση τους στα βάθη του ωκεανού σε πελαγικά, βενθικά κλπ. Τέλος, μπορούν επίσης να ομαδοποιηθούν ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε λιπαρά σε άπαχα (<1% λίπος), ημιλιπαρά (1-10% λίπος) και λιπαρά ψάρια (>10% λίπος).

1.2 Σύσταση και Θρεπτική Αξία

Τα θαλασσινά αποτελούν βασικό συστατικό μιας ισορροπημένης διατροφής καθώς έχουν υψηλή θρεπτική αξία και παρέχουν πολλά οφέλη στην υγεία. Τα ψάρια και τα οστρακοειδή είναι σχετικά χαμηλά σε κορεσμένα λιπαρά και χοληστερόλη και πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πρωτεΐνη, βιταμίνες και μέταλλα. Επίσης, θεωρείται ότι αποδίδουν λιγότερες θερμίδες σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, όπως το κρέας και τα πουλερικά (Liu and Ralston, 2021). Τα περισσότερα άπαχα ψάρια, όπως ο μπακαλιάρος και η γλώσσα περιέχουν λιγότερες από 100 θερμίδες ανά μαγειρεμένη μερίδα (3 ounce/85g), ενώ ακόμα και τα πιο λιπαρά ψάρια, όπως το σκουμπρί, η ρέγκα και ο σολομός περιέχουν περίπου 200 θερμίδες ή και λιγότερες ανά μαγειρεμένη μερίδα (3 ounce/85g). (“Seafood Nutrition Overview,” n.d.) Έτσι, τα θαλασσινά συνιστούν καλή επιλογή και για άτομα που ακολουθούν διατροφή με στόχο την απώλεια βάρους. Τέλος, μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση θαλασσινών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιακής προσβολής, εγκεφαλικού επεισοδίου, παχυσαρκίας και υπέρτασης (Hosom et al., 2012).

Η σύσταση τους αναλυτικότερα περιλαμβάνει:

Πρωτεΐνες Τα θαλασσινά περιέχουν άπαχη πρωτεΐνη υψηλής βιολογικής αξίας, που περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Επίσης, η πρωτεΐνη των θαλασσινών είναι πιο εύπεπτη από εκείνη του κόκκινου κρέατος και των πουλερικών, επειδή έχει λιγότερο συνδετικό ιστό (Jayasekara et al., 2020). Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι μια μερίδα (3 ounce/85g) θαλασσινών καλύπτει σχεδόν κατά το ήμισυ τις ημερήσιες συνιστώμενες ανάγκες ενός μέσου ενήλικα σε πρωτεΐνη. (Reames, 2012)

Λιπαρά Τα θαλασσινά θεωρούνται χαμηλά σε ολικά και κορεσμένα λιπαρά οξέα. Παράλληλα είναι πλούσια σε πολυακόρεστα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μακριάς αλύσου, τα οποία έχουν πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και του αμφιβληστροειδούς (Liu and Ralston, 2021). Τα σημαντικότερα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα στα θαλασσινά είναι το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Σύμφωνα με έρευνες, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα συμβάλλουν στην μείωση της αρτηριακής πίεσης και την βελτίωση της καρδιαγγειακής λειτουργίας, ελαττώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και επιβραδύνουν τον ρυθμό ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας (Dong, 2009). Ιδιαίτερα πλούσια σε λιπαρά οξέα είναι τα λιπαρά ψάρια, όπως ο σολομός, η σαρδέλα, η πέστροφα και το σκουμπρί, ενώ τα θαλασσινά των ιχθυοκαλλιέργειών έχουν ίση ή και

μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα από εκείνα που αλιεύονται. (Reames, 2012)

Βιταμίνες και μέταλλα

Το κρέας των θαλασσινών είναι επίσης πλούσιο σε βιταμίνες και μέταλλα. Συγκεκριμένα, είναι πλούσιο σε νιασίνη, φολικό οξύ, βιταμίνη B6, βιταμίνη B12 (σημαντική για τη νευρική λειτουργία), βιταμίνη E, θειαμίνη και ριβοφλαβίνη (Reames, 2012). Τα λιπαρά ψάρια περιέχουν επιπλέον σημαντικές ποσότητες βιταμινών A και D, ενώ κονσερβοποιημένα ψάρια, όπως ο σολομός και οι σαρδέλες, που διαθέτουν κόκαλα τα οποία μαλακώνουν κατά τη διαδικασία κονσερβοποίησης, μπορούν να αποτελέσουν καλή πηγή ασβεστίου και σιδήρου (Liu and Ralston, 2021).

Τα περισσότερα θαλασσινά αποτελούν εξαιρετικές πηγές ψευδαργύρου, φωσφόρου, μαγνησίου, σιδήρου, χαλκού, σεληνίου και χρωμίου. Το χρώμιο συνεργάζεται με την ινσουλίνη στον μεταβολισμό της γλυκόζης βοηθώντας τον οργανισμό να διατηρηθεί σε «ευ γλυκαιμία». Επίσης, βοηθά στην αύξηση των επιπέδων της HDL (καλή χοληστερόλη), η οποία μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου.

Ο χαλκός είναι επίσης ένα απαραίτητο μέταλλο στη διατροφή, επειδή συμβάλλει στο σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης και του κολλαγόνου. Αποτελεί μέρος διαφόρων ενζυμικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αποτρέπουν την οξειδωτική βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών (Dong, 2009).

Ο ψευδάργυρος βοηθά στην ανοσολογική λειτουργία και είναι απαραίτητος για την επούλωση πληγών, την ανάπτυξη των οστών και την αποθήκευση/απελευθέρωση της ινσουλίνης (Dong, 2009).

Ο σίδηρος είναι το βασικό μέταλλο στο μόριο της αίμης της αιμοσφαιρίνης. Η αιμοσφαιρίνη αποτελεί την βασική πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μεταφέρει το οξυγόνο στην κυκλοφορία του αίματος. Αρκετά είδη οστρακοειδών είναι πλούσιες πηγές σιδήρου. Για παράδειγμα, τα μύδια περιέχουν αρκετό σίδηρο σε 100 γραμμάρια ικανό να καλύψει περίπου το 78% της ημερήσιας συνιστώμενης πρόσληψης ενός ενήλικα 19-50 ετών (Dong, 2009).

Πίνακας 1.2.1 ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ

(μέγεθος μερίδας 3 ounces ≈ 85g)

Πηγή: E.Reames, 2012

Selected nutrients in seafood and other protein food sources.

	Calories	Protein (g)	Carbohydrate (g)	Fat (g)	Saturated fat (g)	Omega-3 EPA (g)	Omega-3 DHA (g)	Cholesterol (mg)	Sodium (mg)
Finfish									
Salmon, Atlantic, farm-raised, cooked	175	18.79		10.50	2.128	0.587	1.238	54	52
Salmon, Atlantic, wild-caught, cooked	155	21.62		6.91	1.068	0.349	1.215	60	48
Tilapia, cooked (3.5 oz)	128	26.15		2.65	0.94	0.005	0.130	57	56
Trout, rainbow, farm-raised, cooked	143	20.23		6.27	1.403	0.220	0.524	60	52
Trout, rainbow, wild-caught, cooked	128	19.48		4.95	1.376	0.398	0.442	59	48
Tuna, light, canned in water	99	21.68	0	0.7	0.199	0.04	0.19	26	287 (w/o salt = 42)
Tuna, yellow-fin, cooked	110	24.78	0	0.5	0.174	0.013	0.089	40	46
Bass, striped, cooked	105	19.32	0	2.54	0.552	0.184	0.637	88	75
Catfish, farm-raised, cooked	122	15.67	0	6.11	1.348	0.017	0.059	56	101
Catfish, wild-caught, cooked	89	15.7		2.42	0.632	0.085	0.116	61	42
Flatfish (flounder and sole), cooked	73	12.95		2.01	0.461	0.029	0.122	48	309
Crustaceans									
Shrimp, mixed species, cooked (moist heat)	101	19.36		1.45	0.163	0.043	0.044	179	805
Crab, Blue, cooked	71	15.20		0.63	0.171	0.086	0.057	82	336
Crawfish, farm-raised, cooked	74	14.89		1.10	0.184	0.105	0.032	116	82
Crawfish, wild-caught, cooked	70	14.25		1.02	0.154	0.101	0.040	113	80
Mollusks									
Oysters, eastern, farm-raised, cooked	67	5.95	6.19	1.80	0.581	0.195	0.179	32	139
Oysters, eastern, wild-caught, cooked	67	7.54	3.60	2.25	0.626	0.233	0.178	53	112
Oysters, eastern, farm-raised, raw	50	4.44	4.70	1.32	0.377	0.160	0.173	21	151
Oysters, eastern, wild-caught, raw	51	5.71	2.72	1.71	0.474	0.010	0.136	40	85
Clams, mixed species, cooked	126	21.72	4.36	1.66	0.160	0.117	0.124	57	95
Mussels, blue, cooked	146	20.23	6.28	3.81	0.723	0.235	0.430	48	314

1.3 Αλλοίωση των θαλασσινών

Τα θαλασσινά παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευπάθεια σε αλλοιώσεις συγκρινόμενα με άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας και τα πουλερικά. Αυτό οφείλεται σε μια σειρά παραγόντων που σχετίζονται με την ποικιλόθερμη φύση τους και τη χημική τους σύσταση. Η ποικιλόθερμη φύση των ιχθυηρών δίνει τη δυνατότητα σε βακτήρια με ευρύ φάσμα θερμοκρασιών να αναπτυχθούν (Λουγκοβόης, 2021).

Η σάρκα των θαλασσινών, ιδίως των καρκινοειδών, είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές αζωτούχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως τα ελεύθερα αμινοξέα και τα νουκλεοτίδια και σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητα της σε υγρασία αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Gram & Huss, 1996). Η βακτηριακή αποικοδόμηση των θειούχων αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την αλλοίωση καθότι προκαλεί δυσάρεστες οσμές και γεύσεις εξαιτίας του σχηματισμού υδροθείου και μεθυλομερκαπτάνης αντίστοιχα (Françoise and Jacques, 2011).

Λόγω της ψυχρόαιμης φύσης τους, τα θαλασσινά προσβάλλονται κυρίως από ψυχρότροφα Gram αρνητικά βακτήρια, η ανάπτυξη των οποίων δεν αναστέλλεται στους 0°C (θερμοκρασία τηκόμενου πάγου) (Λουγκοβόης, 2021).

Επιπλέον, η μεταθανάτια γλυκόλυση στα θαλασσινά είναι αρκετά περιορισμένη λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας τους σε υδατάνθρακες (<0,5%) και του παρατεταμένου προθανάτιου stress. Έτσι, μειώνεται αισθητά η παραγωγή γαλακτικού οξέος και το τελικό pH των ιστών είναι αρκετά υψηλό ($\text{pH} \geq 6.0$), επιτρέποντας την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών. (Gram & Huss, 1996)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το κρέας των θαλασσινών χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία είναι επιρρεπή σε οξειδωτικές και υδρολυτικές μεταβολές.

Τέλος, η ύπαρξη του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) στη σάρκα πολλών ιχθυηρών επιτρέπει την ανάπτυξη προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών με αναερόβια αναπνοή (απουσία οξυγόνου) χρησιμοποιώντας το ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων (Gram, 2009). Βακτήρια όπως τα *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Shewanella* spp. και *Photobacterium phosphoreum* μπορούν να ανάγουν το άοσμο οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA), προσδίδοντας μια δυσάρεστη οσμή αμινών στο προϊόν (Gram, 2009). Παρότι το TMAO σχετίζεται κυρίως με θαλάσσια είδη, μπορεί να βρεθεί και σε ορισμένα ψάρια του γλυκού νερού όπως η Πέρκα του Νείλου και η Τιλάπια της λίμνης Βικτωρίας (Λουγκοβόης, 2021).

2. Μικροοργανισμοί στα μαλάκια

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα θαλασσινά είναι μια ομάδα με τεράστια ποικιλομορφία ειδών τα οποία αλλοιώνονται από πληθώρα μικροοργανισμών. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται σε μια εξαιρετικά ευπαθή κατηγορία θαλασσινών, τα μαλάκια.

2.1 Γενικά στοιχεία για τα βακτήρια

Τα βακτήρια είναι οι συχνότεροι και πιο επικίνδυνοι βιολογικοί παράγοντες που συναντώνται στα τρόφιμα, προκαλώντας μεγάλη ανησυχία στην παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων. Πρόκειται για μονοκύτταρους, προκαρυωτικούς οργανισμούς που βρίσκονται στο περιβάλλον σε δύο μορφές : τη βλαστική μορφή και τη μορφή σπορίων. Το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό (κόκκοι), ραβδόμορφο ή σπειροειδές. Η βλαστική μορφή των βακτηρίων αναπαράγεται μέσω της διαίρεσης. Τα σπόρια δεν έχουν την ικανότητα της αναπαραγωγής αλλά αποτελούν το μέσο επιβίωσης των βακτηρίων όταν βρίσκονται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Μόλις οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές για την ανάπτυξη και την επιβίωση των βακτηρίων, τα σπόρια βλαστάνουν και σχηματίζουν τις βλαστικές μορφές (Παπαδοπούλου, 2014)

Τα βακτήρια μπορούν να καταταχθούν σε κατηγορίες ανάλογα με τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξής τους και με τη δράση τους στα τρόφιμα που προσβάλλουν.

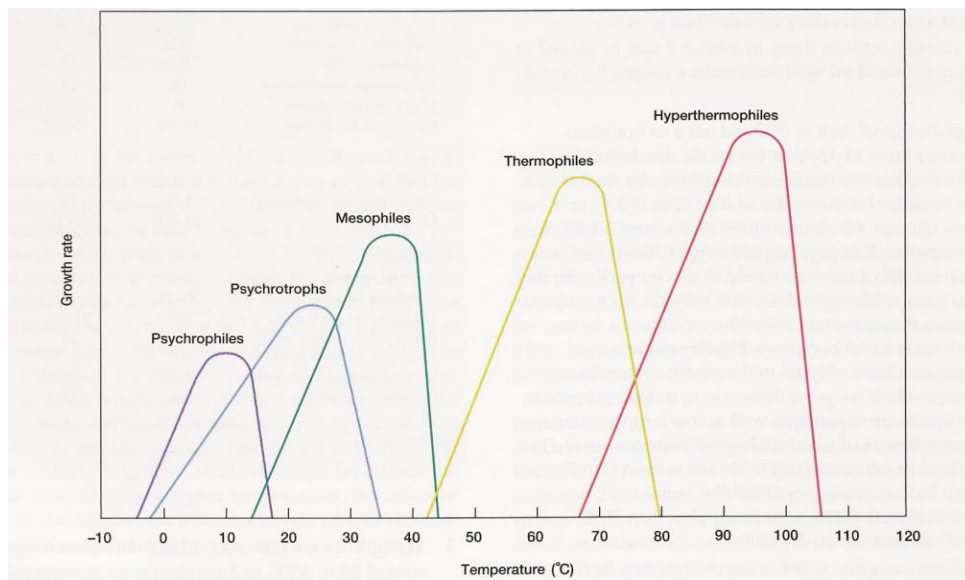
1) Απαιτήσεις σε θερμοκρασία

α. **Ψυχρόφιλα:** αναπτύσσονται από τους -5 έως 20°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 10°C. Έχουν μεγάλη σημασία στην ασφάλεια τροφίμων καθώς αναπτύσσονται τόσο σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος όσο και σε θερμοκρασίες ψύξης.

β. **Ψυχρότροφα:** αναπτύσσονται από τους -5 έως 30-35°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 25 - 30°C. Τα ψυχρότροφα βακτήρια αναπτύσσονται και αυτά σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως τα ψυχρόφιλα αλλά η αντοχή τους σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών τα καθιστά πιο επικίνδυνα για τα τρόφιμα.

γ. **Μεσόφιλα:** αναπτύσσονται από τους 10 έως τους 45°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30 – 40 °C. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα περισσότερα παθογόνα αλλά και αρκετά αλλοιογόνα βακτήρια.

δ. **Θερμόφιλα:** αναπτύσσονται σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες εύρους 45 - 60°C (πολλά και σε μεγαλύτερες των 60°C) και προκαλούν κυρίως αλλοιώσεις στα τρόφιμα.



Εικόνα 2.1 Θερμοκρασιακό εύρος βακτηριακής ανάπτυξης. Πηγή: (Γιαβάσης, 2023.)

2) Απαιτήσεις σε οξυγόνο

α. **Υποχρεωτικά αερόβια** (21% οξυγόνο) : τα βακτήρια αυτά μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν μόνο παρουσία ατμοσφαιρικού αέρα (π.χ. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*).

β. **Υποχρεωτικά αναερόβια** (0% οξυγόνο) : το οξυγόνο είναι τοξικό για αυτά οπότε χρειάζονται πλήρη έλλειψη του για να αναπτυχθούν. Τα βακτήρια αυτά συνήθως ευδοκιμούν σε τρόφιμα συσκευασμένα σε κενό αέρος ή κονσέρβες στις οποίες δεν υπάρχει οξυγόνο (π.χ. βακτήρια του γένους *Clostridium*).

γ. **Προαιρετικά αναερόβια** (0-21% οξυγόνο) : μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα περισσότερα παθογόνα που βρίσκονται στα τρόφιμα όπως τα γένη *Vibrio* και *Aeromonas* spp.

δ. **Μικροαερόφιλα** (3-6% οξυγόνο) : τα βακτήρια αυτά χρειάζονται πολύ μικρές ποσότητες οξυγόνου για την ανάπτυξη και την επιβίωση τους.

3) Δράση τους στα τρόφιμα

α. **Ωφέλιμοι** : αναπτύσσονται στα τρόφιμα παράγοντας χρήσιμες ουσίες (κυρίως με ζύμωση) οι οποίες βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (πχ. *Lactobacillus* spp).

β. **Αλλοιογόνοι** : αλλοιώνουν την ποιότητα των τροφίμων, διασπώντας τα διάφορα συστατικά τους και παράγοντας προϊόντα που μεταβάλλουν την εμφάνιση, γεύση και οσμή τους. Ωστόσο

οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν αποτελούν άμεσα κίνδυνο για την υγεία. (π.χ. *Shewanella*, *Moraxella*, *Psychrobacter*).

