



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Επίδραση εναιωρημάτων καπνών στην κινητική αύξηση του
Listeria monocytogenes »**

Βασίλειος Κατρανάς

Βόλος 2021-2023

« Επίδραση εναιωρημάτων καπνών στην κινητική αύξηση του

Listeria monocytogenes »

«Effect of liquid smoke suspensions on growth kinetics of

Listeria monocytogenes»

Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Κωνσταντίνος Κ. Κορμάς**, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*
- 3) **Φωτεινή Παρλαπάνη**, Επικ Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παιδεία, καθάπερ ευδαίμων χώρα, πάντα τ' αγαθά φέρει.

Σωκράτης, 469-399 π.Χ., Φιλόσοφος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν και με βοήθησαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία αποτελεί αποτέλεσμα σκληρής δουλειάς, προσπάθειας και αναζήτησης. Δε θα έφτανε ποτέ όμως στο επιθυμητό αποτέλεσμα εάν δεν είχα την καθοδήγηση και τη τέλεια συνεργασία με την εξειδικευμένη ομάδα του Εργαστηρίου Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον Διευθυντή του Εργαστηρίου και Επιβλέποντα Καθηγητή μου τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη ο οποίος ήταν πάντα διαθέσιμος και υποστηρικτικός κατά τη σύνταξη αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή η οποία ήταν τόσο υποστηρικτική, και με την συμπαράστασή της αλλά και την καθοδήγησή της φτάσαμε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα κα Σπυροπούλου Φαίδρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της η οποία ήταν καταλυτική και πολύτιμη. Χάρη στην άψογη συνεργασία και καθοδήγηση το αποτέλεσμα της εργασίας αυτής ανήκει στην κοινή προσπάθεια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κακάση Στέφανο του οποίου η βοήθεια υπήρξε άκρως σημαντική κυρίως στο πειραματικό κομμάτι.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία μελετήθηκε η επίδραση εναιωρημάτων υγρών καπνών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και αλιευτικών προϊόντων, έναντι του παθολογικού μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στελέχους Pirie 21075 B 127. Η επίδραση των καπνών L9, G6, C3, DA, A1, E5 μελετήθηκαν με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 580 nm σε τρεις διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Κάθε καπνός μελετήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις και έναντι τριών (3) διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών της τάξεως των (10^3 , 10^5 και 10^7 cfu/ml) και για σαράντα οκτώ (48) ώρες αφού έγινε η πλήρωση των μικροπλακών υπο ασηπτικές συνθήκες τοποθετήθηκαν στους 30°C χρησιμοποιώντας το Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader. Ο καπνός C3 σε συγκέντρωση 0,1% με μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml είχε παρεμποδιστική δράση έναντι του παθολογικού μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127, αφού δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού. Τα αποτελέσματα της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας έδειξαν ότι ο καπνός C3 θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό όπλο στη βιομηχανία τροφίμων και αλιευτικών προϊόντων έναντι της αύξησης του παθολογικού μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

Λέξεις – Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, υγρή κάπνιση, παρεμπόδιση αύξησης, οπτική πυκνότητα,

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Μεταποίηση και συντήρηση αλιευμάτων.....	1
1.2 Κάπνιση.....	1
1.3 Είδη κάπνισης.....	2
1.3.1 Θερμή κάπνιση.....	2
1.3.2 Ψυχρή κάπνιση.....	3
1.3.3 Υγρή κάπνιση.....	3
1.4 Σύσταση καπνού.....	4
1.5 Καπνιστά είδη.....	5
1.6 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων.....	5
1.7 Μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων	6
1.8 Το Listeria ως μικροοργανισμός και η λιστερίωση ως ασθένεια.....	9
1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	9
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	10
2.2 Αναζωογόνηση παθογόνου μικροοργανισμού.....	10
2.3 Παρασκευή θρεπτικών συστατικών	10
2.4 Υγροί καπνοί	11
2.5 Μέτρηση Οπτικής πυκνότητας	12
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	14

3.1 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών L9 και G6 στην αύξηση του <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3.2 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών C3 και D4 στην αύξηση του <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.3 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών A1 και E5 στην αύξηση του <i>Listeria monocytogenes</i>	25
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	33
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
7. ABSTRACT.....	38
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	1

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταποίηση και συντήρηση αλιευμάτων

Μεταποίηση είναι το σύνολο των πράξεων και διαδικασιών όπου οι πρώτες ύλες (δηλαδή τα αλιεύματα) μετατρέπονται σε προϊόντα και διατίθενται στην αγορά. Όλες οι πρώτες ύλες, προκειμένου να διατεθούν στην αγορά ως προϊόντα προς κατανάλωση, υπόκεινται σε κάποια επεξεργασία. Η μεταποίηση των αλιευμάτων έχει ως κύριο σκοπό τη συντήρηση των προϊόντων, δηλαδή την παρεμπόδιση της ποιοτικής υποβάθμισης και την εξασφάλιση της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων. Σήμερα η μεταποίηση είναι πολλά παραπάνω από την απλή μετατροπή της πρώτης ύλης σε τελικό προϊόν. Η σύγχρονη μεταποίηση είναι μια συνεχώς εξελισσόμενη τεχνολογικά μέθοδος, καθώς έχει πολλαπλές επιδράσεις στη ζωή μας. Απαιτεί τεχνοκρατικό σχεδιασμό και εξειδικευμένα συστήματα διοίκησης ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία κάθε κύκλος παραγωγής και παρασκευής των τελικών προϊόντων. Κάποιες μέθοδοι συντήρησης τροφίμων και ειδικά αλιευμάτων είναι η ψύξη, η κατάψυξη, η συσκευασία σε μείγματα αερίων (MAP), η θερμική επεξεργασία, η αλάτιση, το μαρινάρισμα και η κάπνιση. Ο στόχος των παραπάνω μεθόδων συντήρησης των αλιευμάτων είναι η παρεμπόδιση της αύξησης ή της αδρανοποίησης αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών με σκοπό τη διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Με την επεξεργασία, τα αλιεύματα μπορούν να διατηρηθούν για αρκετό χρονικό διάστημα σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των νωπών προϊόντων, ενώ παράλληλα να φέρουν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως χρώμα, γεύση, άρωμα κτλ (Μπλούκας, 2004).

1.2 Κάπνιση

Τα βασικά συστατικά του καπνού ευθύνονται για την επίδραση του καπνίσματος στα ψάρια. Η σύνθεση και οι ιδιότητες του καπνού εξαρτώνται από τον τύπο του ξύλου, τη χημική του σύνθεση, τις φυσικές του ιδιότητες και τις συνθήκες καύσης. Ξύλο από φυλλοβόλα δέντρα κυρίως οξιά, βελανιδιά, σημύδα (χωρίς φλοιό), λινάρι, σφένδαμο χρησιμοποιούνται για τη ποιοτική παραγωγή καπνού. Αυτά τα ξύλα δέντρων που προαναφέρθηκαν, καίγονται απαλά και παράγουν αρωματικό καπνό. Τα κωνοφόρα δέντρα όμως, δε συνιστώνται για τη μέθοδο της κάπνισης των αλιευμάτων διότι το ξύλο τους περιέχει σημαντικές ποσότητες ρητινών που δίνουν δυσάρεστη, πικρή γεύση και άρωμα καθώς και σκούρο χρώμα στα αλιεύματα. Με τη διαδικασία της κάπνισης επιδιώκεται η μείωση του βακτηριακού φορτίου των ψαριών, η μείωση της υγρασίας, η αδρανοποίηση των ενζύμων και ο εμπλουτισμός της σάρκας με ουσίες οι οποίες προέρχονται από τον καπνό και έχουν βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Τα στάδια της διαδικασίας καπνίσσεως των ψαριών είναι η προετοιμασία των ψαριών (δηλ. ο εκσπλαχνισμός, ο αποκεφαλισμός και το πλύσιμο των ψαριών), η αλάτιση με ξηρό αλάτι, η αφυδάτωση των ψαριών με φυσικά ή τεχνητά μέσα και τέλος η κάπνιση. Κύριο χαρακτηριστικό των καπνισθέντων ψαριών είναι το ιδιαίτερο άρωμα, η γεύση και ο χρωματισμός (Μποζιάρης 2012). Η κάπνιση θεωρείται ως μια πολύ συχνή μέθοδος για τη συντήρηση των τροφίμων, χάρη στη μείωση της ενεργότητας του νερού, όσο και στην περιεκτικότητα του φυσικού καπνού σε οργανικές ουσίες (φαινολικές) με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του καπνού στο αλίευμα είναι η υγρασία, ο αέρας, η θερμοκρασία, το ποσοστό οξυγόνου, ο χρόνος καύσης ακόμη και το είδος του ξύλου (Μποζιάρης 2012).

Με την τεχνική της κάπνισης και της θερμικής επεξεργασίας επιδιώκεται η μείωση του βακτηριακού φορτίου των ιχθύων, η αδρανοποίηση των ενζύμων και σπορίων, ο

εμπλουτισμός των ιστών με ουσίες με βακτηριοκτόνες ή βακτηριοστατικές ιδιότητες και ο περιορισμός της υγρασίας του αλιεύματος (Μποζιάρης 2013). Ο συνδυασμός της θερμικής επεξεργασίας, της δράσης των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του καπνού και η μειωμένη ενεργότητα του νερού προσφέρουν μεγάλη διάρκεια ζωής στα τρόφιμα. Βέβαια, στα καπνιστά αλιεύματα είναι πιθανό να βρεθούν χημικές ουσίες ανεξάρτητα από αυτές που θα περιείχε ο ιχθύς ως πρώτη ύλη. Πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό υδρογονανθράκων (PAHs) παίζει η θερμοκρασία, καθώς η συγκέντρωση των υδρογονανθράκων αυξάνεται αναλογικά κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης από τους 400 °C έως τους 100°C. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες δημιουργούνται από την καύση ξύλου σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 400 °C , όπως επίσης είναι γνωστό πως τα 200 είδη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων είναι καρκινογόνα (Belichovska et al 2019).

1.3 Είδη κάπνισης

Η διαδικασία της κάπνισης μπορεί να είναι θερμή, ψυχρή ή υγρή κάπνιση.

1.3.1 Θερμή κάπνιση

Η θερμή κάπνιση γίνεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 30 – 120 °C. Ήπια κάπνιση θεωρείται όταν οι θερμοκρασίες είναι (30 – 50 °C) και έντονη όταν οι θερμοκρασίες είναι (>50 °C). Με την κλασική μέθοδο της θερμής κάπνισης, η αφυδάτωση γίνεται σε θερμοκρασία από 30 έως 55°C με αποτέλεσμα οι ιχθύες να ψήνονται ελαφρά. Κατά το τέλος της κάπνισης το προϊόν στο κέντρο της μάζας του θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 70 – 80 °C. Στη συνέχεια το προϊόν ψύχεται το συντομότερο δυνατό. Η μέθοδος της θερμής κάπνισης είναι τουλάχιστον επτά (7) φορές ταχύτερη από τη μέθοδο της ψυχρής κάπνισης, και με τη μέθοδο αυτή οι ιχθύες

υπόκειται ως ένα βαθμό σε έψηση που έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη απορρόφηση των συστατικών του καπνού και τον μεγαλύτερο βαθμό αντίδρασης αυτών με τα συστατικά της σάρκας (Μποζιάρης 2012).

1.3.2 Ψυχρή κάπνιση

Με τη μέθοδο της ψυχρής κάπνισης, η αφυδάτωση γίνεται σε θερμοκρασία που δεν ξεπερνά τους 37 °C, καθώς ο χρόνος που μπορεί να διαρκέσει η διαδικασία είναι από μερικές ώρες μέχρι και μερικές εβδομάδες. Πριν από την έναρξη της διαδικασίας της ψυχρής κάπνισης και σύμφωνα με τη Νομοθεσία, τα προϊόντα συνηθίζεται να δέχονται μια προεργασία με αλάτισμα (νιτρικά/νιτρώδη άλατα) και κατόπιν ξεκινά η κάπνιση. Με τη μέθοδο της ψυχρής κάπνισης τα προϊόντα δεν ψήνονται αλλά ξηραίνονται και συντηρούνται στο ψυγείο.

1.3.3 Υγρή κάπνιση

Ο υγρός καπνός αποτελεί προϊόν συμπύκνωσης και κλασματικής απόσταξης του καπνού που προέρχεται από την ατελή καύση των ξύλων. Πρόκειται δηλαδή για διάλυμα συμπυκνωμένου καπνού σε νερό ή λάδι ή εκχύλισμα καπνού σε οργανικούς διαλύτες. Κατά τη διαδικασία της υγρής κάπνισης οι ιχθύες ψεκάζονται με διαλύματα υγρού καπνού ή βυθίζονται σε διαλύματα αυτού ορισμένης πυκνότητας. Η διαλυτότητα των φαινολών επηρεάζεται από την ολική οξύτητα του συμπληρώματος και επομένως επηρεάζεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Με τη μέθοδο της υγρής κάπνισης είναι δυνατός ο έλεγχος των ποσοτήτων των αρωματικών συστατικών που διοχετεύονται στο προϊόν και το κόστος της μεθόδου είναι μικρότερο. Επίσης με τη μέθοδο αυτή είναι εύκολος ο διαχωρισμός από τον υγρό καπνό των κλασμάτων και ουσιών που είναι

επικίνδυνα για τον καταναλωτή (π.χ. πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες :PAH) (Μποζιάρης 2012).