γ. **Παθογόνοι** : τα βακτήρια αυτά περιέχονται στα τρόφιμα και όταν καταναλωθούν προκαλούν νόσο στον άνθρωπο (π.χ. *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria*) (Μπατρίνου, 2012).

2.2 Αρχική μικροχλωρίδα

Το επίπεδο και το είδος της αρχικής μικροχλωρίδας των μαλακίων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως το περιβάλλον συγκομιδής/αλίευσης τους, τη διατροφή τους, τη γεωγραφία της περιοχής στην οποία καλλιεργούνται, την εποχή, την θερμοκρασία και την ποιότητα των υδάτων στα οποία διαβιώνουν. (Ward and Hackney, 1991) (Κοντοτόλης, 2016)

Τα βακτήρια που απομονώνονται από τα νερά του ανοιχτού ωκεανού απαιτούν για την ανάπτυξή τους το αλάτι, αναπτύσσονται καλύτερα σε χαμηλή θερμοκρασία και είναι ευπροσάρμοστα γενικότερα στις χαμηλές συγκεντρώσεις των οργανικών και αζωτούχων ενώσεων. Ο επιστημονικός όρος «Ολιγοτροφικά ψυχρόφιλα με απαίτηση σε χλωριούχο νάτριο» είναι αντιπροσωπευτικός της κατηγορίας αυτής των μικροοργανισμών. (Μπεζιρτζόγλου, 2004)

Τα δίθυρα μαλάκια κατά τη συγκομιδή τους εμφανίζουν ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) $10^3 - 10^5$ βακτήρια/g. Τα επίπεδα αυτά είναι συνήθως 1-2 λογαριθμικές μονάδες μεγαλύτερα από τους αριθμούς που βρίσκονται στο νερό από το οποίο αλιεύονται (Vasconcelos, 1969). Τα ζώα αυτά είναι διηθηματοφάγα και διοχετεύουν μεγάλους όγκους νερού από τα βράγχια τους για να αποκτήσουν οξυγόνο και τροφή. Εντούτοις μαζί με το νερό τα δίθυρα μαλάκια διηθούν και μικροοργανισμούς που περιέχονται σε αυτό οι οποίοι παγιδεύονται στη βλέννα των βράγχιων και μεταφέρονται προς το στόμα με τη δράση των βλεφαρίδων (Ward and Hackney, 1991). Έτσι τα δίθυρα συγκεντρώνουν στο εσωτερικό τους και κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να παραμείνουν ζωντανοί για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να βλάπτουν τα ίδια τα ζώα (Desenclos, 1991).

Η φυσική μικροχλωρίδα των δίθυρων περιλαμβάνει τόσο μικροοργανισμούς ξενιστές των ζώων (ενδογενής μικροχλωρίδα) όσο και μικροοργανισμούς που φιλτράρονται από το νερό και προσλαμβάνονται ως τροφή (εξωγενής μικροχλωρίδα). Ο αριθμός και τα είδη των μικροοργανισμών που περιέχονται στο νερό εξαρτώνται από την αλατότητα, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και το επίπεδο μόλυνσης του νερού (Ward & Hackney, 1991).

Η εξωγενής μικροχλωρίδα μπορεί να προέλθει επίσης από την επιμόλυνση των μαλακίων με μικροοργανισμούς του χερσαίου περιβάλλοντος μετά την αλίευση τους. Η επιμόλυνση συμβαίνει κυρίως λόγω λανθασμένων μετασυλλεκτικών χειρισμών του προϊόντος μέσω των επιφανειών επαφής, σκευών αποθήκευσης και εργαζομένων (Boziaris and Parlapani, 2017).

Η μικροχλωρίδα των δίθυρων κατά τη συγκομιδή αποτελείται κυρίως από Gram αρνητικούς βακίλους των γενών *Pseudomonas* και *Vibrio*, ενώ περιστασιακή αύξηση εμφανίζουν και είδη της ομάδας *Flavobacterium/Cytophaga* σε στρείδια της Ανατολής και του Ειρηνικού ωκεανού, αντιπροσωπεύοντας το 30% της μικροχλωρίδας (Ward and Hackney, 1991).

2.3 Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (EAM)

Μετά την συγκομιδή, μόνο ένα μικρό μέρος της αρχικής μικροχλωρίδας επιβιώνει υπό τις εκάστοτε συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα) και τεχνικές επεξεργασίας (αλάτισμα, οξίνιση, θερμικές επεξεργασίες, κάπνισμα κλπ.). Το κλάσμα αυτό αναπτύσσεται ταχύτερα από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και γίνεται η κυρίαρχη αλλοιογόνος μικροχλωρίδα (Gram & Huss, 1996).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM) προκαλούν αλλοίωση στο προϊόν παράγοντας μεταβολίτες που ευθύνονται για την δημιουργία δυσάρεστων οσμών και γεύσεων. Έτσι το προϊόν οδηγείται τελικά στην οργανοληπτική απόρριψη όταν οι πληθυσμοί φτάνουν σε υψηλά επίπεδα των τάξεων 10^7 - 10^9 cfu/g για ακατέργαστα θαλασσινά και 10^5 - 10^7 cfu/g για καρκινοειδή και θαλασσινά που υφίστανται αλλοίωση από μικροβιακή και χημική δραστηριότητα (Parlapani, 2021).

Η κυτταρική συγκέντρωση των EAM κατά την απόρριψη χαρακτηρίζεται ως ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που αντιστοιχεί στην αλλοίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικειμενικός δείκτης χημικής αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Dalgaard, 1993) (Veld, 1996). Ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσουν οι EAM το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, το οποίο συμπίπτει με την συγκέντρωση των μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν οργανοληπτική απόρριψη καθορίζει την διάρκεια ζωής των προϊόντων. Έτσι για διαφορετικά είδη θαλασσινών και συνδυασμούς συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης ισχύουν και διαφορετικά ελάχιστα επίπεδα αλλοίωσης και CSI (Boziaris and Parlapani, 2017).

Οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι πιθανό να ανήκουν σε ένα μοναδικό γένος ή είδος σε αντίθεση με την υπόλοιπη αλλοιογόνο μικροχλωρίδα που μπορεί να αποτελείται από παραπάνω από μία μικροβιακές οικογένειες, γένη ή είδη (Dalgaard, 2003).

Η επικράτηση των ΕΑΜ δεν είναι σταθερή αλλά καθορίζεται κάθε φορά από διαφορετικούς παράγοντες κατά την αλυσίδα παραγωγής, όπως η επεξεργασία, η μεταφορά και η συντήρηση του προϊόντος. Οι μικροοργανισμοί που τελικά θα κυριαρχήσουν, είναι εκείνοι που διαθέτουν τις κατάλληλες στρατηγικές και μεθόδους προσαρμογής στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου (Κοντοτόλης, 2016).

Η ανάδειξη της κυρίαρχης αλλοιογόνου μικροχλωρίδας και των ΕΑΜ εξαρτάται από την σύνθεση της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας (η οποία σχετίζεται με την προέλευση των ψαριών και τη μόλυνση μετά την αλίευση), τα μέτρα συντήρησης που εφαρμόζονται και τις συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και ατμόσφαιρας κατά την διανομή και αποθήκευση. Ορισμένοι ακόμα παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή των ΕΑΜ είναι το υπόστρωμα και η σύσταση αυτού καθώς και οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλλοιογόνων βακτηρίων. (Boziaris and Parlapani, 2017)

Στα θαλασσινά τα κυριότερα γένη ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών είναι τα *Photobacterium*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* και *LAB* (Parlapani, 2021). Στα μαλάκια των εύκρατων θαλασσών που αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες και σε χαμηλές θερμοκρασίες οι βασικοί ΕΑΜ είναι οι *Shewanella putrefaciens* και *Pseudomonas* spp. (Gram and Huss, 1996).

2.4 Μικροβιακή Αλλοίωση

Αλλοίωση τροφίμων ορίζεται ως η υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, της θρεπτικής αξίας, της δομής και της χημικής και μικροβιολογικής τους ποιότητας καθιστώντας τα μη αποδεκτά για κατανάλωση (Veld, 1996). Τα αλλοιωμένα τρόφιμα δεν συνιστούν άμεσα κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή αλλά αυξάνουν σημαντικά την πιθανότητα τροφολοίμωξης μειώνοντας την εμπορική τους αξία.

Τα περισσότερα ιχθυηρά αλιεύονται σε περιοχές αρκετά μακριά από τους λιμένες εκφόρτωσής τους. Έτσι, δυνητικά λανθασμένες πρακτικές και ακατάλληλοι χειρισμοί κατά την αλίευση και την προσωρινή αποθήκευσή τους στο σκάφος, αλλά και στην επακόλουθη συντήρησή τους μπορεί να προκαλέσουν φθορά και υποβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων πριν ακόμα φτάσουν στο σημείο πώλησης (Ashie et al., 1996).

Τα θαλασσινά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευπάθεια από άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως χοιρινό, βοδινό και κοτόπουλο κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ευαίσθητες πρωτεΐνες και λίπη (Λαζαρίδου, 2018). Για το λόγο αυτό χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή κατά

την αποθήκευση. Οι σημαντικότεροι παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας των θαλασσινών είναι η μικροβιακή αλλοίωση (δράση μικροοργανισμών), οι αυτολυτικές διεργασίες (δράση ενδογενών ενζύμων) και οι βιοχημικές αντιδράσεις (οξειδωση – τάγγιση) (Gram and Huss, 1996).

Η αλλοίωση των εν λόγω τροφίμων γίνεται αντιληπτή μέσα από μεταβολές στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (όψη/εμφάνιση, γεύση, οσμή, υφή) και μπορεί να προκληθεί από ένζυμα, αφυδάτωση, οξειδωση, μόλυνση και φυσική φθορά (Gram and Huss, 1996). Όμως, η βασική αιτία αλλοίωσης των νωπών θαλασσινών είναι η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών που οδηγεί στο σχηματισμό αμινών, σουλφιδίων, αλκοολών, αλδεϋδών, κετονών και οργανικών οξέων. Οι ενώσεις αυτές ευθύνονται για την δημιουργία δυσάρεστης οσμής και γεύσης στο προϊόν ενώ μπορεί να προκαλέσουν αποχρωματισμό, παραγωγή βλέννας και εμφάνιση αποικιών (Πλαστήρας, 2016) (Πίνακας 2.4.1). Η μικροβιακή αλλοίωση τροφίμων συνιστά ένα μείζον πρόβλημα καθώς περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής αλιευμάτων χάνεται λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Λαζαρίδου, 2018).

Πίνακας 2.4.1 Μικροβιακή Αλλοίωση Τροφίμων (Προσαρμοσμένο από Gram and Huss, 1996)	
Μικροβιακή δραστηριότητα	Οργανοληπτική Εκδήλωση
Αποικοδόμηση συστατικών του τροφίμου	Παραγωγή δυσάρεστων οσμών
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού υλικού	Σχηματισμός “βλέννας”
Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων	Μεγάλες ορατές έγχρωμες ή άχρωμες αποικίες
Διοξείδιο του άνθρακα CO ₂ από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίου
Παραγωγή διαχεόμενων χρωστικών	Αποχρωματισμός – Αλλαγή χρώματος

Η αλλοίωση στα μαλάκια δεν είναι ίδια με εκείνη των ψαριών και καρκινοειδών λόγω διαφορών στην χημική τους σύσταση. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα θαλασσινά, τα μαλάκια παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλό ολικό άζωτο. Τα μύδια και τα στρείδια, για παράδειγμα, περιέχουν υδατάνθρακες κυρίως με τη μορφή γλυκογόνου σε ποσοότητες 3,4% και 5,6% αντίστοιχα. Αυτό αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για αντιδράσεις ζύμωσης και ευνοεί την αλλοίωση από ζυμωτικούς μικροοργανισμούς. Τα μαλάκια περιέχουν

επίσης μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αζωτούχων βάσεων από τα ιχθυηρά όπως ελεύθερη αργινίνη, ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ (Bhure et al., 2022).

Από τις κύριες κλάσεις των μαλακίων, τα μύδια και τα χτένια παρουσιάζουν τα ίδια πρότυπα αλλοίωσης με τα στρείδια, σε αντίθεση με τα καλαμάρια που εμφανίζουν κάποιες διαφοροποιήσεις. Στη σάρκα των καλαμαριών, το ολικό πτητικό άζωτο αυξάνεται καθώς η αλλοίωση τους προσομοιάζει περισσότερο εκείνη των καρκινοειδών (Jay et al., 2005).

Εξαιτίας της υψηλής τους περιεκτικότητας σε γλυκογόνο, η αλλοίωση των μαλακίων είναι κυρίως γλυκολυτική και όχι πρωτεολυτική, οδηγώντας σε ραγδαία μείωση του pH. Το χαμηλό pH σε μετέπειτα στάδια αλλοίωσης μπορεί να ωφελήσει την ανάπτυξη μικροοργανισμών που ευδοκούν σε όξινες συνθήκες όπως οι εντερόκοκκοι, οι λακτοβάκιλλοι και οι ζύμες (Kijewska et al., 2023).

Η σταθερή αυτή πτώση του pH χρησιμεύει ως δείκτης του βαθμού αλλοίωσης. Η παρακάτω κλίμακα pH χρησιμοποιείται από αρκετούς ερευνητές ως βάση για την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας των οστρακοειδών: (Bhure et al., 2022; Κοτζεκίδου, 2016)

Πίνακας 2.4.2. Κλίμακα pH (Κοτζεκίδου, 2016)	
pH 6,2 – 5,9	Καλά
pH 5,8	Ακατάλληλα
pH 5,7 – 5,5	Αλλοιωμένα
pH < 5,2	Όξινα/αποσυντεθειμένα

2.5 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Μια εναλλακτική μέθοδος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η αξιολόγηση της αλλοιωγόνου ικανότητας των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολιτών που ευθύνονται για την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη. Οι μεταβολίτες αυτοί χρησιμοποιούνται ως χημικοί δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης (Πλαστήρας, 2016).

Για να μπορέσει ένας μεταβολίτης να θεωρηθεί δείκτης αλλοίωσης θα πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια (Jay et al., 2005) :

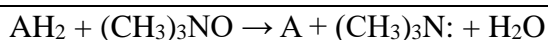
- Να αποτελεί προϊόν μεταβολισμού συγκεκριμένου μικροοργανισμού
- Να βρίσκεται αρχικά στο υπό εξέταση τρόφιμο σε μικρή ή μηδενική ποσότητα

- Να παρουσιάζει αυξανόμενη συγκέντρωση κατά τη διάρκεια της συντήρησης
- Να επηρεάζει κάποια οργανοληπτική ιδιότητα (γεύση, οσμή κτλ.)
- Να υπάρχει μια γρήγορη, εύχρηστη και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού του.

Οι βασικότεροι χημικοί δείκτες, με ευρεία χρήση στα αλιευτικά προϊόντα είναι το ολικό πτητικό άζωτο (TVB-N) και η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή το άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N) (Scherer et al., 2006) (Gram and Dalgaard, 2002).

Η τριμεθυλαμίνη είναι μια ισχυρά πτητική ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στη σάρκα αλλοιωμένων ιχθύων εντείνει την δυσάρεστη αμμωνιακή οσμή μαγαιάτικου ψαριού, υποδεικνύοντας την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου. Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα της ένωσης σε διεθνή πρότυπα καθορίζονται ως 5-10 mg/ 100g ιστού.

Η αρχική συγκέντρωση της τριμεθυλαμίνης στη σάρκα του ψαριού είναι χαμηλή αλλά αυξάνεται σταδιακά κατά τη συντήρηση σε πάγο εξαιτίας της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηρίων της αλλοιωγόνου χλωρίδας. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα των ψυχρότροφων βακτηρίων, που ευδοκιμούν σε χαμηλές θερμοκρασίες, ανάγουν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Λουγκοβόης and Κυρανά, 2019):



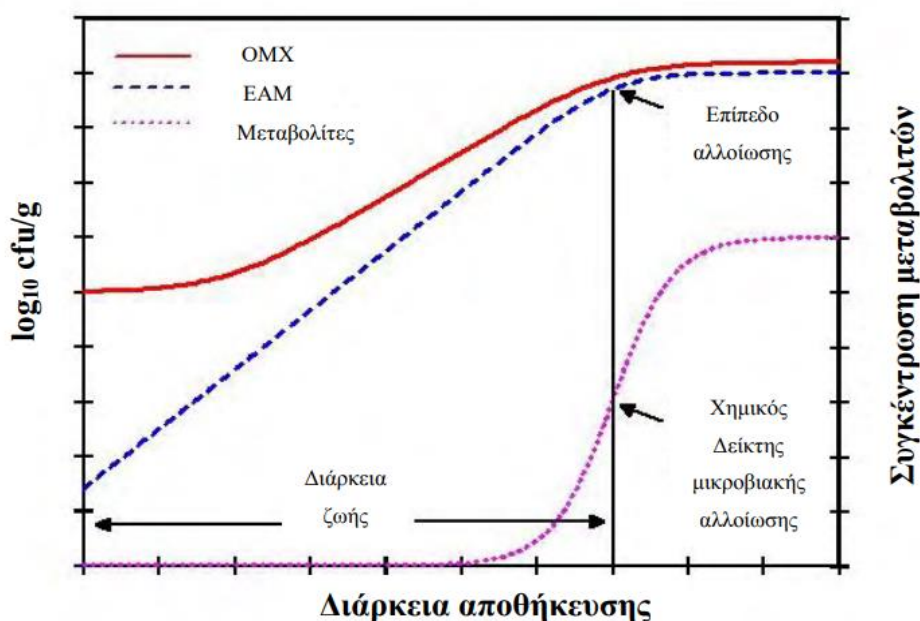
Αξίζει να σημειωθεί πως η αντίδραση εξελίσσεται ταχύτερα σε περιβάλλον μειωμένου οξυγόνου (συσκευασίες κενού, MAP) καθώς προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης ως αποδέκτη ηλεκτρονίων κατά την αναερόβια αναπνοή (Λουγκοβόης and Κυρανά, 2019). Βακτηριακά είδη όπως τα *Aeromonas* spp, *P. phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio* spp. και ψυχρότροφα στελέχη *Enterobacteriaceae* έχουν την ικανότητα αναγωγής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη (Gram and Dalgaard, 2002).