1.4 Σύσταση καπνού

Η χημική σύνθεση του καπνού και των συμπεκνωμάτων του δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Μέχρι τώρα 300 ενώσεις έχουν εντοπιστεί στον καπνό, 288 στο συμπύκνωμα και περίπου 68 σε καπνιστά τρόφιμα πράγμα το οποίο μαρτυρά την υψηλή αντιδραστική ικανότητα των βασικών συστατικών του καπνού (αλκοόλες, αλδεύδες, κετόνες, εστέρες) στα καπνιστά τρόφιμα όπως τα αλιεύματα. Οι πιο κοινές ενώσεις είναι οι φαινόλες οι οποίες συντελούν σε όλες τις επιδράσεις του καπνίσματος στο τρόφιμο. Ο καπνός αποτελείται από δύο φάσεις, την αέρια και εκείνη των έμμορφων συστατικών. Έμμορφα συστατικά θεωρούνται τα υγρά σωματίδια κολλοειδών ουσιών, χωρίς σταθερό πυρήνα όπως πίσσας, ρητινών, φαινολών υψηλού και χαμηλού σημείου βρασμού, τα οποία είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στην αέρια φάση η οποία τελεί και το ρόλο μεταφορέα τους. Ο καπνός είναι ένα εναιώρημα σταγονιδίων σε μια συνεχή αέρια φάση και ατμών που σταθεροποιούνται στα σταγονίδια με ηλεκτροστατικά φορτία. Οι πτητικές αυτές ουσίες είναι οι πιο σημαντικές για τη δημιουργία της γεύσης, του αρώματος και του χρώματος των καπνιστών προϊόντων καθώς και του βακτηριοστατικού ή βακτηριοκτόνου αποτελέσματος κατά την κάπνιση. Τα χαρακτηριστικά του καπνού είναι η θερμοκρασία του, βάσει της οποίας διαχωρίζονται και οι μέθοδοι κάπνισης (ψυχρή και θερμή), η σκουρότητά του που όσο μεγαλύτερη είναι τόσο ατελέστερη είναι η καύση των ξύλων, η υγρασία και η ταχύτητα κίνησής του που επηρεάζουν το χρόνο κάπνισης και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Κατά την κάπνιση, μερικά συστατικά εισχωρούν και διαχέονται στο εσωτερικό της σάρκας, ενώ τα διάφορα συστατικά του καπνού απορροφούνται από τα κενά που σχηματίζονται

μεταξύ των κυττάρων και των επιφανειακών στιβάδων των ιχθύων στο στάδιο της αποξήρανσής τους. Η σύσταση του καπνού εξαρτάται από το είδος του ξύλου, την χημική του σύνθεση, από τη θερμοκρασία της ατελούς καύσεως και από την ποσότητα του διαθέσιμου για καύση αέρα (Belichovska et al. 2019). Καλύτερα αποτελέσματα στην κάπνιση έχουν τα είδη ξύλου όπως η κερασιά, η δρυς, η μηλιά, η οξιά, η βελανιδιά και η καρυδιά με προσθήκη αρωματικών φυτών όπως δενδρολίβανο, θυμάρι, δάφνη. Με την πτώση του pH από τα είδη των οξέων, πραγματοποιείται η συντήρηση του τροφίμου, καθώς και από την επίδραση της φορμαλδεΐδης και των φαινολικών ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση. Τα καρβονύλια όταν αντιδρούν με τις πρωτεΐνες, δίνουν το χρώμα των καπνιστών προϊόντων. Οι αλδεΐδες και οι καρβονυλικές ενώσεις δίνουν την οσμή των καπνιστών προϊόντων.

1.5 Καπνιστά είδη

Τα κυριότερα αλιεύματα ανά τον κόσμο τα οποία υπόκεινται σε τεχνικές κάπνισης είναι οι μερλουκίδες (*Merluccidae*), οι κλουπεΐδες (*Clupeidae*), οι σκομβρίδες (*Scombridae*), οι σολομονίδες (*Salmonidae*) και ορισμένα δίθυρα όπως τα στρείδια και τα χτένια.

1.6 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες. Κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων, ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης γνωστό ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) φθάνουν σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα των 7-9 log cfu/g και παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των

αλλοιωγόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τις επικρατούσες συνθήκες κατά τη συντήρηση όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα καθώς και από τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις (Παρλαπάνη Φ. 2013). Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή σε σύγκριση με τα άλλα τρόφιμα και για το λόγο αυτό απαιτείται πιο προσεκτικός χειρισμός και αποθήκευση (Ashie et al. 1996). Τα ένζυμα, η αφυδάτωση, η οξείδωση, η μόλυνση και η φυσική βλάβη είναι οι παράγοντες που προκαλούν αλλοιώσεις των αλιευμάτων. Το ποσοστό συνεισφοράς του κάθε μηχανισμού στη συνολική αλλοίωση εξαρτάται κυρίως από το είδος του αλιεύματος (π.χ. λιπαρό ή άπαχο ψάρι, καρκινοειδές κλπ). Η βακτηριακή δραστηριότητα είναι υπεύθυνη για τις αλλοιώσεις που υφίστανται τα νωπά ή ελαφρώς επεξεργασμένα με σύντομη διάρκεια εμπορικής ζωής αλιευτικά προϊόντα. Στα κατεψυγμένα προϊόντα η αλλοίωση οφείλεται κυρίως σε χημική και ενζυμική δραστηριότητα. Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων που προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* και *Brochotrix thermosphacta* (Gram & Huss 1966, Huis in't Veld 1996). Η χημική οξείδωση των λιπιδίων στη συνολική αλλοίωση είναι μεγαλύτερη στα λιπαρά ψάρια απ' ότι στα άπαχα ψάρια. Τέλος, τα σημάδια αλλοίωσης ενός ιχθύος είναι η ανίχνευση ανεπιθύμητων οσμών, ο σχηματισμός 'γλίτσας', η παραγωγή αερίων, οι αλλαγές στο χρώμα και την εμφάνιση και οι αλλαγές στην υφή (μαλάκωμα).

1.7 Μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Η ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων και η διάρκεια ζωής τους εξαρτάται από τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό, τις συνθήκες επεξεργασίας, τη μεταχείριση του τελικού προϊόντος και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η πυκνότητα του καπνού επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Kolodziejaska et al. 2002). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης των καπνιστών αλιευμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα εντερικής φύσεως βακτήρια, οι μύκητες, κάποια Gram αρνητικά βακτήρια και ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Hansen et al., 1995).

Η πλειοψηφία της φυσικής μικροχλωρίδας των ψυχρά καπνισμένων αλιευμάτων αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος σε ότι αφορά τον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται κυρίως σαν καλλιέργειες εκκίνησης, σε διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με τη μεταποίηση των τροφίμων, καθώς είναι ικανά να αναστείλουν την αλλοίωση και την ανάπτυξη όμοιων με αυτά στελεχών μικροοργανισμών ή στενά σχετιζόμενων με αυτά ειδών βακτηρίων (Catte et al., 1999).

Το *L. monocytogenes* είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος Gram θετικός βάκιλος και έχει βρεθεί σε μη επεξεργασμένα και επεξεργασμένα αλιεύματα συμπεριλαμβανομένων και των καπνιστών (Seeliger & Jones, 1986). Το *L. monocytogenes* επιβιώνει τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (Espe et al., 2004, Kolodziejaska et al., 2002). Έρευνες έχουν δείξει ότι το *L. monocytogenes* συναντάται συχνότερα σε αλιεύματα που έχουν υποστεί ψυχρό κάπνισμα (13,6%), ενώ η συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου αυτού βακτηρίου σε θερμά καπνισμένα αλιεύματα είναι χαμηλότερη (8,9%) (Jemmi & Keusch, 1992). Ο

υγρός καπνός έχει ανασταλτική δράση στο συγκεκριμένο βακτήριο (Rorvik et al., (2000). Ο *L. monocytogenes* ως ψυχρότροφος μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει και σε ακραίες συνθήκες, όπως σε μεγάλη αλατότητα ή χαμηλό pH. Τα αλιεύματα μπορούν να επιμολυθούν με το *L. monocytogenes* είτε μέσω του νερού είτε κατά την μεταχείριση των αλιευμάτων στη βιομηχανία.