Το Ολικό Πτητικό Άζωτο (TVB-N) χρησιμοποιείται ως αξιόπιστος χημικός δείκτης αλλοίωσης στους ιχθύες και συνδέεται με διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση και η οσμή. Η μέτρηση του συμπεριλαμβάνει ενώσεις όπως τριμεθυλαμίνη, διμεθυλαμίνη σε μικρότερη αναλογία, μονομεθυλαμίνη, αμμωνία και άζωτο σε μικροποσότητες καθώς και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις που προέρχονται από την βακτηριακή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων (Gram and Huss, 1996). Η συγκέντρωση των παραπάνω ενώσεων εκφράζεται ως mg αζώτου (N) σε 100g σάρκας ψαριού. Το ολικό πτητικό άζωτο

ανιχνεύεται στα φρέσκα ιχθυηρά σε ποσότητες 5-20 mg N/ 100g σάρκας και αυξάνεται ραγδαία κατά την συντήρηση σε πάγο εξαιτίας της βακτηριακής αποικοδόμησης των ιστών και της συγκέντρωσης πτητικών αζωτούχων βάσεων (Λουγκοβόης and Κυρανά, 2019).

Όσον αφορά τα μαλάκια ωστόσο, το ολικό πτητικό άζωτο (TVBN) και η τριμεθυλαμίνη (TMA) δεν φαίνεται να αποτελούν τους πλέον αντιπροσωπευτικούς χημικούς δείκτες αλλοίωσης καθώς οι συγκεντρώσεις τους εμφανίζουν διακυμάνσεις κυρίως κοντά στη φάση απόρριψης του προϊόντος (Goulas and Kontominas, 2004). Ειδικότερα, το TVB - N και η TMA παράγονται από την αλλοιωγόνο χλωρίδα μεσογειακών δίθυρων μαλακίων μόνο στο τέλος

της χρονικής περιόδου αποθήκευσης (Manousaridis et al., 2004, Kirana et al., 1997, Koutsoumanis & Nychas 2000, Parlapani et al., 2016). Επομένως, οι παραπάνω δείκτες δεν χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της μικροβιακής φθοράς, καθώς αυτή είναι δύσκολο να ανιχνευθεί παρά μόνο στα τελευταία στάδια αποθήκευσης (Kirana et al., 1997, Castro et al., 2006).



Εικόνα 2.5.1 Μεταβολές στον Ολικό Μικροβιακό Πληθυσμό (OMX), στους Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς (EAM) και στους Χημικούς Δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης. Πηγή : (Βέρδος, 2014)

3. Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί στα μαλάκια

3.1 Γενικά

Όπως συμπεραίνεται και από τα προηγούμενα κεφάλαια, τα μαλάκια παρουσιάζουν εξαιρετικά αυξημένη ευπάθεια σε αλλοιώσεις, κυρίως λόγω της διαφορετικής χημικής τους σύστασης. Υφίστανται έτσι ταχεία επιδείνωση της ποιότητας και απώλεια της φρεσκάδας τους, τόσο από μικροβιακούς όσο και από βιοχημικούς μηχανισμούς.

Η παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών προκαλείται ως γνωστών από τη μικροβιακή ανάπτυξη και επιφέρει αλλαγές στην οσμή των προϊόντων αυτών (Gram and Huss, 1996).

Αυτό συμβαίνει επειδή οι μικροοργανισμοί, στην αναζήτηση πηγών άνθρακα και ενέργειας, διασπούν τα βασικά μακροθρεπτικά συστατικά του τροφίμου (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες), μεταβολίζουν αμινοξέα και σάκχαρα ενώ παράλληλα παράγουν παραπροϊόντα όπως αλδεϋδες, κετόνες, οξέα, αμμωνία, υδρόθειο, βιογενείς αμίνες κ.α. (Χειμωνά, 2018). Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός των νωπών θαλασσινών περιλαμβάνει την αρχική μικροχλωρίδα του οργανισμού και τους μικροοργανισμούς που προέρχονται από επιμόλυνση (περιβάλλον, άνθρωπος) κατά τον χειρισμό του προϊόντος (Veld, 1996).

Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν από μόνοι τους να παράγουν δύσοσμους μεταβολίτες σε στείρα υποστρώματα θαλασσινών παρά μόνο όταν έχει προηγηθεί αποικοδόμηση του υποστρώματος από άλλα μέλη της αλλοιωγόνου χλωρίδας. Επομένως, το δυναμικό αλλοίωσης και η δραστηριότητα συγκεκριμένων στελεχών θα πρέπει σε κάποια προϊόντα να αξιολογούνται σε συνθήκες ανταγωνισμού ή συμβίωσης με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς του προϊόντος (Gram and Huss, 1996).

Σύμφωνα με πληθώρα ερευνητών, οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην αλλοίωση των θαλασσινών φαίνεται να αντικατοπτρίζουν την μικροβιακή χλωρίδα του περιβάλλοντος από το οποίο αυτά αλιεύονται. Ειδικότερα, ψάρια και οστρακοειδή προερχόμενα από θερμά νερά περιέχουν κυρίως Gram – θετικά μεσόφιλα βακτήρια του γένους *Micrococcus* και *Bacillus*. Αντιθέτως, στα θαλασσινά που αλιεύονται από ψυχρά νερά κυριαρχούν ψυχρόφιλα Gram – αρνητικά βακτήρια όπως τα *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* και *Vibrio* (Ashie et al., 1996). Ως εκ τούτου, αποδεικνύεται πως τα τροπικά οστρακόδερμα εμφανίζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από αυτή των ειδών εύκρατης προέλευσης όταν αποθηκεύονται σωστά σε πάγο, συγκεκριμένα έως και 16 ημέρες για τα τροπικά είδη συγκριτικά με 8-10 ημέρες για εύκρατα είδη (Cann, 1976). Τα ψυχρότροφα βακτήρια που ευθύνονται για τη μικροβιακή φθορά των θαλασσινών σε χαμηλές θερμοκρασίες ανιχνεύονται

σε μικρότερες ποσότητες στα μαλάκια τροπικών υδάτων απ' ό τι σε μαλάκια ψυχρών υδάτων κι έτσι ο ρυθμός αλλοίωσης των πρώτων μειώνεται σημαντικά, ειδικά όταν αποθηκεύονται σε πάγο ή παγωμένο νερό (Ashie et al., 1996).

Η μικροχλωρίδα των μαλακίων παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία από εκείνη των ιχθύων και σχετίζεται με διάφορους παράγοντες όπως η αλατότητα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, το μικροβιακό φορτίο και η θερμοκρασία του νερού. Επηρεάζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό από την διατροφή του οργανισμού, τις μεθόδους αλίευσης και τους τρόπους συντήρησης (Norhana et al., 2010).

Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθυηρών προσδιορίζεται ποσοτικά και ποιοτικά μέσω φαινοτυπικών δοκιμών έπειτα από καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα και απομόνωση επιλεγμένων αποικιών (Κοντοτόλης, 2016). Κατά την αλλοίωση αποκελυφωμένων μαλακίων, οι βακτηριακοί πληθυσμοί αυξάνονται σε επίπεδα της τάξης 10^7 cfu/g και παραπάνω. Στην μικροχλωρίδα αρχικά κυριαρχούν Gram – αρνητικά πρωτεολυτικά βακτήρια όπως *Pseudomonas* και *Vibrio* spp. καθώς και σακγαρολυτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus* spp. Τα τελευταία αναπτύσσονται διασπώντας το γλυκογόνο των ιστών , που βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στα μαλάκια, σε διάφορα οργανικά οξέα και συνιστούν ανταγωνιστικά στελέχη της αλλοιωγόνου χλωρίδας (Roberts et al., 2005). Κατά την εξέλιξη της αλλοίωσης, επικρατούν τα βακτήρια *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens* και *Acinetobacter-Moraxella*, ενώ οι εντερόκοκκοι, οι λακτοβάκιλλοι και οι ζύμες κυριαρχούν στο τελικό στάδιο της διεργασίας (Jay et al., 2005). Στην αλλοίωση συμμετέχουν επίσης και τα είδη *Aeromonas* και *Psychrobacter* αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα προαναφερθέντα βακτήρια (Ashie et al., 1996) (Gram and Huss, 1996)

Επιπλέον, βρέθηκε πως τα στελέχη *Psychromonas* και *Psychrobacter* αποτελούν τα επικρατέστερα βακτήρια αλλοίωσης σε ωμά στρείδια από τον Καναδά που συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης (Parlapani, 2021).

Πίνακας 3.1.1 Κατανομή μικροβιακής χλωρίδας φρέσκων στρειδιών του Ειρηνικού (Προσαρμοσμένο από Cao et al., 2009)				
Bacteria Groups	Raw Oysters (%)	Spoiled Pacific oysters (%)		
		10 °C	5°C	0°C
<i>Pseudomonas</i>	22	42	60	66
<i>Vibrionaceae</i>	20	18	22	18
<i>Shewanella</i>	5	-	-	-
<i>Alcaligenes</i>	6	2	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	11	1	-
<i>Moraxella</i>	7	6	7	7
<i>Acinetobacter</i>	2	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	8	8	3	5
<i>Total Gram-negative</i>	75	87	93	96
<i>Corynebacterium</i>	3	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	3	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	7	5	2	2
<i>Lactic acid bacteria</i>	6	4	1	-
<i>Bacillus</i>	2	2	-	1
<i>Total Gram-positive</i>	21	11	3	3
<i>Unidentified</i>	4	2	4	1
<i>Total</i>	100	100	100	100

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα έρευνας που διεξήχθη σε στρείδια του είδους *Crassostrea gigas*, τα οποία αλιεύτηκαν στην Κίτρινη Θάλασσα και μεταφέρθηκαν εντός πάγου μέχρι το εργαστήριο. Τα στρείδια αρχικά εμβυπτίστηκαν σε παγωμένο θαλασσινό νερό (5°C) με περιεκτικότητα σε άλας 3,5% για 30 λεπτά. Έπειτα αποφλοιώθηκαν, τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και διαχωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες με βάση τη θερμοκρασία αποθήκευσης (0°C, 5°C, 10°C). Από την ανάλυση των δειγμάτων μετά από 48 ώρες προέκυψε πως τα Gram – αρνητικά βακτήρια υπήρχαν σε μεγαλύτερα επίπεδα στα στρείδια υπό ψύξη απ’ ότι στα φρέσκα στρείδια. Τα *Pseudomonas* και *Shewanella* spp. φάνηκαν να αποτελούν τους επικρατέστερους μικροοργανισμούς κατά την διατήρηση σε πάγο. Παρόλα αυτά, στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης του προϊόντος δεν εντοπίστηκαν στελέχη της *Shewanella* spp. Οι αιτίες θα μπορούσαν να είναι ότι τα *Shewanella* spp. βρίσκονταν αρχικά σε μικρό ποσοστό στο δείγμα (5%) και η ανάπτυξη τους πιθανόν να παρεμποδίστηκε από τα *Pseudomonas* spp., χάριν στην ικανότητα τους να παράγουν σιδηροφόρα. (Cao et al., 2009; Κοντοτόλης, 2016).

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή των βασικότερων αλλοιογόνων βακτηρίων που εμφανίζονται στα μαλάκια.

3.2 Pseudomonas spp.



Εικόνα 3.2.1 Βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Πηγή <https://www.istockphoto.com>

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (pseu – do’mo – nas: σύνθετη λέξη από το ψευδής και μονάς) είναι αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα στελέχη που κινούνται με τη βοήθεια ενός ή περισσότερων πολικών μαστιγίων. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1-5mm μήκος και 0,5-1,0mm πλάτος (Iglewski., 1996).

Χαρακτηρίζονται κυρίως ως υποχρεωτικά αερόβια, όμως ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες παρουσία νιτρικών αλάτων (Iglewski., 1996). Τα περισσότερα στελέχη είναι ψυχρότροφα, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 26°C, και αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα αλλοιογόνων βακτηρίων σε νοπά τρόφιμα που συντηρούνται με ψύξη (Νύχας and Πανάγου, n.d.; Κοτζεκίδου, 2016). Μάλιστα, σύμφωνα με τους ερευνητές Shaw και Shewan (1968), πολλά είδη *Pseudomonas* φαίνεται να διατηρούν την αλλοιογόνο δραστηριότητα τους ακόμα και στους 3°C αλλά σε βραδύτερο ρυθμό (Jay et al., 2005).

Έπειτα από καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες με υπόστρωμα τριμεθυλαμίνης, βρέθηκε ότι τα *Pseudomonas* spp. δεν παράγουν H₂S και TMA αλλά σχηματίζουν γκριζο – γάλανες υδατοδιαλυτές χρωστικές (Κουτσουμάνης, 2000; Κοτζεκίδου, 2016). Δίνουν θετική δοκιμή καταλάσης και διαθέτουν οξειδωτικό και όχι ζυμωτικό μεταβολισμό ως προς τη διάσπαση της γλυκόζης. Παράλληλα, οι ψευδομονάδες αποτελούν πρωτεολυτικά ψυχρότροφα βακτήρια καθώς σε αερόβιες συνθήκες παράγουν πτητικές ενώσεις

αμμωνιακής φύσης προερχόμενες από την απαμίνωση των αμινοξέων και άλλων πρωτεϊνικών μορίων (Dainty, 1996). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα *Pseudomonas* spp. σχετίζονται με τον σχηματισμό ενώσεων θείου όπως μεθυλομερκαπτάνη, διμεθυλοσουλφίδιο και διμεθυλοτρισουλφίδιο μέσω του μεταβολισμού θειούχων αμινοξέων όπως κυστεΐνη και μεθειονίνη (Boziaris and Parlapani, 2017).

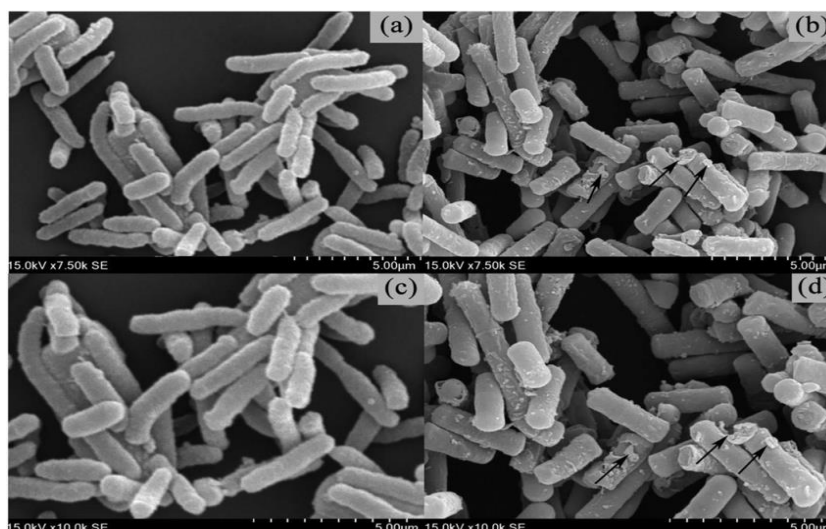
Τα είδη *Pseudomonas* βρίσκονται σε φυσικά οικοσυστήματα, όπως το έδαφος και το νερό αλλά έχουν απομονωθεί επίσης και από κλινικά όργανα, μολυσμένα ασηπτικά διαλύματα, καλλυντικά και ιατρικά προϊόντα (Raposo et al., 2016). Το γένος αυτό μπορεί να επιμολύνει τρόφιμα από πολλές διαφορετικές πηγές καθώς είναι σε θέση να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα υλικών ως υποστρώματα ανάπτυξης (Raposo et al., 2016). Είναι ευρέως διαδεδομένα στα νοπιά τρόφιμα ιδίως λαχανικά, κρέατα, πουλερικά και θαλασσινά (Jay et al., 2005).

Όπως γνωρίζουμε και από προηγούμενες ενότητες, τα στελέχη αυτά κυριαρχούν σε παγωμένα ψάρια του γλυκού νερού και η αλλοίωση τους συνοδεύεται από φρουτώδεις, σάπιες, σουλφυδρυλικές οσμές και γεύσεις ή οσμές κρεμμυδιού (Gram, 2009). Τα *Pseudomonas* spp. παράγουν πληθώρα πτητικών ενώσεων όπως αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες και σουλφίδια αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό ποιες συγκεκριμένες ενώσεις ευθύνονται για τις χαρακτηριστικές οσμές αλλοίωσης (Gram and Huss, 1996). Ενδεικτικά όμως αναφέρεται πως το φρουτώδες άρωμα που παράγεται από το στέλεχος *Pseudomonas fragi* προέρχεται από μονοαμινο- μονοκαρβοξυλικά οξέα (Gram and Huss, 1996). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως τα αλλοιογόνα είδη *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα διάσπασης των ενώσεων ινοσίνη, μονοφωσφορική ινοσίνη και υποξανθίνη θέτοντας υπό αμφισβήτηση την καθαρά ενδογενή ενζυμική βάση της αποικοδόμησης των νουκλεοτιδίων (Roberts et al., 2005a).

Ορισμένα είδη *Pseudomonas* έχουν ιατρική/ανοσολογική σημασία, καθώς θεωρούνται δυνητικά παθογόνα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα, ενώ άλλα όπως τα φυτοπαθογόνα είναι πολύ χρήσιμα στον γεωργικό τομέα (Ridgway and Safarik, 1990). Παρόλο που τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* συνδέονται κυρίως με την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων, αλλά και με λοιμώξεις σε ανθρώπους και φυτά, η πλειοψηφία των βακτηρίων είναι μη παθογόνα (Raposo et al., 2016). Μεταξύ των ειδών *Pseudomonas* που προκαλούν τις σημαντικότερες ασθένειες σε θαλάσσιες καλλιέργειες, πλήττοντας σοβαρά την οικονομία, περιλαμβάνονται τα *P. chlororaphis*, *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. putida* και *P. plecoglossicida* (Toranzo et al., 2005). Από τα παραπάνω, το *P. anguilliseptica* αποτελεί το κυριότερο παθογόνο για τα εκτρεφόμενα ψάρια (Toranzo et al., 2005).