Το *Yersinia enterocolitica* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο της οικογένειας Enterobacteriaceae (Εντεροβακτηριοειδή). Το *Y. enterocolitica* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον και μπορεί να βρίσκεται σε διάφορα ζώα φορείς και σε νερά λιμνών ή ποταμών. Η μετάδοση του βακτηρίου προς τους ανθρώπους γίνεται με την κοπρανοστοματική οδό ή από την κατανάλωση τροφής ή νερού μολυσμένων με τον μικροοργανισμό. Η γαστρεντερίτιδα που συνοδεύεται από έντονη διάρροια, η ανορεξία, ο πυρετός, ο εμετός, η κεφαλαλγία, η αρθρίτιδα και τα αποστήματα που μπορεί να εξελιχθούν σε σηψαιμία είναι κάποια από τα συμπτώματα που προκαλεί το *Y. enterocolitica*, και προσβάλλει περισσότερο παιδιά και εφήβους σε σχέση με τους ενήλικες. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 28°C έως 37°C, τα στελέχη του καταστρέφονται με θέρμανση στους 60°C και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή της είναι η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση NaCl. Λόγω του ψυχρότροφου χαρακτήρα της, έχει χαρακτηριστεί ως ένα δυναμικά αναπτυσσόμενο παθογόνο βακτήριο στα τρόφιμα (Davies et al. 2001).

Ένα άλλο αυστηρά αναερόβιο βακτήριο το οποίο συναντάται υπό φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό των ιχθύων είναι το *Clostridium botulinum*. Η ενεργότητα του νερού, η σύνθεση και η μικροχλωρίδα των τροφίμων, η συγκέντρωση NaCl, τα νιτρώδη άλατα, η θερμοκρασία και το pH είναι οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του *C. botulinum*, το οποίο συναντάται άφθονο στα ιζήματα, αλλά και στα

σπλάχνα και τα βράγχια των ιχθύων. Σύμφωνα με έρευνες, το *C. botulinum* ιδιαίτερα το Type E, εμφανίζεται τόσο σε καπνιστά αλιεύματα υπό ψύξη, όσο και σε καπνιστά αλιεύματα υπό θερμική επεξεργασία παράγοντας τοξίνες και σπόρια (Lin H. et al. 2008). Κατά την θερμική επεξεργασία, η οποία πυροδοτεί την ενεργοποίηση σπορίων, φαίνεται να υπάρχει υψηλότερη πιθανότητα για εμφάνιση του *C. botulinum*.

1.8 Το *Listeria* ως μικροοργανισμός και η λιστερίωση ως ασθένεια

Η Λιστερίωση είναι μια σοβαρή λοίμωξη (ζωονόσος), η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων από το βακτήριο *L. monocytogenes* (Λιστέρια μονοκυτταρογόνος), και προκαλεί σοβαρή κλινική εικόνα στα νεογνά, στους ενήλικες με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και σοβαρές επιπλοκές στα έμβρυα (οι έγκυες γυναίκες εκδηλώνουν ήπια νόσο). Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι διαδεδομένο στη φύση και αποικίζει το χώμα, τα φυτά και το έντερο των θηλαστικών από όπου είναι δυνατόν να μεταδοθεί σε τροφές προς κατανάλωση. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως σποραδικά. Έχουν περιγραφεί μικροεπιδημίες που προήλθαν από μολυσμένες τροφές, όπως γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα (μαλακά τυριά), προϊόντα κρέατος και νωπά λαχανικά. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της λιστερίωσης είναι η μεταβολή στις πρακτικές παραγωγής τροφίμων και συγκεκριμένα ο συγκεντρωτισμός και η ενοποίηση βιομηχανιών τροφίμων, γεγονός που κάνει δύσκολη την εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής, η αυξημένη χρήση ψυγείου, οι αλλαγές στις προτιμήσεις της κατανάλωσης φαγητού, όπως η αύξηση της τάσης για κατανάλωση φαγητού που απαιτεί ελάχιστο μαγείρεμα (νωπά τρόφιμα, ελάχιστα επεξεργασμένα, φυσικά προϊόντα) (Schuchat et al. 1991).

1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση έξι (6) διαφορετικών υγρών καπνών, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και συγκεκριμένα στη βιομηχανία παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, στην αύξηση του *Listeria monocytogenes*. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η εύρεση του πιο αποτελεσματικού καπνού ως προς την παρεμπόδιση ή καθυστέρηση της αύξησης του παθογόνου μικροοργανισμού ***Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127**.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) διαφορετικά είδη υγρών καπνών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση και την αποτελεσματικότητα αυτών έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127. Το πείραμα συνεχίστηκε μέσω της πλήρωσης των microplates και της εξαγωγής αποτελεσμάτων με την συσκευή Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader.

2.2 Αναζωογόνηση παθογόνου μικροοργανισμού

Για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν αναγκαία η αναζωογόνηση του στελέχους *Listeria monocytogenes* από τους -80°C, όπου φυλασσόταν σε beads, σε 9 ml θρεπτικού υποστρώματος TSB και επώασή του στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρωσης σε 2516 g για διάρκεια 12 λεπτών, προκειμένου να ληφθεί βακτηριακό ίζημα το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10 ml MRD (Maximum Recovery Diluent -0.85% w/v NaCl, 0.1% w/v peptone). Ύστερα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ώστε να ληφθούν οι επιθυμητοί πληθυσμοί του μικροοργανισμού ($10^7, 10^5, 10^3$ cfu/ml) που χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια του πειράματος.

2.3. Παρασκευή θρεπτικών υλικών

2.3.1 Διαδικασία παρασκευής υγρού θρεπτικού διαλύματος Tryptone Soy Broth (TSB).

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 30 g σκόνης TSB και συμπληρώθηκαν 1000ml απιονισμένου νερού. Με τη βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 10ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 λεπτά. Το TSB αποστειρώθηκε μόνο του στα σωληνάκια και μετά βάλουμε τους διαφορετικούς καπνούς στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

2.3.2 Διαδικασία παρασκευής διαλύματος Maximum Recovery Diluent (MRD)

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 8,5 g NaCl και 1g πεπτόνη, και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000ml απιονισμένου νερού. Τέλος, με τη βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 9ml MRD σε σωληνάκια (δοκιμαστικούς σωλήνες) που αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 λεπτά.

2.4 Υγροί καπνοί

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) υγροί καπνοί (*Ruitenbergh Ingredients B.V., Netherlands*), οι σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 2.1):

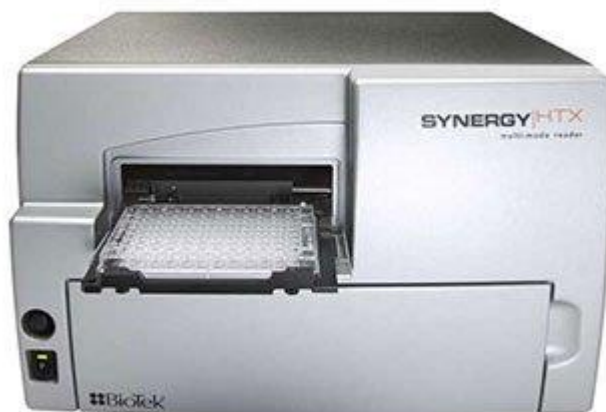
Πίνακας 2.1: Είδη καπνών και συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν

<u>Καπνός</u>	<u>Συγκεντρώσεις καπνών</u> (% v/v)		
L9	0,05	0,1	0,15
G6	1,00	0,20	0,35
C3	0,90	0,75	1,00
D4	0,50	0,75	1,00
A1	0,60	0,80	1,00
E5	0,60	0,90	1,20

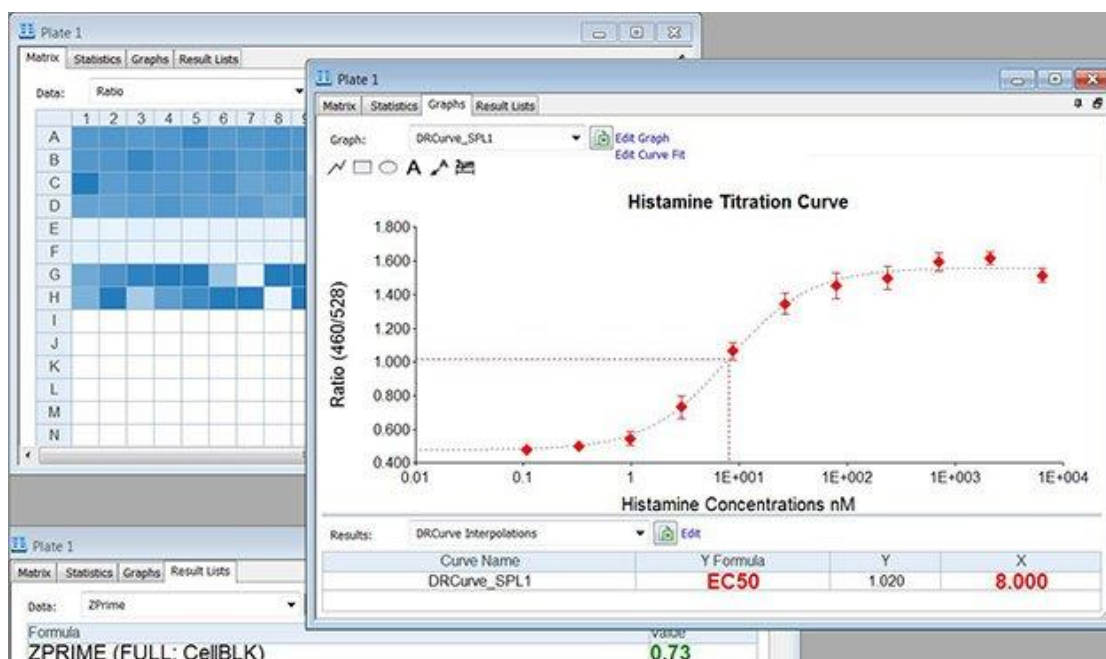
2.5 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) microplates, στο καθένα από τα οποία μελετήθηκαν δύο (2) υγροί καπνοί ανά microplate. Ανά τέσσερα (4) βαθμιαία της πρώτης σειράς του microplate τοποθετήθηκαν 180 μl TSB και 20μl από τους μικροβιακούς πληθυσμούς 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml αντίστοιχα, υπό άσηπτες συνθήκες. Στη συνέχεια, στις επόμενες σειρές στα τρία (3) πρώτα βαθμιαία τοποθετούνταν 200μl του διαλύματος TSB με την επιθυμητή συγκέντρωση καπνού, τα οποία αποτελούσαν τον μάρτυρα, και συνεχίζοντας στα υπόλοιπα βαθμιαία τοποθετούνταν ανά τρία (3), 180μl του ίδιου διαλύματος TSB-καπνού και 20μl από τους μικροβιακούς πληθυσμούς 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml αντίστοιχα. Κατόπιν το κάθε microplate τοποθετήθηκε στο Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (Εικ. 2.1). Η λήψη των μετρήσεων απορρόφησης γινόταν στα 580 nm, κάθε 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 30°C για 48 ώρες. Τα

διαγράμματα σχηματίστηκαν και επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού Gen5™ Data Analysis Software του μηχανήματος (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.1 Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader



Εικόνα 2.2 Λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν σημαντική επίδραση των διαφορετικών καπνών σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127. Γενικά τα εναιωρήματα υγρών καπνών αναστείλανε την ταχεία αύξηση του μικροοργανισμού, ωστόσο όμως, ο κάθε καπνός είχε τη δική του επίδραση και δράση ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού του μικροοργανισμού. Η μεγαλύτερη φάση προσαρμογής που παρατηρήθηκε στους μικροβιακούς πληθυσμούς των 10^5 και 10^3 cfu/ml δεν οφείλεται μόνο στην επίδραση του καπνού αλλά και στο ότι για να καταγραφεί μέτρηση οπτικής πυκνότητας, πρέπει ο μικροβιακός πληθυσμός να φτάσει 10^6 cfu/ml και πάνω. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες (Πίν. 3.1-3.3) με την επίδραση των καπνών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{max}) και τον χρόνο προσαρμογής (Lag time) σε κάθε περίπτωση καθώς επίσης και τα διαγράμματα μεταβολής οπτικής πυκνότητας που προέκυψαν από το reader για τους καπνούς και τις συγκεντρώσεις τους (Σχ. 3.1.1 – 3.3.2).

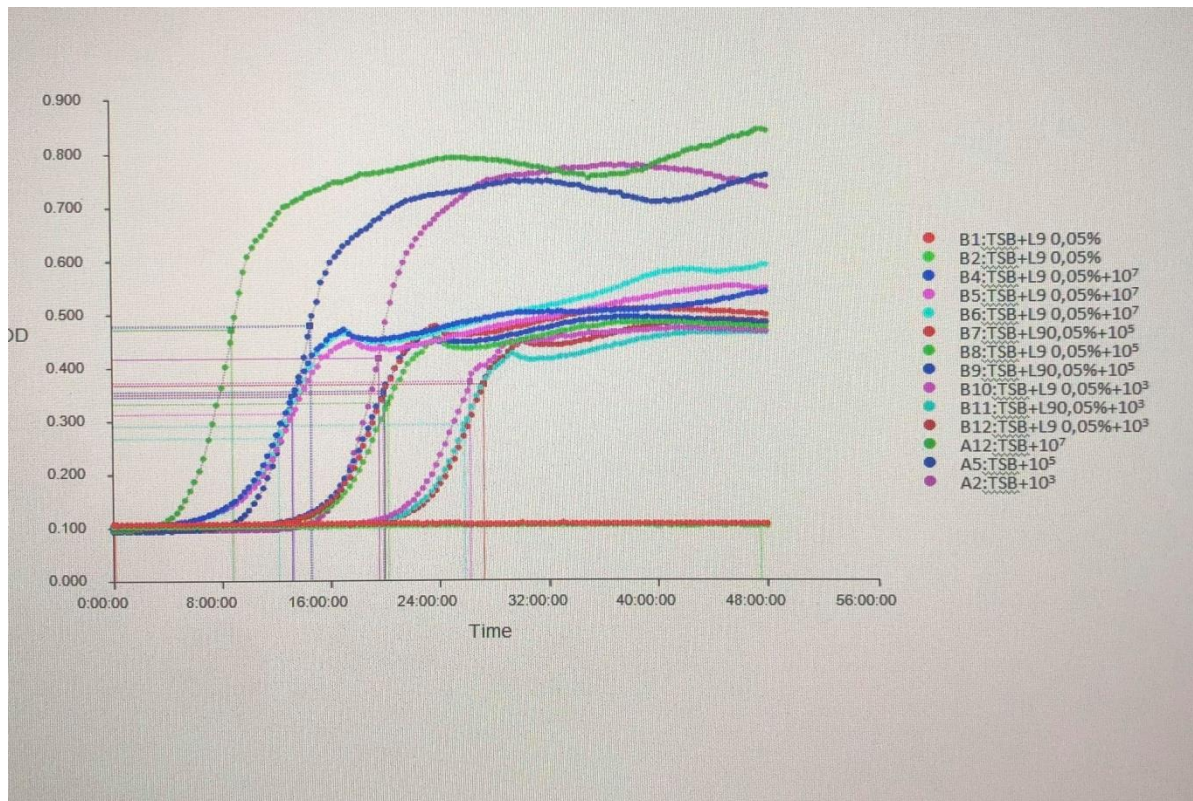
3.1 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών L9 και G6 στην αύξηση του *Listeria monocytogenes*