Το *P. anguilliseptica* απομονώθηκε αρχικά σε ιαπωνικά χέλια όπου προκαλούσε την «ασθένεια των κόκκινων κηλίδων» με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Από τότε έχει καταγραφεί και σε ευρωπαϊκά χέλια καθώς και σε άλλα είδη ψαριών όπως τσιπούρα Ιαπωνίας, σολομός Φινλανδίας και ρέγκες Βαλτικής. Έχει θεωρηθεί επίσης υπεύθυνο και για το «σύνδρομο χειμερινής νόσου», χαρακτηριστικό της χρυσοκέφαλής τσιπούρας της Μεσογείου. Η νόσος αποτελεί ένα είδος σηψαιμίας, το οποίο λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 16°C) κυρίως τους χειμερινούς μήνες. Τα βασικότερα κλινικά συμπτώματα που εμφάνισαν τα νοσούντα ψάρια είναι η διάταση της κοιλίας και η αιμορραγία στο δέρμα και στα εσωτερικά όργανα. Τα συμπτώματα στα αλλοιωμένα χέλια είναι πιο σοβαρά από εκείνα των ψαριών (Raposo et al., 2016).

3.3 Shewanella spp.



Εικόνα 3.3.1 Εικόνα SEM της βιομάζας *Shewanella putrefaciens*. a) Μη προσροφημένη βιομάζα ($\times 7500$), b) Βιομάζα προσροφημένη με Cr(VI) ($\times 7500$), c) Μη προσροφημένη βιομάζα ($\times 10.000$), d) Βιομάζα προσροφημένη με Cr(VI) ($\times 10.000$). Πηγή: Water Air and Soil Pollution Published by Springer Nature

Ταξινομικά, η *Shewanella* ανήκει στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στην οικογένεια *Shewanellaceae* και στην τάξη *Alteromonadales*. Το γένος περιλαμβάνει σήμερα περισσότερα από 50 αναγνωρισμένα είδη (Satomi, 2014). Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram βακτήρια με σχήμα ευθύγραμμων ή κεκαμμένων ραβδίων, τα οποία κινούνται με τη βοήθεια πολικών μη επικαλυμμένων μαστιγίων (Κοτζεκίδου, 2016).

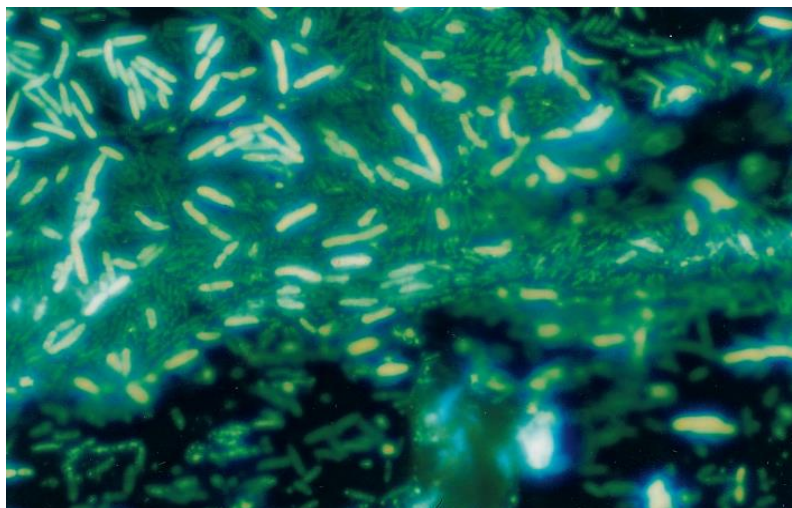
Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά διαδεδομένα είδη που αναπτύσσονται σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και πιέσεων (Kijewska et al., 2023). Τα είδη *Shewanella* που

συμμετέχουν στην αλλοίωση των τροφίμων είναι όλα ψυχρότροφα και ευδοκιμούν σε θερμοκρασίες 0-4°C. Παρόλο που τα περισσότερα διαβιώνουν στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια αυτά είναι ευαίσθητα σε υψηλά επίπεδα NaCl (πχ. 10%). Η ανοχή των ψυχρότροφων στελεχών στο NaCl ποικίλλει, καθώς ορισμένα αναστέλλονται από συγκέντρωση 6% NaCl, ενώ άλλα όχι (Satomi, 2014). Το γένος *Shewanella* εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια, καθώς περιλαμβάνει τόσο μεσόφιλα, αλλοανεκτικά στελέχη, όπως το *Shewanella algae* όσο και ψυχρότροφα στελέχη όπως τα *Shewanella putrefaciens* και *Shewanella baltica* (Gram and Dalgaard, 2002).

Αυτοί οι μη ζυμωτικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μια σχετική ευαισθησία σε χαμηλές τιμές pH. Ορισμένα είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH 5,5 ενώ άλλα αδυνατούν. Γενικά ισχύει πως τα στελέχη που εμφανίζουν ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl είναι επίσης πιο ανεκτικά και σε χαμηλές τιμές pH (Satomi, 2014).

Λόγω του υψηλού ζωονοσολογικού δυναμικού και της ευρείας εξάπλωσης, τα *Shewanella* spp. εντοπίζονται πρακτικά στα περισσότερα θαλάσσια περιβάλλοντα αλλά και σε λίμνες του γλυκού νερού, ωκεάνια ιζήματα και πετρελαιοπηγές (Kijewska et al., 2023; Satomi, 2014). Βρίσκονται κυρίως σε κατεψυγμένα ψάρια και άλλα πρωτεϊνούχα τρόφιμα, ενώ περιστασιακά έχουν απομονωθεί στελέχη και από κλινικά δείγματα. Όλα τα είδη *Shewanella* spp. έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση των ψαριών, όμως έπειτα από αξιολόγηση της ανάπτυξης διαφόρων ειδών σε χυμό μπακαλιάρου (στους 0 °C), υποδείχθηκε ότι η *S. putrefaciens*, *S. baltica*, *S. glacialipiscicola*, και *S. morhuae* ήταν οι πιο σημαντικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στα ψάρια (Satomi, 2014).

Shewanella putrefaciens



Εικόνα 3.3.2 Χρώση DAPI βιουμενίου του μικροοργανισμού *S. putrefaciens* σε ανοξείδωτο χάλυβα. Πηγή (Bagge et al., 2001)

Η *Shewanella putrefaciens* θεωρείται το βασικό βακτήριο αλλοίωσης των νοπών ιχθυηρών, συντηρούμενων υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία ψύξης και πιστεύεται ότι ο πληθυσμός της σχετίζεται άμεσα με τη εναπομένουσα διάρκεια ζωής πολλών θαλασσινών όπως πχ ο μπακαλιάρος (Roberts et al., 2005; Κουτσομάνης, 2000).

Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται ταχύτατα σε αερόβιες συνθήκες, δίνουν θετικές δοκιμές οξειδάσης και καταλάσης και παράγουν ροζ χρωστική έπειτα από καλλιέργεια σε nutrient άγαρ. Τα περισσότερα δεν έχουν την ικανότητα διάσπασης της γλυκόζης παρά μόνο υπό καθαρά αερόβιες συνθήκες (Κουτσομάνης, 2000). Έχει διαπιστωθεί όμως ότι ανάγουν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη, χρησιμοποιώντας το ως αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναερόβια αναπνοή (Κουτσομάνης, 2000). Η συγκεκριμένη δράση τους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αλλοίωση των ιχθυηρών, καθώς η ανηγμένη ένωση TMA έχει χαρακτηριστική αμμωνιακή οσμή ψαριού, οδηγώντας στην οργανοληπτική τους απόρριψη (Satomi, 2014; Roberts et al., 2005a). Η *S. putrefaciens* μπορεί να αναπτυχθεί διασπώντας το TMAO σε πληθυσμούς της τάξης 10^6 - 10^8 αλλά αδυνατεί να προκαλέσει αλλοίωση σε πληθυσμούς μικρότερους από 10^8 (Κουτσομάνης, 2000). Επίσης έχει βρεθεί ότι παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες TMA υπό αναερόβιες παρά υπό αερόβιες συνθήκες (Satomi, 2014).

Πίνακας 3.3.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των Shewanellaceae και ορισμένων στενά συγγενών αρνητικών κατά Gram οικογενειών. Προσαρμοσμένο από (M. Satomi, 2014)

Δοκιμή	Shewanellaceae	<i>Pseudomonas</i> spp.	Vibrionaceae	Enterobacteriaceae
Gram αντίδραση	-	-	-	-
Σχήμα	Rod	Rod	Rod	Rod
Κινητικότητα	+	+	(+)	(+)
Απαιτεί Na ⁺ για ανάπτυξη	(-)	-	-	-
Καταλάση	+	+	+	+
Αναγωγή TMAO	+	-	+	+
Παραγωγή H ₂ S	+	-	(+)	(+)
Αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη	+	(+)	(+)	(+)

+ θετικό, (+) λίγα αρνητικά, (-) λίγα θετικά, - αρνητικό

Πέρα από την αναγωγή του TMAO την παραγωγή H₂S και άλλων σουλφιδίων, η υδρόλυση του DNA και η αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης αποτελούν σημαντικές δοκιμές για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση της *S. putrefaciens*. Το βακτήριο υδρολύει επίσης πρωτεΐνες (καζεΐνη και ζελατίνη), RNA και ορισμένους εστέρες λιπαρών οξέων της σορβιτάνης (ενώσεις Tween). Έτσι με απλές βιοχημικές δοκιμές βασισμένες στις παραπάνω ιδιότητες, η *S. putrefaciens* που αλλοιώνει τα ψάρια μπορεί εύκολα να διακριθεί από άλλα είδη *Shewanella* spp. (Satomi, 2014).

Σύμφωνα με έρευνες έχει διαπιστωθεί πως το *S. putrefaciens* είναι ικανό να σχηματίζει παχύρρευστο ινώδες βιουμένιο (**Εικόνα 3.3.2**) και να προσκολλάται έτσι σε αδρανείς επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (ανοξειδωτος χάλυβας, προπυλένιο κλπ.) (Obuekwe et al., 1981). Η προσκόλληση πραγματοποιείται ταχέως και εάν παρέχονται παράλληλα θρεπτικά συστατικά, μπορούν να σχηματιστούν πολυστρωματικά βιουμένια. Η ιδιότητα αυτή της *S. putrefaciens* σε συνδυασμό με την ικανότητα της να παράγει σουλφίδια και να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο εξηγεί την συμβολή της στην μικροβιακά επαγόμενη διάβρωση των επιφανειών χάλυβα και στην επακόλουθη επιμόλυνση των τροφίμων μέσω των επιφανειών επεξεργασίας (Bagge et al., 2001).

Όπως συμπεραίνεται και από την ενότητα 3.1, οι βασικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί των θαλασσινών που συντηρούνται σε ψύξη υπό αερόβιες συνθήκες ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella* spp. (Bozaris and Parlapani, 2017). Στην σχετική έρευνα που παρουσιάστηκε (Πίνακας 3.1.1) παρατηρήσαμε πως το *Pseudomonas* spp. μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη της *S. putrefaciens* εξαιτίας του ανταγωνισμού που προκαλείται από την μεσολάβηση σιδηροφόρων για την εκμετάλλευση του σιδήρου. Ωστόσο, στα ψάρια των ψυχρών υδάτων που προέρχονται από βόρειες θάλασσες, η *Shewanella putrefaciens* αποτελεί τον μοναδικό ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό (Rafoso et al., 2016). Η επικράτηση της *S. putrefaciens* στα ιχθυηρά των Βόρειων θαλασσών οφείλεται στην ικανότητα της να ανάγει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA), προσδίδοντάς της υψηλότερο δυναμικό αλλοίωσης (Χειμωνά, 2018). Όσον αφορά τώρα τους ιχθύες της Μεσογείου, το βακτήριο *Pseudomonas* κυριαρχεί επί της αλλοιογόνου χλωρίδας λόγω της μικρότερης περιεκτικότητας των ψαριών αυτών σε οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (Bozaris and Parlapani, 2017; Κουτσουμάνης, 2000). Πράγματι, έχει αποδειχθεί πως η ανάπτυξη της τριμεθυλαμίνης σε ψάρια της Μεσογείου είναι ανεπαρκής σε σύγκριση με άλλα είδη από Βόρειες θάλασσες (Bozaris and Parlapani, 2017). Συγκεκριμένα οι (Kyra and Lougouvois, 2002) προσδιόρισαν την ποσότητα TMAO σε ευρωπαϊκό θαλάσσιο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) στην τιμή 22,8 mg N/100g, η οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τα 66 – 75 mg N/100g που βρέθηκαν στον άγριο μπακαλιάρο του Ατλαντικού, *Gadus morhua*, από τους (Herland et al., 2009).

3.4 Acinetobacter



Εικόνα 3.4.1 Καλλιέργεια του *Acinetobacter baumannii* σε Luria – Bertani άγαρ με ολονύκτια επώαση στους 37°C. Πηγή (Aoife Howard et al., 2012)

Τα βακτήρια *Acinetobacter* (σύνθετη λέξη από τις ελληνικές ακίνητος και βακτήριο) είναι Gram αρνητικοί, υποχρεωτικά αερόβιοι, μη κινητοί μικροοργανισμοί. Γενικά περιγράφονται ως διπλοκοκκιοειδείς ράβδοι αλλά έχει παρατηρηθεί πως ενώ τα νεαρά κύτταρα έχουν σχήμα ραβδιού, τα γηραιά κύτταρα έχουν κοκκοειδές σχήμα (Κοτζεκίδου, 2016). Δίνουν θετική δοκιμή καταλάσης, αρνητική δοκιμή οξειδάσης και είναι μη ζυμωτικοί, σαπροφυτικοί οργανισμοί (Howard et al., 2012).

Έπειτα από διάφορες φυλογενετικές μελέτες, τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* κατατάχθηκαν στην οικογένεια *Moraxellaceae*, η οποία περιλαμβάνει τα *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* καθώς και συγγενείς μικροοργανισμούς. Όλα τα παραπάνω γένη συνιστούν κλάδο της τάξης *Gamma proteobacteria* (Kämpfer, 2014).

Το γένος *Acinetobacter* περιλαμβάνει πάνω από 50 είδη, τα περισσότερα από τα οποία είναι μη παθογόνα (Mazumder, 2023; Berardinis et al., 2009). Εμφανίζουν ευρεία εξάπλωση στην φύση και είναι πολύ εύκολο να καλλιεργηθούν, καθώς είναι ικανά να χρησιμοποιούν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων ως μοναδική πηγή άνθρακα (Kämpfer, 2014). Τα είδη *Acinetobacter* επικρατούν στο φυσικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στο έδαφος, το γλυκό νερό, τους ωκεανούς, τα ιζήματα αλλά και σε πολικές περιοχές (Jung and Park, 2015). Συγκεκριμένα στο έδαφος βρίσκονται κατά προσέγγιση πληθυσμοί της τάξης 10^5 /mg και στο νερό 10^5 /mL αντίστοιχα (Baumann, 1968). Τα *Acinetobacter* εντοπίζονται φυσιολογικά στο ανθρώπινο δέρμα και απομονώνονται συνήθως από επιφάνειες υψηλής υγρασίας όπως

οι ιστοί των ποδιών, με τα *A. johnsonii*, το *A. lwoffii* και το *A. radioresistens* να αποτελούν τα συχνότερα ευρισκόμενα είδη (Kämpfer, 2014).

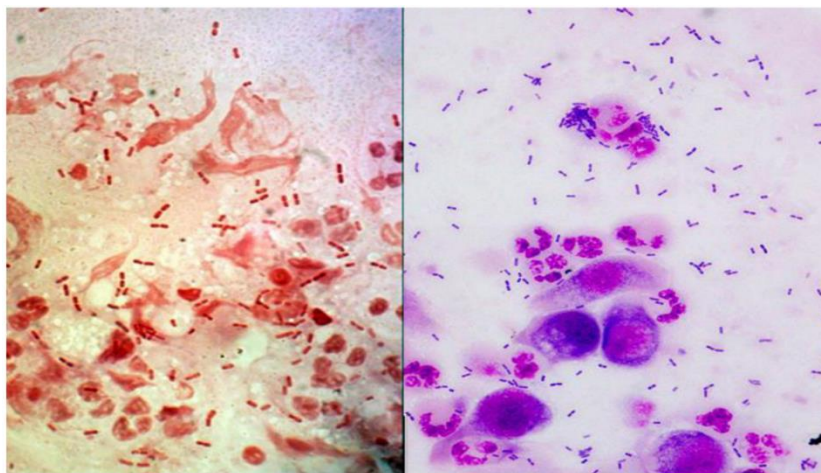
Τα *Acinetobacter* spp. ανιχνεύονται σε πληθώρα τροφίμων και παραγώγων τους, ιδίως σε ωπά προϊόντα που διατηρούνται στο ψυγείο, συμπεριλαμβανομένων των πουλερικών, του κρέατος, γαλακτοκομικών και θαλασσινών. Οι πρωταρχικές πηγές των στελεχών που εντοπίζονται στα τρόφιμα είναι το έδαφος και το νερό αλλά η επιμόλυνση μπορεί να γίνει άμεσα και από φυτά ή φυτικά προϊόντα, δέρμα ζώων, ανθρώπινο δέρμα ή και σκόνη. Τα τρόφιμα προσβάλλονται κυρίως από τα είδη *A. lwoffii* και *A. johnsonii* που απομονώνονται συχνά από το υδάτινο περιβάλλον και τα απόβλητα (P. Kämpfer, 2014).

Η ελάχιστη ενεργότητα νερού (a_w) για την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων είναι 0.96, οπότε δεν ευδοκιμούν σε τρόφιμα χαμηλής υγρασίας ή υψηλής περιεκτικότητας σε διαλυμένες ουσίες. Παρόλα αυτά, ορισμένα είδη εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και μπορούν να αναπτύσσονται σε εύρος -2 έως 5 °C. Γενικά όμως, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των περισσότερων στελεχών είναι 30 - 35°C (Kämpfer, 2014).

Ο μικροοργανισμός διαθέτει διάφορα χαρακτηριστικά που συντελούν στην ανθεκτικότητα και την μολυσματική του δράση. Τα ειδικά ινίδια που φέρει εξωτερικά το βακτήριο το βοηθούν να προσκολλάται σε ποικίλες επιφάνειες και σε συνδυασμό με το σχηματισμό βιοϋμενίου, είναι ικανό να επιβιώσει σε ξηρές περιβαλλοντικές συνθήκες (Mazumder, 2023). Τα είδη *Acinetobacter* διαθέτουν επίσης ρυθμιστικούς μηχανισμούς και ευέλικτες μεταβολικές ιδιότητες, όπως οδούς για την διάσπαση διαφόρων δικαρβοξυλικών οξέων μακράς αλύσου, αρωματικών και υδροξυλιωμένων αρωματικών ενώσεων που σχετίζονται με προϊόντα αποικοδόμησης των φυτών (Jung and Park, 2015).

3.5 Moraxella

Το γένος *Moraxella* ανήκει κι εκείνο στην οικογένεια *Moraxellaceae* και περιλαμβάνει Gram αρνητικούς, μη σπορογόνους, ψυχρότροφους μικροοργανισμούς (Santos et al., 1999). Τα στελέχη του έχουν σχήμα κόκκων, διαμέτρου 0,6 -1,0 μm ή πολύ κοντών ράβδων μεγέθους 1,0-1,5 x 1,5-2,5 μm. Τα ραβδόμορφα είδη εμφανίζονται συνήθως σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες (Yang, 2014). Για χάριν ευκολίας, το γένος διαιρέθηκε στο υποείδος *Moraxella*, το οποίο περιλαμβάνει τα ραβδοειδή στελέχη και στο υποείδος *Branhamella* το οποίο περιέχει τα κοκκοειδή στελέχη. Σύμφωνα με τα τωρινά δεδομένα, το γένος απαριθμεί τουλάχιστον 18 αναγνωρισμένα είδη, 6 από τα οποία απομονώθηκαν από ανθρώπους και 12 από ζώα (Santos et al., 1999).



Εικόνα 3.5.1 Απεικόνιση *Moraxella diplobacilli* από αποξέσεις κερατοειδούς με χρήση χρώσης Gram (αριστερά) και Giemsa (δεξιά). Πηγή <https://www.mdpi.com>

Τα βακτήρια *Moraxella* δίνουν θετικές δοκιμές καταλάσης, οξειδάσης και δεοξυριβονουκλεάσης (Cooke and Slack, 2017). Διαθέτουν οξειδωτικό μεταβολισμό και δεν μπορούν να σχηματίσουν οξύ διασπώντας τη γλυκόζη (Κοτζεκίδου, 2016). Επίσης αδυνατούν να μεταβολίσουν την τρυπτοφάνη και επομένως είναι αρνητικά στην δοκιμή της ινδόλης (Yang, 2014).

Όλα τα είδη της οικογένειας *Moraxellaceae* είναι κατά κανόνα μη κινητά σε υγρά μέσα ανάπτυξης, αλλά ορισμένα στελέχη έχουν εμφανίσει μικρά δείγματα κινητικότητας «σπασμοί», τα οποία πιθανώς να αποδίδονται στην ύπαρξη ινιδίων (Santos et al., 1999; Yang, 2014).

Χαρακτηρίζονται ως αυστηρά αερόβιοι οργανισμοί, με εξαίρεση ελάχιστα είδη που παρουσίασαν ασθενή ανάπτυξη υπό αναερόβιες συνθήκες παρουσία νιτρικών ενώσεων. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη τους κυμαίνεται μεταξύ 33 – 35 °C αν και τα περισσότερα στελέχη ευδοκιμούν και σε ψυχρότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, η προσθήκη ποσότητας 3 – 10% CO₂ στην ατμόσφαιρα φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη ορισμένων ειδών *Moraxella* (Yang, 2014).

Είναι ευρέως γνωστό πως τα βακτήρια του γένους *Moraxella* αποτελούν σημαντικό ποσοστό της ψυχρότροφης αερόβιας χλωρίδας πολλών νωπών και αλλοιωμένων πρωτεϊνούχων τροφίμων (Santos et al., 1999). Συγκεκριμένα, στελέχη *Moraxella* έχουν απομονωθεί από το δέρμα ψαριών, προερχόμενων από ψυχρά, τροπικά θαλασσινά αλλά και γλυκά νερά (Yang, 2014). Επίσης τα δίθυρα μαλάκια (στρείδια και χτένια) φέρουν συστηματικά πιθανολογούμενα είδη *Moraxella*, τα οποία ενδέχεται να συνιστούν μέρος του εγγενή βακτηριακού πληθυσμού (Santos et al., 1999). Δεδομένου ότι τα *Moraxella* spp. έχουν πολύ χαμηλές απαιτήσεις σε οργανικές ενώσεις και άζωτο, έχουν ανιχνευθεί επανειλημμένα στο νερό που χρησιμοποιείται σε εργοστάσια τροφίμων καθώς και στο πόσιμο μη ανθρακούχο μεταλλικό νερό εμφιαλωμένο σε πλαστικά ή γυάλινα μπουκάλια (Cooke and Slack, 2017). Τέλος, παρά το γεγονός ότι τα βακτήρια *Moraxella* κυριαρχούν αποδεδειγμένα στην αλλοιογόνο χλωρίδα των αερόβια αποθηκευμένων θαλασσινών, ο ακριβής ρόλος τους στην αλλοίωση παραμένει ασαφής, καθώς δεν παράγουν οσμηρά υποπροϊόντα όπως τα είδη *Pseudomonas* και *Shewanella* (Yang, 2014).

4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα μαλάκια

Τα θαλασσινά και τα προϊόντα τους επιμολύνονται συχνά με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της αλυσίδας παραγωγής, με αποτέλεσμα να αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Η ανάπτυξη η μη των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από πιθανές αλληλεπιδράσεις με την αλλοιογόνο χλωρίδα (Gram and Dalgaard, 2002). Τα παθογόνα βακτήρια κατά κανόνα χρειάζονται θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 5°C για την ανάπτυξή τους. Επίσης, τα παθογόνα στελέχη ανταγωνίζονται για την επικράτηση στο τρόφιμο με τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τους παθογόνους σε χαμηλές θερμοκρασίες (Tsigarida et al., 2003). Έτσι, τα μολυσμένα προϊόντα συνήθως αλλοιώνονται πριν την μεγάλη αύξηση του αριθμού των παθογόνων ή την παραγωγή τοξίνης.

Ειδικότερα τα μύδια, φέρουν μεγάλο φορτίο παθογόνων μικροοργανισμών κυρίως επειδή τρέφονται με διήθηση του ύδατος. Ο συγκεκριμένος τρόπος διατροφής ευνοεί τη συσσώρευση μεγάλων πληθυσμών παθογόνων στα δίθυρα μαλάκια, όπως βακτήρια του γένους *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. και *Clostridium botulinum* type E, τα οποία απαντώνται φυσικά στα υδάτινα οικοσυστήματα (Kijewska et al., 2023). Μικροοργανισμοί όπως *C. botulinum* type A, B, L και *Listeria monocytogenes* που απαντώνται ευρύτερα στο περιβάλλον μπορεί επίσης να βρεθούν σε χαμηλούς πληθυσμούς στα θαλασσινά (Κοντοτόλης, 2016). Ωστόσο, η ανίχνευση στα προϊόντα αυτά βακτηρίων *Salmonella* spp., *Shigella* spp. και παθογόνων στελεχών *Escherichia coli*, συνιστά δείκτη κοπρανώδους επιμόλυνσης, καθώς δεν αποτελούν μέλη της φυσικής μικροχλωρίδας των υδάτων (Feldhusen, 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται «μικροοργανισμοί δείκτες» και στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν ασθενή ανάπτυξη και ευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στα μολυσμένα τρόφιμα (Μπεζιρτζόγλου, 2004).

Η μόλυνση των υδάτων συνήθως επέρχεται από τα απόβλητα αποχέτευσης λυμάτων που περιέχουν ανθρώπινα περιττώματα (Μπεζιρτζόγλου, 2004). Τα νωπά αλιευτικά προϊόντα μπορεί επίσης να επιμολυνθούν από τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας (Jay et al., 2005). Ο άνθρωπος ενδέχεται να επιμολύνει τα τρόφιμα με παθογόνους μικροοργανισμούς όπως το *Staphylococcus aureus*, του οποίου συχνά είναι φορέας, ή με εντερικά παθογόνα της οικογένειας *Enterobacteriaceae* εξαιτίας έλλειψης ορθής υγιεινής. Επιπλέον, βακτήρια όπως το *Listeria monocytogenes* έχουν την δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίου που τους επιτρέπει να προσκολλούνται στις

επιφάνειες επεξεργασίας, επιμολύνοντας τα τρόφιμα που έρχονται σε επαφή με αυτές (Gram and Huss, 1996; Κοντοτόλης, 2016).

Τα ζητήματα της διάδοσης παθογόνων και της έξαρσης τροφιμογενών νοσημάτων που προκαλούνται από εξωγενή βακτήρια σε πολλές γεωγραφικές περιοχές, αποτέλεσαν συνέπειες των παγκοσμιοποιημένων αλυσίδων διατροφής, της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής και της αυξανόμενης δυναμικής εξάπλωσης των παθογόνων. Μάλιστα, τα βακτήρια αυτά ευθύνονται για πιθανή μετάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε μικροβιακά είδη της ανθρώπινης μικροχλωρίδας (Kijewska et al., 2023).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω δεδομένα, τα παθογόνα που προσβάλλουν τα θαλασσινά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες. Αυτές είναι (Feldhusen, 2000):

- i) Βακτήρια που αποτελούν φυσικά συστατικά του θαλάσσιου οικοσυστήματος (αυτόχθονα βακτήρια) όπως *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* και *Aeromonas hydrophila*.
- ii) Εντερικά βακτήρια που είναι παρόντα στα τρόφιμα λόγω περιττωματικής επιμόλυνσης (μη αυτόχθονα βακτήρια) όπως *Salmonella* spp., παθογόνα *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. και *Yersinia enterocolitica* (πολύ λίγα παθογόνα στελέχη).
- iii) Βακτήρια που προκύπτουν από μόλυνση κατά τη διάρκεια της αλιείας, των μετασυλλεκτικών χειρισμών ή της επεξεργασίας όπως *Bacillus cereus* (μόνο τοξικογόνα στελέχη), *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Clostridium perfringens*.

Όταν οι μικροοργανισμοί αυτοί βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες, πολλαπλασιάζονται ραγδαία σε μεγάλους πληθυσμούς, δεδομένου ότι ο μέσος χρόνος διπλασιασμού σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης είναι μόλις 20 λεπτά. Με την κατανάλωση ενός τέτοιου προϊόντος προκαλείται τροφική δηλητηρίαση. Οι τροφογενείς ασθένειες χωρίζονται σε τροφικές τοξινώσεις και σε τροφικές επιμολύνσεις. Οι τροφικές τοξινώσεις είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης τροφίμου το οποίο περιέχει τοξίνες. Οι σημαντικότερες βακτηριακές τοξίνες παράγονται από τον *Staphylococcus aureus* και το *Clostridium botulinum*. Οι τροφικές επιμολύνσεις από την άλλη προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμου που φέρει παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσβάλλουν το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου (Κοτζεκίδου, 2016).

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το 1 στα 2.000 γεύματα ωμών οστρακοειδών οδηγεί σε ασθένεια, καθιστώντας τα μαλάκια ένα από τα πιο επικίνδυνα τρόφιμα (National Academy of Science, 1991). Ο κίνδυνος αυτός σχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα μικροοργανισμών που συσσωρεύουν τα στρείδια από υπερκείμενα ύδατα καθώς και την κατανάλωση από τον

άνθρωπο ολόκληρου του ζώου σε ωμή ή ατελώς μαγειρεμένη μορφή (Murphee and Tamplin, 1995).

Τα ιχθυρά και τα προϊόντα τους προκαλούν πληθώρα τροφιμογενών ασθενειών στον άνθρωπο και ευθύνονται για το 19% των 967 τροφιμογενών κρουσμάτων που έπληξαν τις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1993 έως το 1997 (Πίνακας 4.1). Στα 2/3 σχεδόν των κρουσμάτων δεν βρέθηκε ποιο τρόφιμο ευθυνόταν για την πρόκληση δηλητηρίασης. Η ομάδα των οστρακοειδών (μαλάκια και καρκινοειδή) προκάλεσε σχεδόν τον ίδιο αριθμό κρουσμάτων (περίπου 1900) με τα πουλερικά, τα οποία καταναλώνονται γενικά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες και με υψηλότερη συχνότητα. Παρόλα αυτά, καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν ήταν θανατηφόρα. Οι κυριότερες αιτίες των τροφογενών ασθενειών ήταν βακτήρια, ιοί, παράσιτα και βιογενείς αμίνες. Οι ιογενείς ασθένειες και οι τοξινώσεις μεταφέρονται συνήθως από τα οστρακοειδή ενώ οι βιογενείς αμίνες από τα πτερύγια των ιχθύων (Roberts et al., 2005).

Πίνακας 4.1 Τρόφιμα που εμπλέκονται σε τροφογενείς ασθένειες στις Ηνωμένες Πολιτείες (1993-1997) Προσαρμοσμένο από (T. A. Roberts et al., 2005)

Τρόφιμο	Κρούσματα		Περιπτώσεις		Θάνατοι	
	Αριθμός	Ποσοστό (%)	Αριθμός	Ποσοστό (%)	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Κρέας	66	2.4	3205	3.7	4	13.8
Χοιρινό	28	1.0	988	1.1	1	3.4
Πουλερικά	52	1.9	1871	2.2	0	0.0
Άλλα είδη κρέατος	22	0.8	645	0.7	2	6.9
Οστρακοειδή	47	1.7	1868	2.2	0	0.0
Ψάρια	140	5.1	696	0.8	0	0.0
Αυγά	19	0.7	367	0.4	3	10.3
Γαλακτοκομικά	18	0.7	313	0.4	1	3.4
Παγωτό	15	0.5	1194	1.4	0	0.0
Αρτοποιήματα	35	1.3	853	1.0	0	0.0
Φρούτα/Λαχανικά	70	2.5	12369	14.4	2	6.9
Σαλάτες	127	4.6	6483	7.5	2	6.9
Άλλα	66	2.4	2428	2.8	0	0.0
Διάφορα φαγητά	262	9.5	25628	29.8	1	3.4
Γνωστά τρόφιμα	967	35.2	58908	68.5	16	55.2
Άγνωστα τρόφιμα	1784	64.8	27150	31.5	13	44.8
Σύνολο	2751	100	86058	100	29	100

Αξιολογώντας την σοβαρότητα της κατάστασης, κρίνεται αναγκαίο να ληφθούν μέτρα πρόληψης των ασθενειών και προστασίας των περιοχών καλλιέργειας των μαλακίων από τους παραγωγούς, τις βιομηχανίες τροφίμων αλλά και τους ίδιους τους καταναλωτές. Τα βασικά μέτρα ελέγχου περιλαμβάνουν:

- Ενημέρωση των καταναλωτών σχετικά με τα κατάλληλα μέρη συλλογής μαλακίων, καθώς και με τους κινδύνους που σχετίζονται με την κατανάλωση ακατέργαστων δίθυρων μαλακίων.
- Μικροβιολογικός έλεγχος του ύδατος από το οποίο αλιεύονται τα μαλάκια σε διαπιστευμένα εργαστήρια.
- Προστασία των υδάτων από επιμόλυνση.
- Επιβολή κανόνων εμπορίας δίθυρων μαλακίων.

Το σωστό μαγείρεμα των μαλακίων αποτελεί ένα ακόμα μέτρο αποφυγής των ασθενειών καθώς μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, οι τοξίνες που παράγονται από ορισμένα βακτήρια δεν καταστρέφονται σε θερμοκρασίες μαγειρέματος, γι' αυτό είναι επιτακτικό να καταναλώνονται μόνο τα μαλάκια που αλιεύονται από καθαρές θάλασσες (Κοντοτόλης, 2016).

4.1 Ενδογενείς Παθογόνοι Μικροοργανισμοί

4.1.1 *Vibrio* spp.



Εικόνα 4.1.1. Εντεροπαθογόνα *Vibrio*. Πηγή <https://www.biomerieux-industry.com>

Το γένος *Vibrio* ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια *Vibrionaceae* μαζί με τα γένη *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Allomonas* και *Listonella* από τα οποία διαθέτει τα περισσότερα είδη (Hackey and Pierson, 1994). Πρόκειται για Gram αρνητικά, συνήθως μικρά σε μέγεθος (0,5 x 1,3-3mm) ραβδοειδή καμπυλωτά βακτήρια. Τα *Vibrios* είναι μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια και κινητά με τη χρήση πολικού μαστίγιου. Ειδικότερα σε υγρά υποστρώματα ανάπτυξης όλα τα στελέχη εμφανίζουν έντονη ελικοειδή κινητικότητα.

Τα περισσότερα είδη δίνουν θετικές δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης και ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη (Percival and Williams, 2014). Όλα τα *Vibrio* spp μεταβολίζουν αναερόβια την γλυκόζη, διαμέσου της οδού Embden – Meyerhof, σχηματίζοντας οργανικά οξέα (μυρμηκικό, γαλακτικό, οξικό, γλυκονικό, πυροσταφυλικό) και αιθανόλη (Baumann et al., 1984).

Στο γένος *Vibrio* συμπεριλαμβάνονται και ψυχρότροφα και μεσόφιλα είδη, αλλά μόνο τα μεσόφιλα παρουσιάζουν παθογόνο δράση στον άνθρωπο (Hackey and Pierson, 1994). Κατά κανόνα πολλαπλασιάζονται άριστα σε θερμοκρασίες μεταξύ 20°C και 40°C, γεγονός που αντανακλάται στους μεγάλους πληθυσμούς που ανιχνεύονται στα μαλάκια όταν οι θερμοκρασίες του νερού αυξάνονται σε 30°C και στην πρακτική απουσία τους από μαλάκια ψυχρών υδάτων (Roberts et al., 2005).