Οι μετρήσεις του πρώτου microplate παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού (Σχ. 3.1.1 - 3.1.2). Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι L9 και G6. Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, στον μάρτυρα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων (4) επαναλήψεων και στα υπόλοιπα είναι ο μέσος όρος τριών (3) μετρήσεων.

Πίνακας 3.1: Η επίδραση των υγρών καπνών L9 και G6 διαφορετικών συγκεντρώσεων(% v/v), στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{max}) και το χρόνο προσαρμογής (Lag time)

Θέση microplate	μ_{max} (h ⁻¹)	Lag time (h)
TSB+10 ³ cfu/ml	2.24±289,0	14.80±0,216
TSB+10 ⁵ cfu/ml	1.96±289,0	10.06±0,216
TSB+10 ⁷ cfu/ml	2.38±289,0	5.23±0,216
TSB+L9(0,05% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.09±0,089	7.15±3,310
TSB+L9(0,05% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.18±0,080	14.1±4,784
TSB+L9(0,05% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.37±0,248	21.95±5,9607
TSB+L9(0,1% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.22±0,245	7.22±6,508
TSB+L9(0,1% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.10±0,042	14.35±17,960
TSB+L9(0,1% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.34±0,144	21.15±5,874
TSB+L9(0,15% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	0.81±0,095	9.35±4,666
TSB+L9(0,15% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.11±0,176	14.26±5,2901
TSB+L9(0,15% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.24±0,067	22.15±7,5381
TSB+G6(0,2% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.60±0,116	5.43±4,242
TSB+G6(0,2% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.74±0,190	11.93±5,886
TSB+G6(0,2% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.99±0,188	22.91±580,8
TSB+G6(0,35% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.94±0,014	4.73±11,50
TSB+G6(0,35% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.92±0,177	11.96±4,761
TSB+G6(0,35% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.48±0,466	18.98±7,554

Στο σχήμα 3.1.1 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές όπως διαμορφώθηκαν από τον καπνό L9 0,05%.



Σχήμα3.1.1: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml για τον καπνό L9 συγκέντρωσης 0,05% (v/v)

Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml παρουσιάζεται στο σχήμα με τις καμπύλες χρώματος πράσινο σκούρο (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού), μπλε, θαλασσί και μωβ ανοιχτό (με προσθήκη 0,05% υγρού καπνού). Το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής επτά (7) ώρες και δεκαπέντε (15) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.09 h^{-1}). Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρουσιάζεται στο διάγραμμα με καμπύλες χρώματος μπλε σκούρο (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού), μπλε, κόκκινο και πράσινο (με προσθήκη 0,05% υγρού καπνού). Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ξεκινά στις δεκατέσσερις (14) ώρες και ένα (1) λεπτό. Για τον μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρατηρείται ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής του

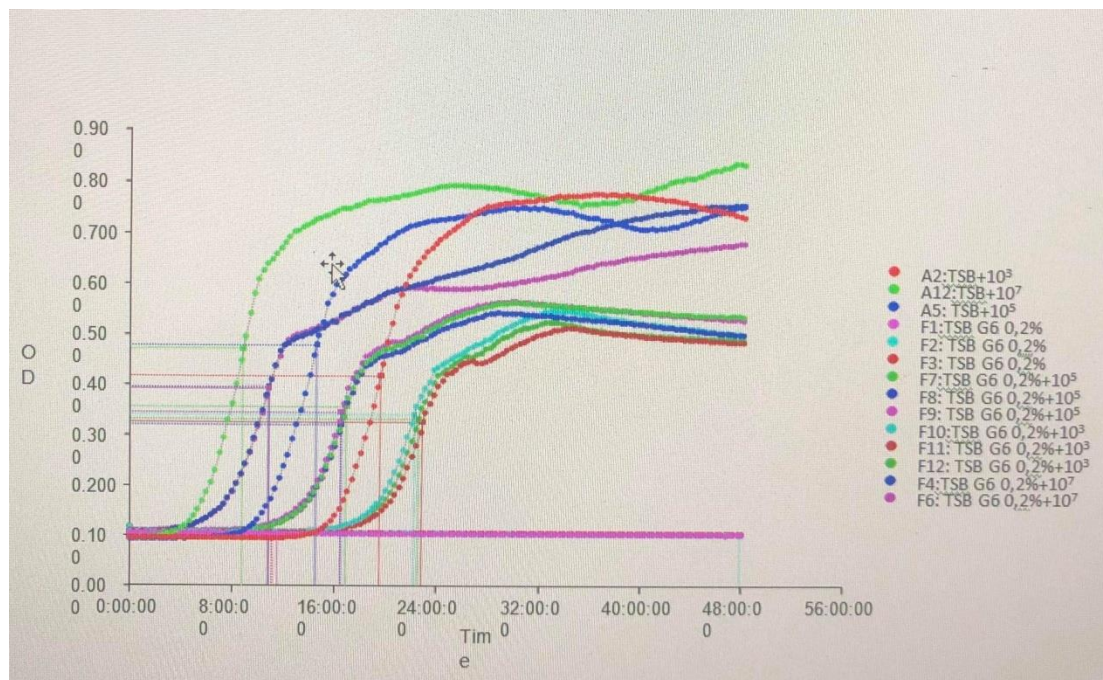
μικροοργανισμού ήταν σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξής του ήταν αισθητά μεγαλύτερος ($1,18h^{-1}$) σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml .

Στη συνέχεια η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml παρουσιάζεται με καμπύλες χρώματος μωβ σκούρο (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού), μωβ, κόκκινο, θαλασσί (με προσθήκη 0,05% υγρού καπνού). Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού ξεκινά στις είκοσι μία (21) ώρες και ενενήντα πέντε (95) λεπτά, και καθυστερεί περίπου επτά (7) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, καθώς καθυστερεί και δεκατέσσερις (14) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού 10^3 cfu/ml ήταν μεγαλύτερος ($1.37 h^{-1}$) σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς 10^5 cfu/ml και 10^7 cfu/ml.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Διαπιστώνεται κάποια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού ύστερα από την επίδραση του υγρού καπνού L9 0,05% αλλά όχι κάποια σημαντική διαφορά. Η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού και των τριών πληθυσμών, ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης καπνού. Με την προσθήκη του καπνού αυξάνεται κατά μέσο όρο στις επτά (7) ώρες και για τους τρεις (3) μικροβιακούς πληθυσμούς.