Σύμφωνα με τους (Baumann et al., 1984), τα παθογόνα *Vibrios* χρειάζονται αλάτι για την ανάπτυξη τους, η συγκέντρωση του οποίου ποικίλλει για τα διαφορετικά είδη. Η απαίτηση τους αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό των παθογόνων στελεχών σε μη αλόφιλα είδη (*V. cholerae* και *V. mimicus*), που καλλιεργούνται σε θρεπτικό άγαρ και σε αλόφιλα είδη που απαιτούν συμπλήρωμα αλατιού στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης τους (Percival and Williams, 2014). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι έχουν την τάση να αναπτύσσονται ταχύτερα σε αλκαλικές συνθήκες, παρότι τα περισσότερα είδη *Vibrio* εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε τιμές pH μεταξύ 6,5 και 9,0 (Percival and Williams, 2014).

Τα *Vibrios* συνιστούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας των υδάτων και βρίσκονται στο θαλασσινό νερό, σε εκβολές ποταμών, παράκτιες περιοχές και κυρίως σε υφάλμυρο ή αλμυρό νερό (Κοντοτόλης, 2016). Τα μεσόφιλα είδη *Vibrio* απαντώνται συχνότερα σε παράκτια ύδατα με μειωμένη αλατότητα. Για παράδειγμα, το *V. vulnificus* εντοπίζεται κυρίως σε ψάρια προερχόμενα από εκβολές ποταμών, κυρίως βενθικά και σπανιότερα σε ψάρια ανοιχτής θάλασσας (Roberts et al., 2005).

Το γένος *Vibrio* αποτελείται από τουλάχιστον 28 είδη (Jay et al., 2005) και τα τρία από αυτά που προκαλούν τις περισσότερες τροφογενείς ασθένειες από οστρακοειδή είναι τα *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* (Hackey and Pierson, 1994). Τα *V. vulnificus* και *V. parahaemolyticus* εμφανίζουν εποχική παρουσία στα μαλάκια και προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις κυρίως κατά τους θερινούς μήνες που η θερμοκρασία του νερού είναι μεγαλύτερη από 19°C (Kijewska et al., 2023; Κοτζεκίδου, 2016). Τα *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. metoecus*, και *V. furnissii* έχουν επίσης συσχετιστεί με τροφογενείς λοιμώξεις ενώ το *V. fluvialis* αποτελεί ένα αναδύομενο παθογόνο που ευθύνεται για διαρροϊκά κρούσματα στον άνθρωπο (Kijewska et al., 2023).

Vibrio parahaemolyticus

Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι διαδεδομένο σε ωκεάνια και παράκτια ύδατα. Η ύπαρξη του στο νερό εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία του, καθώς τα βακτήρια δεν είναι ανιχνεύσιμα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 19 – 20°C (Jay et al., 2005). Μάλιστα, μελέτη που διεξήχθη στον ποταμό Rhode του κόλπου Chesapeake Bay υπέδειξε ότι το *V. parahaemolyticus* επιβιώνει στο υδάτινο ίζημα τους χειμερινούς μήνες και έπειτα απελευθερώνεται στη στήλη του νερού όπου συνδέεται με το ζωοπλαγκτόν από τον Απρίλιο έως και τον Ιούνιο (Kaneko and Colwell, 1973).

Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου είναι 44°C, η ελάχιστη 5°C και η βέλτιστη κυμαίνεται από 30 – 35 °C. Στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης ο χρόνος διπλασιασμού του κυττάρου είναι μόλις 9 – 13 λεπτά (Κοτζεκίδου, 2016). Αύξηση του μικροοργανισμού έχει διαπιστωθεί σε εύρος pH 4,8 – 11,0 με τις τιμές pH 7,6 – 8,6 να θεωρούνται οι ιδανικές (Jay et al., 2005). Το *V. parahaemolyticus* χαρακτηρίζεται ως αλόφιλο βακτήριο και συγκεντρώσεις NaCl μεταξύ 2 – 4 % θεωρούνται ιδανικές για την ανάπτυξη του (Κοτζεκίδου, 2016).

Τα παθογόνα στελέχη *V. parahaemolyticus* προκαλούν γαστρεντερίτιδα με κύρια συμπτώματα κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία, εξάντληση, ρίγος, πονοκέφαλο και πυρετό τα οποία συνήθως διαρκούν 24 – 48 ώρες (Κοντοτόλης, 2016). Το ποσοστό θνησιμότητας της ασθένειας θεωρείται χαμηλό. Τα τρόφιμα που ευθύνονται κυρίως για την τροφολοίμωξη είναι στρείδια, μύδια, αστακοί, γαρίδες και καβούρια (Κοτζεκίδου, 2016).

Η τροφική δηλητηρίαση από *V. parahaemolyticus* σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του βακτηρίου να παράγει μια θερμοανθεκτική αιμολυσίνη, η οποία ανιχνεύεται μόνο όταν ο πληθυσμός των κυττάρων είναι από 10⁶ cfu/g και πάνω (Hlady, 1997). Η αιμολυσίνη εμφανίζει αυξημένη ανθεκτικότητα στη θέρμανση σε pH 5,5 – 6,5 από ότι σε pH 7,0 – 8,0 (Κοτζεκίδου, 2016). Η πρόκληση γαστρεντερίτιδας ωστόσο έχει συσχετισθεί και με μη – αιμολυτικά στελέχη του βακτηρίου (Hlady, 1997).

Κρούσματα της τροφολοίμωξης με *V. parahaemolyticus* εμφανίζονται συχνά μετά την κατανάλωση μολυσμένων ωμών στρειδιών και μυδιών στις ΗΠΑ και την Ασία καθώς και μπλε καβουριών στον Καναδά και την Ευρώπη (Parlapani, 2021).

Vibrio vulnificus

Το *Vibrio vulnificus* απομονώνεται συχνότερα από στρείδια και μύδια παρά από ψάρια και καρκινοειδή. Ο μικροοργανισμός έχει βρεθεί στον Κόλπο του Μεξικού, στις εκβολές της Ουάσιγκτον και του Όρεγκον καθώς και στις ακτές του Μαϊάμι, της Φλόριντα και της Μασαχουσέτης με τα περισσότερα βακτήρια (84%) να απομονώνονται από μύδια (Jay et al., 2005). Ωστόσο, τα ωμά στρείδια θεωρούνται η κύρια πηγή της τροφολοίμωξης από *Vibrio vulnificus* και πιστεύεται ότι ευθύνονται για το 95% όλων των θανάτων που σχετίζονται με τα θαλασσινά στις ΗΠΑ (Hlady, 1997).

Το βακτήριο προκαλεί τροφική δηλητηρίαση με παρόμοια συμπτώματα με το *V. parahaemolyticus* όπως πυρετός, ρίγη, ναυτία κλπ. Οι λοιμώξεις είναι συχνές σε αρκετές χώρες

και οι περισσότερες εκδηλώνονται μεταξύ Μαΐου και Οκτωβρίου, με την πλειοψηφία των ασθενών να είναι άνδρες άνω των 40 ετών (Jay et al., 2005).

Η τροφική δηλητηρίαση από *Vibrio vulnificus* θεωρείται από τις πιο σοβαρές τροφογενείς λοιμώξεις με ποσοστά θνησιμότητας πάνω από 50% για άτομα ευπαθών ομάδων. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί πως σε κάποιες περιπτώσεις προκαλεί θάνατο σε διάστημα 36 ωρών από την εισβολή του παθογόνου στον οργανισμό. Ομάδα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνει άτομα που πάσχουν από νόσους του ήπατος, κίρρωση, διαβήτη, λευχαιμία ή είναι ανοσοκατεσταλμένα (Κοντοτόλης, 2016).

Ο έλεγχος της ανάπτυξης του *V. vulnificus* πραγματοποιείται με ταχεία ψύξη των νωπών αλιευμάτων κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες που το βακτήριο πολλαπλασιάζεται ταχύτατα. Για την ελάττωση του κινδύνου τροφικής δηλητηρίασης, τα οστρακοειδή θα πρέπει να υφίστανται επαρκή θερμική επεξεργασία (μεγαλύτερη των 85°C) και να καταναλώνονται αμέσως μετά το μαγείρεμα για να αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση (Κοντοτόλης, 2016; Κοτζεκίδου, 2016).

Vibrio cholerae

Το πιο κλινικά σημαντικό από όλα τα είδη *Vibrios* είναι το *Vibrio cholerae*, το οποίο έχει μέγεθος 0,5 – 0,8 mm επί 1,5 – 2,5 mm και αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της χολέρας. Έως και σήμερα, έχουν βρεθεί περίπου 206 ορότυποι «Ο» του *Vibrio cholerae*. Στην αρχή το είδος διαχωρίστηκε σε O1 στελέχη και σε non – O1 στελέχη, αλλά στη συνέχεια ανακαλύφθηκε και το στέλεχος O139 (Percival and Williams, 2014).

Το *Vibrio cholerae non -O1* προκαλεί σχετικά ήπια γαστρεντερίτιδα με συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακούς πόνους, πυρετό, ναυτία και εμετό. Τα συμπτώματα εμφανίζονται περίπου 48 ώρες μετά τη είσοδο του βακτηρίου στον οργανισμό και έχουν διάρκεια 6 – 7 μέρες. Το βακτήριο προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και παράγει τοξίνη η οποία ευθύνεται για την πρόκληση λοίμωξης (Κοντοτόλης, 2016). Το στέλεχος non – O1 μπορεί να προκαλέσει σηψαιμία σε άτομα με ανοσοκαταστολή. Το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να υπερβαίνει και το 50% (Κοντοτόλης, 2016). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα στελέχη O1 και O139 το *Vibrio cholerae non -O1* δεν μπορεί να προκαλέσει επιδημική και πανδημική χολέρα.

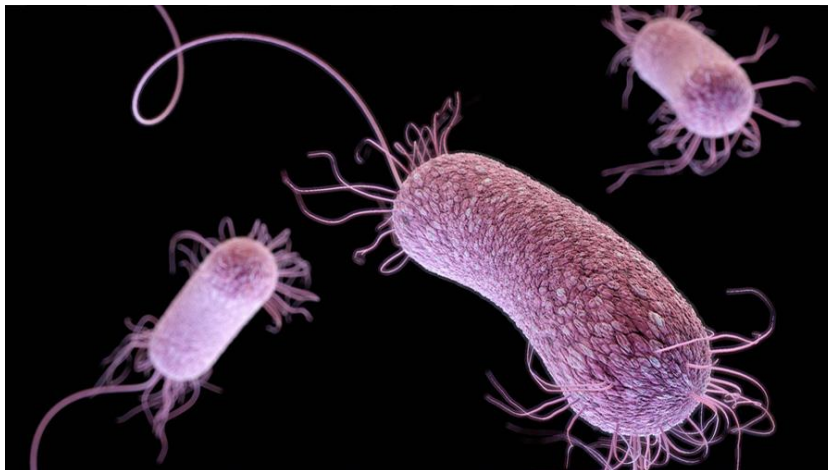
Το *V. cholerae* O1 παράγει μια ισχυρή και μερικές φορές θανατηφόρα κυτοτονική εντεροτοξίνη, με την ονομασία CT toxin, η οποία προσομοιάζει τόσο σε δομικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο την ανθεκτική εντεροτοξίνη του *E. coli* (Spangler, 1992).

Τα συμπτώματα της επιδημίας της χολέρας κυμαίνονται από ήπια διάρροια έως οξεία διάρροια που συνοδεύεται με την εμφάνιση «κόκκων ρυζιού» στα κόπρανα. Η λοίμωξη χαρακτηρίζεται από κοιλιακές κράμπες, ναυτία και εμετό που έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αφυδάτωση του οργανισμού. Εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία επανυδάτωσης είναι πολύ πιθανό να επέλθει θάνατος λόγω της έλλειψης ηλεκτρολυτών εντός 1 – 5 ημερών. Η περίοδος επώασης της νόσου είναι σύντομη και τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται από 6 ώρες έως και 5 ημέρες μετά την μόλυνση (Percival and Williams, 2014; Κοντοτόλης, 2016).

Τα κρούσματα χολέρας καταγράφονται και διατηρούνται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε πως μεταξύ 1996 και 2005 σημειώθηκαν 632 κρούσματα χολέρας στην υποσαχάρια Αφρική, τη Νοτιοανατολική Ασία, την Κεντρική και Νότια Αμερική, τη Δυτική Ασία και τη Βόρεια Αφρική. Ο κοινός συντελεστής όλων αυτών των επιδημιών είναι η επιμόλυνση του νερού (Griffith et al., 2006).

Τα τοξικογόνα βακτήρια *V. cholerae* O1 είναι ικανά να επιβιώνουν για χρόνια στο υδάτινο περιβάλλον, σχηματίζοντας ειδικά βιουμένια μέσα στα οποία διαμένουν. Παρότι ο ορότυπος O1 απομονώνεται συχνά από θαλάσσια ύδατα, τα περισσότερα στελέχη που έχουν βρεθεί δεν παράγουν τοξίνη CT (Percival and Williams, 2014).

4.1.2 *Aeromonas* spp.



Εικόνα 4.1.2 *Aeromonas hydrophila*. Πηγή <https://invdes.com>.

Τα βακτήρια *Aeromonas* εμφάνιζαν πάντα αμφιλεγόμενη ταξινόμηση και δυσκολία στην διάκριση και ταυτοποίηση των ειδών λόγω της υψηλής γενετικής ποικιλομορφίας τους. Το γένος αρχικά εντάχθηκε στην οικογένεια *Vibrionaceae* μαζί με τα γένη *Vibrio*, *Plesiomonas* και *Photobacterium*. Η ταξινόμηση αυτή οφείλεται στη από κοινού επικράτηση των παραπάνω βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον και τον παρόμοιο φαινοτυπικό τους χαρακτήρα (Martino et al., 2016). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, το γένος *Aeromonas* έχει τοποθετηθεί στην δική του οικογένεια *Aeromonadaceae* (Qureshi and Qamar, 2020).

Το γένος αποτελείται από Gram αρνητικά, ραβδόμορφα βακτήρια τα οποία δεν σχηματίζουν σπόρια. Είναι προαιρετικά αναερόβια και δίνουν θετικές δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης (Qureshi and Qamar, 2020). Το γένος *Aeromonas* μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο φαινοτυπικές ομάδες: τα μη – κινητά ψυχρόφιλα στελέχη και τα κινητά μεσόφιλα στελέχη. Τα ψυχρόφιλα στελέχη, όπως το *A. salmonicida*, αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασίες μεταξύ 22 – 28°C . Αντιθέτως, τα μεσόφιλα στελέχη παρουσιάζουν άριστη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες 35 – 37°C αν και πολλά από αυτά αναπτύσσονται και μεταξύ 4 - 42°C (Percival and Williams, 2014b).

Τα βακτήρια *Aeromonas* βρίσκονται στο έδαφος, και σε διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα όπως λίμνες, ποτάμια, ρυάκια, πηγές, πισίνες, θαλασσινό νερό, νερό βρύσης καθώς και στο νερό της βροχής (Martino et al., 2016; Percival and Williams, 2014b). Έχουν απομονωθεί από μεγάλη ποικιλία τροφίμων, όπως φρέσκο γάλα, λαχανικά, παγωτό, κρέας και θαλασσινά (Qureshi and Qamar, 2020). Εμφανίζουν σημαντική παθογένεια για τα

ψάρια, τις χελώνες, τους βατράχους, τα σαλιγκάρια και τους αλιγάτορες και αποτελούν επίσης παθογόνα για τον άνθρωπο ιδίως σε εξασθενημένους οργανισμούς (Jay et al., 2005).

Στο γένος *Aeromonas* υπάρχουν προς το παρόν 17 αναγνωρισμένα είδη, τα τρία από αυτά *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* έχουν κλινική σημασία καθώς προκαλούν ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα (Qureshi and Qamar, 2020).

Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από το *Aeromonas* είναι γενικά αυτοπεριοριζόμενη και χαρακτηρίζεται από οξεία, υδαρής διάρροια με διάρκεια μερικών ημερών έως και μερικών εβδομάδων. Σοβαρότερες περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας με χρόνια διάρροια και βαρύτερα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως μόνο σε άτομα με ανοσοκαταστολή (Percival and Williams, 2014b). Ορισμένα είδη *Aeromonas* προκαλούν από λοιμώξεις σε ανοιχτές πληγές και μαλακούς ιστούς μέχρι και σηψαιμία, ενώ κάποια στελέχη έχουν ενοχοποιηθεί για πνευμονία και περιτονίτιδα (Qureshi and Qamar, 2020).

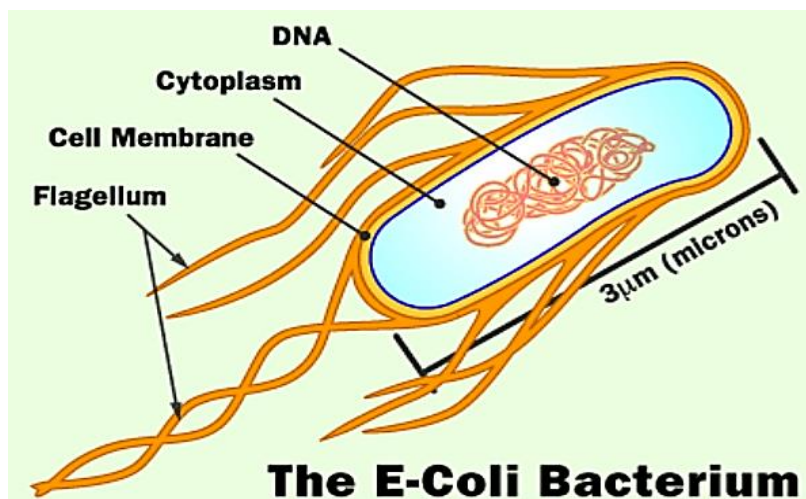
Τα παθογόνα στελέχη του *A. hydrophila* παράγουν ένα μεμονωμένο πολυπεπτίδιο 52 – kDa με εντεροτοξικές, κυτταροτοξικές και αιμολυτικές ιδιότητες. Το πολυσύνθετο αυτό μόριο φαίνεται να έχει ανοσολογική διασταυρούμενη δραστηριότητα με την τοξίνη του *V. cholerae* (Jay et al., 2005). Για να προκληθεί όμως τροφοτοξίνωση από το *A. hydrophila* πρέπει το βακτήριο να βρίσκεται σε πληθυσμούς της τάξης 10^4 - 10^{10} στο τρόφιμο (Κοτζεκίδου, 2016).

Οι τροφολοιμώξεις από τα *Aeromonas* αποδίδονται κυρίως στο πόσιμο νερό αλλά και στην κατανάλωση οστρακοειδών με ανεπαρκή θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, τα ψυχρότροφα είδη δεν παράγουν ικανοποιητική ποσότητα εντεροτοξίνης κατά τη συντήρηση τροφίμων σε θερμοκρασίες ψύξης γι' αυτό ο κίνδυνος τροφοτοξινώσεων είναι μειωμένος (Κοτζεκίδου, 2016).

Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου μόλυνσης από *Aeromonas* spp. θα πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση ωμών ή ατελώς ψημένων θαλασσινών και να παρέχεται ασφαλές πόσιμο νερό που θα έχει υποστεί τους απαραίτητους ελέγχους (Qureshi and Qamar, 2020).

4.2 Εξωγενείς Παθογόνοι Μικροοργανισμοί

4.2.1 *Escherichia coli*



Εικόνα 4.2.1.1 Δομή του *Escherichia coli*. Πηγή <https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-E-coli->

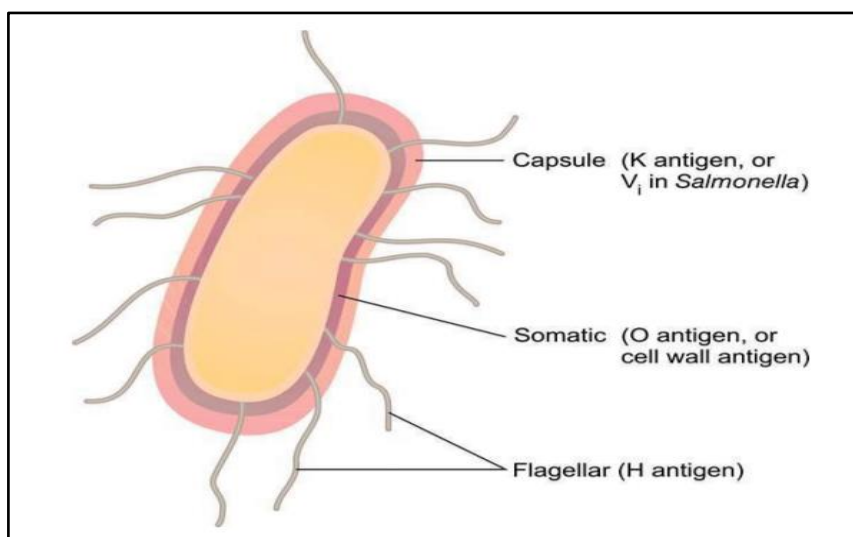
Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί χαρακτηριστικό είδος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας χάρη στην ικανότητα του να ζυμώνει τη λακτόζη παράγοντας αέριο και οξύ στους 44 – 45,5°C (coliforms) (Παπαδοπούλου, 2014).

Το γένος *E. coli* περιλαμβάνει Gram αρνητικά, μη σπορογόνα, ραβδιά μήκους 1 – 1,5 έως 3μm. Τα περισσότερα είναι κινητά με χρήση μαστίγιου και φέρουν εξωτερικά τριχίδια. Τόσο τα κινητά όσο και τα μη κινητά στελέχη σχηματίζουν προσκολλητικά και συζευκτικά ινίδια (Κοντοτόλης, 2016).

Τα βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν και με οξυγόνο αλλά και χωρίς. Απουσία οξυγόνου επιβιώνουν είτε μέσω της αναερόβιας αναπνοής, χρησιμοποιώντας νιτρικά, νιτρώδη, ή φουμαρικά ως τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, είτε μέσω ζύμωσης σακχάρων απελευθερώνοντας αέριο και οξύ. Η ιδιότητα αυτή των βακτηρίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την ανάπτυξή τους τόσο εντερικά (αναερόβια) όσο και εξωεντερικά (αερόβια ή αναερόβια) (Parveen et al., 2001).

Η *E. coli* αποτελεί τον πιο συνήθη αερόβιο μικροοργανισμό στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων και αποβάλλεται σε μεγάλους πληθυσμούς στα κόπρανα. Επομένως, η ανίχνευση της σε νερά και είδη διατροφής συνιστά δείκτη επιμόλυνσης

κοπρανώδους προέλευσης (Κοτζεκίδου, 2016). Παρόλου που αποτελεί απαραίτητο μέλος της φυσικής εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου (όπου συμβάλλει στην παραγωγή της βιταμίνης Κ), θεωρείται βακτήριο με παθογόνο δράση καθώς προκαλεί πληθώρα εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων (Κοντοτόλης, 2016).



Εικόνα 4.2.1.2 Αντιγονική σύσταση του *E. coli*

Τα στελέχη *E. coli* διαχωρίζονται ορολογικά με βάση τα αντιγόνα Ο (σωματικά), Η (μαστιγίων) και Κ (κάψας) (Εικόνα 4.2.1.2). Σήμερα υπάρχουν πάνω από 700 αναγνωρισμένοι αντιγονικοί τύποι (ορότυποι) της *E. coli* που διαχωρίζονται με βάση τα αντιγόνα Ο, Η και Κ (Κοντοτόλης, 2016). Τα παθογόνα στελέχη κατηγοριοποιούνται σε έξι ομάδες (Κοτζεκίδου, 2016; Παπαδοπούλου, 2014) :

- Τα εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (EPEC)
- Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC)
- Τα εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (EIEC)
- Τα εντεροσυσσωρευτικά *E. coli* (EAEC)
- Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC)
- Τα εντεροπροσκολλητικά – συγκολλητικά στελέχη *E. coli* (DAEC)

Η *E. coli* γενικά αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 7 – 48 °C. Εξάιρεση αποτελούν τα εντεροτοξινογόνα στελέχη (ειδικά ο ορότυπος O157:H7) που χαρακτηρίζονται ως τα πιο ψυχρόφιλα, καθώς αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασίες 4 – 5 °C ή και χαμηλότερα. Μάλιστα, ο ορότυπος O157:H7 μπορεί να επιβιώσει στους – 20 °C για διάστημα 9 μηνών. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες στις οποίες αντέχουν τα περισσότερα

στελέχη είναι 55 °C για 5 λεπτά και 60 °C για 1 λεπτό. Ο μικροοργανισμός καταστρέφεται με θέρμανση στους 68,5 °C για μερικά δευτερόλεπτα (Κοτζεκίδου, 2016; Παπαδοπούλου, 2014).

Το στέλεχος *E. coli* O157:H7 σχηματίζει μηχανισμούς άμυνας στο όξινο στρες όταν εκτεθεί σε χαμηλές τιμές pH, με αποτέλεσμα να επιβιώνει στο όξινο περιβάλλον σε θερμοκρασίες ψύξης. Η ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του βακτηρίου είναι 4 – 4,5. Επιπλέον, όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσει μηχανισμούς άμυνας στο όξινο στρες αποκτά παράλληλα αντοχή στη θέρμανση, στην ακτινοβολία και στα χημικά συντηρητικά (Κοτζεκίδου, 2016).

Τα συμπτώματα της μόλυνσης από *E. coli* ποικίλουν και εξαρτώνται από το παθογόνο στέλεχος που προκαλεί την τροφολοίμωξη. Η εντεροτοξινογόνος *E. coli* (ETEC) παράγει μια θερμοευαίσθητη (LT) και μία θερμοανθεκτική (ST) τοξίνη και δημιουργεί συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της χολέρας (διάρροια, ναυτία, έμετος, πυρετός, αφυδάτωση κλπ.). Η εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC) ευθύνεται κυρίως για περιστατικά βρεφικής διάρροιας. Η νόσος εκδηλώνεται μετά την προσκόλληση των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (υδαρής διάρροια) ή την οξεία καταστροφή του ιστού (αιματηρή διάρροια) και είναι μεταδοτική. Η εντεροαιμοραγική *E. coli* (EHEC) προσβάλλει άτομα όλων των ηλικιών και προκαλεί οξεία διάρροια συνοδευόμενη από αιμορραγική κολίτιδα. Το 5-10% των ασθενών κάτω των 10 ετών εμφανίζουν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο το οποίο σχετίζεται με νεφρική ανεπάρκεια με ποσοστό θνησιμότητας 3 – 5%. Το συνηθέστερο στέλεχος EHEC είναι το *E. coli* O157:H7 (Κεχαγιά and Οικονομοπούλου, 2021).

Η παρουσία της *E. coli* στο υδάτινο περιβάλλον οφείλεται στην μετάδοση παθογόνων στελεχών από περιττώματα χερσαίων ζώων και ανθρώπων στις θάλασσες, ιδίως σε περιόδους έντονων βροχοπτώσεων (Kijewska et al., 2023). Έτσι ο μικροοργανισμός συσσωρεύεται στα δίθυρα μαλάκια, τα οποία τρέφονται με διήθηση του μολυσμένου ύδατος. Η κατανάλωση ωμών η ανεπαρκώς μαγειρεμένων μυδιών θα μπορούσε δυνητικά να προκαλέσει τροφολοίμωξη από *E. coli* (Κοντοτόλης, 2016).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Ε.Ε 492/1991) οι περιοχές στις οποίες καλλιεργούνται τα δίθυρα μαλάκια χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το επίπεδο της μόλυνσης από *E. coli* που προσδιορίζεται με τη μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων (Kijewska et al., 2023; Κοντοτόλης, 2016) :

Πίνακας 4.2.1 Κατηγορίες περιοχών καλλιέργειας οστρακοειδών. Πηγή: Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Ε.Ε 492/1991)		
Κατηγορία	Most Probable Number (MPN/100g σάρκας οστρακοειδών)	Χαρακτηρισμός της περιοχής
Κατηγορία Α	20 – 220	Χαμηλή μόλυνση – οστρακοειδή κατάλληλα για κατανάλωση
Κατηγορία Β	230 – 4600	Μέτρια μόλυνση – τα οστρακοειδή πρέπει να υποστούν επεξεργασία πρώτου καταναλωθούν
Κατηγορία C	4600 - 46000	Υψηλή μόλυνση – τα οστρακοειδή πρέπει να υποστούν εξυγίανση τουλάχιστον 2 μήνες πριν την κατανάλωση

Το *E. coli* χρησιμοποιείται ως οργανισμός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης των λυμάτων καθώς και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού των μαλακίων μετά την αλίευση τους (Kijewska et al., 2023).

Η *E. coli* βρίσκεται συχνότερα σε νωπά τρόφιμα ζωικής προέλευση όπως γάλα, κρέας, πουλερικά ή σε ανεπαρκώς επεξεργασμένα τρόφιμα παρά σε αντίστοιχα προϊόντα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία (Παπαδοπούλου, 2014).

Τα βασικότερα μέτρα για την αποφυγή τροφολοίμωσης από *E. coli* είναι ικανοποιητική θερμική επεξεργασία, καλή ψύξη των τροφίμων αμέσως μετά την θερμική επεξεργασία, χλωρίωση του νερού και τήρηση κανονισμών ορθής υγιεινής πρακτικής σε όλη την αλυσίδα παραγωγής των τροφίμων (Κοτζεκίδου, 2016).

5. Επίδραση μεθόδων συσκευασίας στην μικρογλωρίδα των θαλασσινών

Εκτός από την αποθήκευση των ιχθυηρών σε χαμηλές θερμοκρασίες, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι για την διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων και την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Μεταξύ αυτών, η συντήρηση και συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα θεωρείται από τις πιο σημαντικές μεθόδους καθώς αποδεδειγμένα επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής των προϊόντων διατροφής (Κοντοτόλης, 2016).

Τα αέρια που χρησιμοποιούνται για την ατμόσφαιρα MAP είναι το O₂, το CO₂ και το N₂. Η συγκέντρωση των αερίων στο μίγμα της τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασίας ποικίλει και εξαρτάται από τη φύση του προϊόντος στο οποίο εφαρμόζεται. Οι πιο συχνοί συνδυασμοί είναι (Κοτζεκίδου, 2016):

- Τροποποιημένη ατμόσφαιρα με υψηλό ποσοστό οξυγόνου (έως 70%), μαζί με 20-30% διοξείδιο του άνθρακα και 0 – 20% άζωτο. Χρησιμοποιείται συνήθως για συντήρηση βοδινού κρέατος.
- Τροποποιημένη ατμόσφαιρα με χαμηλό ποσοστό οξυγόνου (έως 10%), μαζί με 20-30 % διοξείδιο του άνθρακα και αντίστοιχη συγκέντρωση αζώτου.


Η παρουσία του CO₂ στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρατείνει σημαντικά τη φάση προσαρμογής και ελαττώνει τον ειδικό ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών σε αντίθεση με την αερόβια συσκευασία σε χαμηλές θερμοκρασίες (Nosedo et al., 2012). Η αντιμικροβιακή δράση του CO₂ αποδίδεται στην απορρόφηση του από την επιφάνεια του τροφίμου και στην παραγωγή ανθρακικού οξέος, το οποίο δίσταται και μειώνει το pH. Η δράση του αυτή ενισχύεται μειούμενης της θερμοκρασίας, καθώς η διαλυτότητα του μορίου αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Κοτζεκίδου, 2016).

Το O₂ χρησιμοποιείται σε χαμηλά επίπεδα καθώς επιτρέπει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα θαλασσινά (Sivertsvik et al., 2002). Εντούτοις, η πλήρης έλλειψη O₂ από την ατμόσφαιρα συσκευασίας θα ευνοούσε την ανάπτυξη του υποχρεωτικά αναερόβιου παθογόνου βακτηρίου *Clostridium botulinum*, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Έτσι σε όλες τις συσκευασίες MAP συνιστάται ελάχιστη συγκέντρωση O₂ 5 – 10 % για την παρεμπόδιση της αύξησης του βακτηρίου (Lannelongue et al., 1982).

Το N₂ ανήκει στα αδρανή αέρια και δεν εμφανίζει βακτηριοστατικές ιδιότητες. Στη συσκευασία MAP όμως χρησιμοποιείται σαν αντικαταστάτης του O₂ καθώς επιβραδύνει την οξειδωτική τάγγιση και αναστέλλει την ανάπτυξη αερόβιων σηψιγόνων μικροοργανισμών. Επίσης συμβάλλει στην διατήρηση του σχήματος της συσκευασίας και στη παράταση του χρόνου συντήρησης των προϊόντων MAP (Sivertsvik et al., 2002; Κοτζεκίδου, 2016).

Η αντιμικροβιακή δράση του CO₂ εξαρτάται από την μικροχλωρίδα και τα χαρακτηριστικά του τροφίμου. Γενικά, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια επηρεάζονται περισσότερο από τη δράση του CO₂ από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, με τα *Pseudomonas* spp. να είναι τα πιο ευαίσθητα και τα *Clostridium* spp. τα πιο ανθεκτικά (Πίνακας 5.1) (Jay et al., 2005).

Πίνακας 5.1 Μικροοργανισμοί κατά αύξουσα σειρά ανθεκτικότητας σε συγκεντρώσεις 20 – 30% CO₂ και ανάπτυξη τους (✓) ή μη (-) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας με υψηλή συγκέντρωση O₂ (A) ή με χαμηλή συγκέντρωση (B). Πηγή (Κοτζεκίδου, 2016).

Μικροοργανισμός	Ανθεκτικότητα CO ₂	A	B
	(20 – 30%)	(μέχρι 70% O ₂)	(μέχρι 10% O ₂)
<i>Pseudomonas, Psychrobacter, Acinetobacter, Moraxella</i>		✓	-
<i>Aeromonas</i> spp.		✓	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>		✓	✓
<i>Bacillus</i> spp.		✓	-
<i>Enterobacteriaceae</i>		✓	✓
<i>Enterococcus</i>		✓	✓
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		✓	✓
<i>Photobacterium phosphoreum</i>		✓	✓
Γαλακτικά βακτήρια		✓	✓
<i>Clostridium</i> spp.		-	✓

Όπως καταδεικνύεται και από τον Πίνακα 5.1, χαμηλές συγκεντρώσεις CO₂ φαίνεται να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των γενών *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Moraxella*. Γενικά θεωρείται πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του CO₂ ενισχύεται και η βακτηριοστατική του ικανότητα. Εξαιρέση αποτελούν παθογόνα στελέχη όπως *Clostridium perfringens* και *Clostridium botulinum* τα οποία δεν επηρεάζονται από την

παρουσία CO₂ και ευδοκιμούν σε αναερόβιες συνθήκες. Από την άλλη, τα γαλακτικά βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη ενισχύεται από το CO₂, παράγουν διάφορα οξέα και υπεροξείδια τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Clostridium* spp. (Κοτζεκίδου, 2016). Έτσι τα Gram θετικά αυτά βακτήρια κυριαρχούν στην μικροχλωρίδα των ιχθυηρών συσκευασμένων σε κενό ή σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Λουγκοβόης, 2021).

Παρόλο που η ανάπτυξη των αλλοιογόνων βακτηρίων *Pseudomonas* και *Shewanella* αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία του CO₂ (<10⁵-10⁶ cfu/g), η εμπορική διάρκεια ζωής των θαλασσινών αποθηκευμένων σε MAP δεν παρατείνεται σημαντικά (Gram and Huss, 1996). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη του ανθεκτικού στο CO₂ *Photobacterium phosphoreum* που αυξάνεται σε πληθυσμούς της τάξης των 10⁷-10⁸ cfu/g (Dalgaard, 2003). Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από την εμφάνιση μεγάλης ποσότητας τριμεθυλαμίνης (TMA) και έντονης οσμής αμινών, καθώς το *P. phosphoreum* παράγει ανά κύτταρο 30 φορές περισσότερη τριμεθυλαμίνη από το *S. putrefaciens* (Dalgaard, 1995). Ωστόσο το *P. phosphoreum* έχει αποδειχθεί ευαίσθητο στη θερμότητα αλλά και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι, μια προεργασία κατάψυξης πριν την συσκευασία με CO₂ εξαλείφει την ανάπτυξη του βακτηρίου και παρατείνει τη διάρκεια ζωής του τροφίμου (Gram, 2009).