Στο σχήμα 3.1.2 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές όπως διαμορφώθηκαν από την επίδραση του καπνού G6 0,2%.



Σχήμα 3.1.2: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml για τον καπνό G6 συγκέντρωσης 0,2% (v/v)

Το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής (5) ώρες και σαράντα τρία (43) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.60 h^{-1}) και οι καμπύλες ανάπτυξής τους παρουσιάζονται στο σχήμα με χρώμα μπλε και μωβ σκούρο όπου συνέχισε την αυξανόμενη πορεία του μέχρι το πέρας των σαράντα οκτώ (48) ωρών, όπου ήταν και η λήξη του πειράματος.

Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρουσιάζεται με καμπύλες χρώματος μωβ, πράσινο και μπλε ξεκίνησε την ανάπτυξη με μέσο χρόνο προσαρμογής (11) ώρες και ενενήντα τρία (93) λεπτά με μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης

(1.74 h⁻¹) και συνέχισε την πορεία του αυξανόμενος σταθερά μέχρι το πέρας των είκοσι οκτώ (28) ωρών, όπου υπήρξε μια μικρή μείωση του πληθυσμού έως και τις σαράντα οκτώ (48) ώρες. Για τον αρχικό πληθυσμό 10⁵ cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν αυξημένος (11,93 ώρες), παρόλο που ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης που καταγράφηκε ήταν μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού 10⁷ cfu/ml.

Στη συνέχεια η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10³ cfu/ml ξεκίνησε την ανάπτυξή του στις είκοσι δύο (22) ώρες και ενενήντα ένα (91) λεπτά με χρώμα στις καμπύλες του θαλασσί, κόκκινο και πράσινο σκούρο και μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (1,99 h⁻¹), όπου μετά το πέρας των τριάντα τριών (33) ωρών υπήρξε μια μικρή μείωση του πληθυσμού έως και τις σαράντα οκτώ (48) ώρες. Επίσης, η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού 10³ cfu/ml καθυστέρησε πιο πολύ {οκτώ (8) ώρες και έντεκα (11) λεπτά} σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς 10⁵ cfu/ml και 10⁷ cfu/ml.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Διαπιστώνεται ότι υπάρχει κάποια επίδραση του υγρού καπνού στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και συγκεκριμένα στους μικροβιακούς πληθυσμούς 10⁵ cfu/ml και 10³ cfu/ml διότι μετά το πέρας κάποιων ωρών, η ανάπτυξή τους μειώνεται. Επίσης, η επίδραση του υγρού καπνού G6 0,2% φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον μικροβιακό πληθυσμό 10³ cfu/ml διότι εκτός του ότι η ανάπτυξή του καθυστερεί περισσότερο από τους άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς, μετά από οκτώ (8) ώρες, παίρνει και μια ελαφρώς καθοδική πορεία.

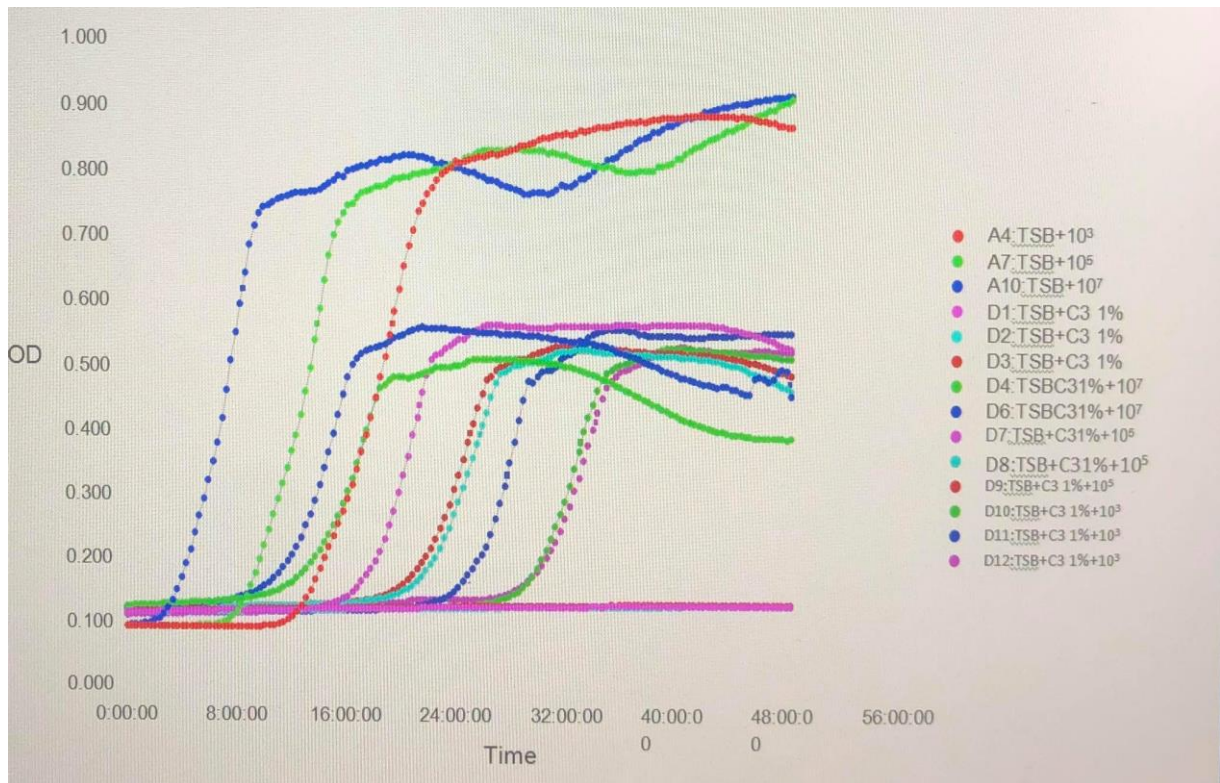
3.2 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών C3 και D4 στην αύξηση του *Listeria monocytogenes*

Όλες οι μετρήσεις του δευτέρου microplate παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.2). Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι C3 και D4 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς.

Πίνακας 3.2: Η επίδραση των υγρών καπνών C3 και D4 διαφορετικών συγκεντρώσεων (% v/v), στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{\max}) και το χρόνο προσαρμογής (Lag time)

Θέση microplate	μ_{\max} (h ⁻¹)	Lag time (h)
TSB+10 ³ cfu/ml	1.85±293,8	13.05±0,307
TSB+10 ⁵ cfu/ml	2.42±293,8	7.51±0,307
TSB+10 ⁷ cfu/ml	2.35±293,8	3.28±0,307
TSB+C3 (0.9% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.63±0,213	7.38±5.506
TSB+C3(0.9% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.558±0,156	19.38±4.214
TSB+C3(0.9% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.6±0,246	27.01±44.42
TSB+C3(0.75% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	2.04±0,070	7.25±18.24
TSB+C3(0.75% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.748±0,123	15.8±160.5
TSB+C3(0.75% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.9±0,040	25.6±127.8
TSB+C3(1% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.595±0,035	9.05±12.33
TSB+C3(1% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.58±0,242	19.11±106.7
TSB+C3(1% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.56±0,210	26.9±147.46
TSB+D4(0.5% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	2.136±0,157	4.43±10.28
TSB+D4(0.5% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.75±0,203	12.68±3,46
TSB+D4(0.5% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.868±0,412	20.86±88.91
TSB+D4(0.75% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	2.28±0,664	4.85±6.387
TSB+D4(0.75% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.77±0,106	13.35±3.625
TSB+D4(0.75% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.86±0,362	21.28±41.96
TSB+D4(1% v/v) +10 ⁷ cfu/ml	1.84±0,137	5.13±2.786
TSB+D4(1% v/v) +10 ⁵ cfu/ml	1.77±0,071	15.28±37.09
TSB+D4(1% v/v) +10 ³ cfu/ml	1.56±0,055	21.46±87.89

Στο σχήμα 3.2.1 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και η δράση του υγρού καπνού C3 1%.