Για την αποτελεσματική συντήρηση των θαλασσινών σε περιβάλλον τροποποιημένης ατμόσφαιρας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις CO₂ μεγαλύτερες από 20%. Σύμφωνα με μελέτη αποθήκευσης αλιευμάτων σε ατμόσφαιρα CO₂, παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας συντήρησης των ψαριών μέχρι και 1 μήνα σε περιβάλλον με 50% CO₂ και 50% O₂ ή σε 100% CO₂. Πρακτικά όμως θεωρείται πιο εφικτή η χρήση ατμόσφαιρας με 50% CO₂ και 50% O₂ συγκριτικά με τη χρήση 100% CO₂ (Κοτζεκίδου, 2016).

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε μια ανασκόπηση των σημαντικότερων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που συναντώνται στα μαλάκια. Τα βακτήρια αυτά ενδέχεται να αποτελούν είτε μέλη της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας των μαλακίων είτε να προέρχονται από επιμόλυνση κατά την αλίευση, την αποθήκευση ή την επεξεργασία τους. Η αρχική μικροβιακή χλωρίδα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η εποχή (αύξηση πληθυσμών ορισμένων παθογόνων τους καλοκαιρινούς μήνες), η θερμοκρασία (θερμά νερά – Gram θετικά βακτήρια, ψυχρά νερά – Gram αρνητικά) και ο βαθμός μόλυνσης των υδάτων. Ο τελευταίος καταδεικνύεται από την ύπαρξη «μικροβίων δεικτών» όπως τα *Enterobacteriaceae* και οφείλεται στην κοπρανώδη μόλυνση των υδάτων από λύματα, η οποία εντείνεται από την παγκόσμια κλιματική αλλαγή. Τα μαλάκια ειδικότερα φαίνεται να είναι εξαιρετικά ευπαθή στην θαλάσσια ρύπανση διότι προσλαμβάνουν την τροφή τους διηθώντας τα μολυσμένα ύδατα. Η συσσώρευση των παθογόνων μικροοργανισμών στα μαλάκια εγείρει μεγάλη ανησυχία καθώς τα συγκεκριμένα ζώα τις περισσότερες φορές καταναλώνονται ωμά, χωρίς να έχουν υποστεί καμία επεξεργασία για την μείωση του μικροβιακού τους φορτίου.

Από το πλήθος των βακτηρίων που ανιχνεύονται στα μαλάκια κατά τα αρχικά στάδια της αλυσίδας παραγωγής, μόνο ορισμένα μπορούν να προσαρμοστούν στις μετέπειτα συνθήκες αποθήκευσης και να αναπτυχθούν στο τρόφιμο, προκαλώντας αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και στα μαλάκια που συντηρούνται με ψύξη περιλαμβάνουν τα είδη *Pseudomonas* και *Shewanella putrefaciens*. Το ποιο από τα δύο είδη θα επικρατήσει στην αλλοιογόνο χλωρίδα των μαλακίων φαίνεται να εξαρτάται από την γεωγραφική περιοχή στην οποία αλιεύονται. Συγκεκριμένα στα ψάρια ψυχρών υδάτων, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις τριμεθυλαμίνης κυριαρχεί η *Shewanella* χάρη στην ικανότητα της να ανάγει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης. Αντιθέτως, στα ψάρια εύκρατων υδάτων όπου η παρουσία τριμεθυλαμίνης είναι περιορισμένη κυριαρχούν οι *Pseudomonas*, χάρη στην ιδιότητά τους να παράγουν σιδηροφόρα.

Όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, οι κυριότεροι που ανιχνεύτηκαν στα μαλάκια είναι οι *Vibrio*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Salmonella*, *E.coli* και *Listeria*. Ανάμεσα στα παθογόνα βακτήρια και τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς παρατηρείται έντονος ανταγωνισμός για την επικράτηση στο τρόφιμο με τους αλλοιογόνους να

πολλαπλασιάζονται ταχύτερα. Έτσι η αλλοίωση του τροφίμου γίνεται εμφανής πολύ πριν την ραγδαία αύξηση των παθογόνων και την παραγωγή τοξίνης, προειδοποιώντας τον καταναλωτή για τον κίνδυνο που επιφυλάσσει το προϊόν. Παρόλα αυτά κρίνεται αναγκαία και η λήψη κατάλληλων μέτρων πρόληψης των τροφολοιμώξεων που θα αφορούν τόσο την αλυσίδα παραγωγής όσο και τον έλεγχο της επιμόλυνσης των υδάτων.

Ένα από αυτά τα μέτρα συνιστά και η αποθήκευση των ευαλλοίωτων τροφίμων σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει επιτυχία στα θαλασσινά καθώς φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη των EAM *Pseudomonas* και *Shewanella*. Παρόλα αυτά, πρέπει να εφαρμόζεται συμπληρωματικά με άλλες μεθόδους επεξεργασίας για την μέγιστη ασφάλεια των τροφίμων, καθώς υπάρχουν μικροοργανισμοί όπως το *Photobacterium phosphoreum* και τα γαλακτικά βακτήρια που δεν θανατώνονται από την μέθοδο αυτή.

Συνοψίζοντας την παρούσα πτυχιακή εργασία εξάγεται το συμπέρασμα πως η ομάδα των μαλακίων χρήζει περαιτέρω έρευνας για την διερεύνηση της ακριβούς μικροβιακής της χλωρίδας. Η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών που μελετήθηκαν για την εκπόνηση αυτών των αποτελεσμάτων αναφέρονται σε προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού με συμβατικά μέσα όπως καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα. Σύμφωνα με έρευνες όμως αποδεικνύεται πως η OMX που απεικονίζεται σε ένα τρυβλίο αποτελεί μόλις το 1% του ολικού πληθυσμού. Γι' αυτό το λόγο θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιούνται πιο σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης που θα δίνουν πιο αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα. Αξιοποιώντας αυτές τις σύγχρονες τεχνολογικές μεθόδους θα διαμορφωθεί μια πιο ξεκάθαρη εικόνα του μικροβιακού φορτίου των μαλακίων.

7. Βιβλιογραφία

- Agnieszka Kijewska, Aleksandra Koroza, Katarzyna Grudlewska-Buda, Tomasz Kijewski, Natalia Wiktorczyk-Kapischke, Katarzyna Zorena, Krzysztof Skowron, 2023. Molluscs—A ticking microbial bomb 33, 19.
- Alicia E. Toranzo, Beatriz Magariños, Jesús L. Romalde, 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61.
- Antonio Raposo, Esteban Perez, Catarina Tinoco de Faria, Maria Antonia Ferus, 2016. Food Spoilage by *Pseudomonas* - An Overview, in: *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*. Om V. Singh, pp. 41–71.
- Antonios E. Goulas, Michael G. Kontominas, 2004. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* 93, 511–520.
- Aoife Howard, Michael O’Donoghue, Audrey Feeney, Roy D. Sleator, 2012. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3, 243–250.
- B D Spangler, 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56, 622–47.
- Barbara H. Iglewski., 1996. Chapter 27 *Pseudomonas*, in: *Medical Microbiology*. Samuel Baron, University of Texas Medical Branch at Galveston;, pp. 245–260.
- Baumann P, A.L. Furniss, J.V. Lee, 1984. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed. The Williams & Wilkins Co.
- Bert Nosedá, Md Tariqul Islam, Markus Eriksson, Marc Heyndrickx, Koen De Reu, Herman Van Langenhove, Frank Devlieghere, 2012. Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology* 30, 408–419.
- C O Obuekwe, D W Westlake, F D Cook, J William Costerton, 1981. Surface changes in mild steel coupons from the action of corrosion-causing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 41, 766–774.
- Chaturika Jayasekara, Eresha Mendis, Se-Kwon Kim, 2020. Seafood in the Human Diet for Better Nutrition and Health. *Encyclopedia of Marine Biotechnology* 5, 2939–2959.
- Chengchu Liu, Nicholas V C Ralston, 2021. Seafood and health: What you need to know? *Advances in Food and nutrition research* 97, 275–318.

- David C Griffith, Louise A Kelly-Hope, Mark A Miller, 2006. Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995-2005. *Am J Trop Med Hyg* 75, 973–7.
- Donn R. Ward, Cameron Hackney, 1991. *Microbiology of Marine Food Products*, 1st ed. Springer New York, NY.
- Dorthe Bagge, Mette Hjelm, Charlotte Johansen, Ingrid Huber, Lone Gram, 2001. *Shewanella putrefaciens* Adhesion and Biofilm Formation on Food Processing Surfaces. *Appl Environ Microbiol* 5, 2319–2325.
- Dr. D. B. Bhure, Dr. S. S. Nanware, Dr. M. S. Kadam, Dr. N. R. Jaiswa, 2022. *Limnology*, 1st ed. Bhumi Publishing.
- Eirini Tsigarida, Ioannis S. Boziaris, George-John E. Nychas, 2003. Bacterial Synergism or Antagonism in a Gel Cassette System. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7204–7209.
- Elizabeth Reames, 2012. *Nutritional Benefits of Seafood*.
- Faye M. Dong, 2009. *The Nutritional Value of Shellfish*.
- Fiona J. Cooke, Mary P.E. Slack, 2017. 183 - Gram-Negative Coccobacilli, in: *Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 1611–1627.
- Foteini F. Parlapani, 2021. Microbial diversity of seafood. *Current Opinion in Food Science* 37, 45–51.
- Frerk Feldhusen, 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2, 1651–1660.
- Hackey, C.R., Merle D. Pierson, 1994. *Environmental Indicators and Shellfish safety*, 1st ed. Springer New York, NY.
- Hilde Herland, Margrethe Esaiassen, Marie Cooper, Ragnar L. Olsen, 2009. Changes in trimethylamine oxide and trimethylamine in muscle of wild and farmed cod (*Gadus morhua*) during iced storage. *Aquaculture Research* 41, 95–102.
- I. N. A. Ashie, J. P. Smith, B. K. Simpson, Dr. Norman F. Haard, 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 87–121.
- Ioannis S. Boziaris, Foteini F. Parlapani, 2017. Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish, in: *The Microbiological Quality of Food*. pp. 61–98.
- Jaejoon Jung, Woojun Park, 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 2533–2548.
- James M. Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden, 2005. *Modern Food Microbiology*, 7th ed, Food Science Text Series. Springer New York, NY.

- Jesús-Ángel Santos, María-Luisa García-López, Andrés Otero, 1999. MORAXELLA, in: Encyclopedia of Food Microbiology. pp. 1487–1492.
- Jos H.J. Huis in't Veld, 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1–18.
- L. Gram, 2009. Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products, in: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer, New York, NY, pp. 87–119.
- Leroi Françoise, Joffraud Jean-Jacques, 2011. Microbial degradation of seafood. *Aquaculture Microbiology and Biotechnology* 2, 47–72.
- Lone Gram, Hans Henrik Huss, 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121–137.
- Lone Gram, Paw Dalgaard, 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262–266.
- M Lannelongue, G Finne, M O Hanna, R Nickelson 2nd, C Vanderzant, 1982. Microbiological and Chemical Changes During Storage of Swordfish (*Xiphias gladius*) Steaks in Retail Packages Containing CO₂-Enriched Atmospheres. *Journal of food protection* 45, 1197–1203.
- M. Satomi, 2014. *Shewanella*, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello, pp. 397–407.
- M.E. Martino, L. Fasolato, B. Cardazzo, 2016. *Aeromonas*, in: *Encyclopedia of Food and Health*. pp. 61–67.
- Morten Sivertsvik, Willy K. Jeksrud, Jan Thomas Rosnes, 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - Significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science & Technology* 37, 107–127.
- National Academy of Science, 1991. *Seafood Safety*. The National Academies Press, Washington, D.C.
- P. Kämpfer, 2014. *Acinetobacter*, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. pp. 11–17.
- Paul Baumann, 1968. Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology* 96, 39–42.
- Paw Dalgaard, 2003. Spoilage of seafood, in: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, London, pp. 2462–2472.
- Paw Dalgaard, 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319–333.

- Rendi L Murphee, Mark L Tamplin, 1995. Uptake and Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3556–3660.
- R.H. Dainty, 1996. Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33, 19–33.
- Richard Pallardy, 2016. list of mollusks. *Encyclopedia Britannica*.
- Ridgway F, Safarik J, 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 3565–3575.
- Rodrigo Scherer, Paula Rossini Augusti, Vivian Caetano Bochi, Camila Steffens, Leadir Lucy Martins Fries, Ana Paula Daniel, Ernesto Hashime Kubota, João Radünz Neto, Tatiana Emanuelli, 2006. Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry* 99, 136–142.
- Rong Cao, Chang Hu Xue, Yong Xue, 2009. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech J Food Sci* 2, 102–108.
- Ryota Hosom, Munehiro Yoshida, Kenji Fukunaga, 2012. Seafood Consumption and Components for Health. *Global Journal of Health Science* 4, 72–86.
- Salina Parveen, Nancy C Hodge, Robert E Stall, Samuel R Farrah, Mark L Tamplin, 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Water Research* 35, 379–386.
- Seafood Nutrition Overview [WWW Document], n.d. . SEAFOOD HEALTH FACTS. URL <https://www.seafoodhealthfacts.org/nutrition/seafood-nutrition-overview/>
- Shirin A Mazumder, 2023. *Acinetobacter* [WWW Document]. Medscape.
- Sonia Qureshi, Farah Naz Qamar, 2020. 51 - Miscellaneous Bacterial Enteritides, in: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. pp. 512–517.
- Steven L. Percival, David W. Williams, 2014a. Chapter Twelve - *Vibrio*, in: *Microbiology of Waterborne Diseases*. pp. 237–248.
- Steven L. Percival, David W. Williams, 2014b. Chapter Three - *Aeromonas*, in: *Microbiology of Waterborne Diseases*. pp. 49–64.
- T. A. Roberts, J.-L. Cordier, L. Gram, R. B. Tompkin, J. I. Pitt, L. G. M. Gorris et al, 2005a. Fish and fish products, in: *Microorganisms in Foods 6 Microbial Ecology of Food Commodities*. Springer New York, NY, pp. 174–249.

- T. A. Roberts, J.-L. Cordier, L. Gram, R. B. Tompkin, J. I. Pitt, L. G. M. Gorris, K. M. J. Swanson, 2005b. *Microorganisms in Foods 6*, 2nd ed. Springer New York, NY.
- Tatsuo Kaneko, Rita R. Colwell, 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol* 113, 24–32.
- Vasiliki R. Kyrana, Vladimiro P. Lougovois, 2002. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 319–328.
- Véronique de Berardinis, Maxime Durot, Jean Weissenbach, Marcel Salanoubat, 2009. *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology 12, 568–576.
- W Gary Hlady, 1997. *Vibrio* Infections Associated with Raw Oyster Consumption in Florida. *J Food Prot* 60, 353–357.
- Wan Norhana M.N, Poole S.E, Deeth H.C, Dykes G.A, 2010. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control* 21, 343–361.
- X. Yang, 2014. Moraxellaceae, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello, pp. 826–833.
- Αναγνωστόπουλος Δημήτριος, 2016. Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 10°C (ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, Βόλος.
- Ανθμία Μπατρίνου, 2012. Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί.
- B. Λουγκοβόης, B. Κυρανά, 2019. ΟΔΗΓΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ, 1.1. ed.
- Βλαδίμηρος Λουγκοβόης, 2021. Αυτόλυση και Μικροβιακή Αλλοίωση Νωπών Ιχθυηρών.
- Γεωργιος - Ιωάννης Νύχας, Ευστάθιος Πανάγου, n.d. *Μικροβιολογία Τροφίμων I*, Ενότητα 11: Εξωγενείς Παράγοντες - Θερμοκρασία.
- Γιαβάσης Ιωάννης, n.d. *Μικροβιολογία Τροφίμων*.
- Δ. Κουτσούμπας, n.d. ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ Εχινόδεσμα, Ημιχορδωτά, Ουροχορδωτά, Κεφαλοχορδωτά.
- Δ. Κουτσούμπας, n.d. ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ Πλακόζωα Σπόγγοι Κνιδόζωα Κτενοφόρα.
- Ευγενία Μπεζιρτζόγλου, 2004. *Μικροβιολογία Τροφίμων και πεπτικού συστήματος*, 1η Έκδοση. ed. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ.

- Κοντοτόλης Στέφανος, 2016. Αλλοιωγόνους και Παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθουρα μαλάκια (ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ Π.Δ.Ε.). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ.
- Κουτσουμάνης Π. Κωνσταντίνος, 2000. Μικροβιακή Αλλοίωση των ιχθυηρών και πρόβλεψη της διάρκειας ζωής (Διδακτορική Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.
- Μιχάλης Πλαστήρας, 2016. Μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια καρκινοειδών (ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, Βόλος.
- Π. Κοτζεκίδου - Ρούκα, 2016. Μικροβιολογία Τροφίμων και Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων. Γιαχούδη.
- Σοφία Λαζαρίδου, 2018. ΕΠΙΚΑΛΥΨΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΦΡΕΣΚΙΕΣ ΓΑΡΙΔΕΣ (ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ). ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ.
- Τζεμαλή Κεχαγιά, Γεωργία Οικονομοπούλου, 2021. Εντεροβακτήρια που συναντάμε στα τρόφιμα και η συμπεριφορά τους στα αντιβιοτικά (Πτυχιακή Εργασία). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.
- Χειμωνά Α. Δήμητρα, 2018. Επίδραση της προσθήκης γλυκόζης στις μικροβιολογικές μεταβολές και τον εμπορικό χρόνο ζωής φιλέτων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) σε συντήρηση υπό ψύξη (ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, Βόλος.
- Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, 2014. Μικροβιολογία και Υγιεινή Τροφίμων, 3η έκδοση. ed. ΚΩΣΤΑΡΑΚΗ.