Σχήμα 3.2.1: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10⁷, 10⁵, 10³ cfu/ml για τον καπνό C3 συγκέντρωσης 1% (v/v)

Αρχικά η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10⁷cfu/ml παρουσιάζεται στις πρώτες καμπύλες χρώματος μπλε, πράσινο και διαπιστώνεται η επίδραση του υγρού καπνού, γιατί σε σχέση με τις καμπύλες που δε περιέχουν υγρό καπνό, η αύξηση του πληθυσμού 10⁷cfu/ml καθυστέρησε. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού, ξεκίνησε στις εννέα (9) ώρες και πέντε (5) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.595 h⁻¹).

Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10⁵ cfu/ml παρουσιάζεται στις ενδιάμεσες καμπύλες με χρώμα, θαλασσί και κόκκινο σκούρο, και η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού ξεκινά στις δέκα εννέα (19) ώρες και έντεκα (11) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.58 h⁻¹). Για τον μικροβιακό πληθυσμό 10⁵ cfu/ml παρατηρείται ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν

σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξής του ήταν αισθητά μικρότερος ($1,58h^{-1}$) σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml .

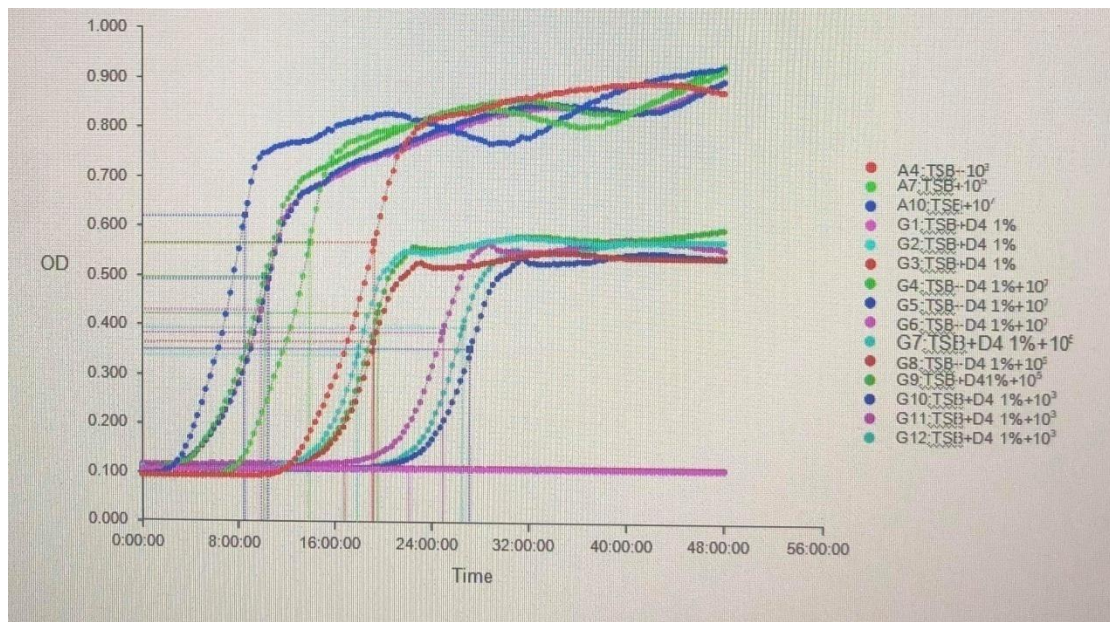
Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml παρουσιάζεται στις τελευταίες καμπύλες χρώματος πράσινο και μωβ και η ανάπτυξή του ξεκινά στις είκοσι έξι (26) ώρες και ενενήντα τρία (93) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν ($1,56h^{-1}$). Παρατηρούμε ότι η καμπύλη χρώματος μπλε σκούρο 10^3 cfu/ml ξεκίνησε λίγο νωρίτερα την ανάπτυξή της, περίπου στις είκοσι τρεις (23) ώρες. Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού ξεκινά στις είκοσι έξι (26) ώρες και ενενήντα τρία (93) λεπτά, και καθυστερεί περίπου επτά (7) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, καθώς καθυστερεί και δεκαεφτά (17) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού 10^3 cfu/ml ήταν μικρότερος ($1.56 h^{-1}$) σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς 10^5 cfu/ml και 10^7 cfu/ml.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 127 και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Διαπιστώνεται ότι υπάρχει κάποια επίδραση του υγρού καπνού στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού και συγκεκριμένα στους μικροβιακούς πληθυσμούς 10^5 cfu/ml και 10^3 cfu/ml διότι μετά το πέρας κάποιων ωρών, η ανάπτυξή τους μειώνεται. Επίσης, η επίδραση του υγρού καπνού C3 1% φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml διότι εκτός του ότι η ανάπτυξή του καθυστερεί

περισσότερο από τους άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς, καθώς μετά από δεκατρείς (13) ώρες, παίρνει και μια ελαφρώς καθοδική πορεία. Παρατηρούμε λοιπόν ότι η επίδραση του υγρού καπνού C3 1% στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι σημαντική, όταν ο αρχικός πληθυσμός είναι 10^3 cfu/ml.

Στο σχήμα 3.2.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και οι επιδράσεις του υγρού καπνού D4 1% στην αύξησή του.



Σχήμα 3.2.2: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml για τον καπνό D4 συγκέντρωσης 1% (v/v)

Αρχικά η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml παρουσιάζεται στις καμπύλες χρώματος μπλε ανοιχτό (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού), πράσινο, μωβ και μπλε (με προσθήκη υγρού καπνού D4 1%). Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις τρεις (3) ώρες και είκοσι οκτώ (28) λεπτά, ενώ η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού με την προσθήκη του

υγρού καπνού ξεκίνησε στις πέντε (5) ώρες και δεκατρία (13) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.84 h^{-1}).

Στη συνέχεια η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρουσιάζεται στις καμπύλες χρώματος πράσινο ανοιχτό (χωρίς την προσθήκη του υγρού καπνού), θαλασσί, πράσινο και κόκκινο σκούρο (με προσθήκη υγρού καπνού D4 1%). Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού 10^5 cfu/ml χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις επτά (7) ώρες και πενήντα ένα (51) λεπτά, ενώ η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού με την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις δεκαπέντε (15) ώρες και σαράντα έξι (46) λεπτά ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν (1.77 h^{-1}). Για τον μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρατηρείται ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν σχεδόν τριπλάσιος σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml , ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξής του ήταν μικρότερος ($1,77\text{h}^{-1}$) σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7cfu/ml . Επίσης είναι εμφανές ότι ο όγκος του μικροβιακού πληθυσμού υπό την επίδραση του υγρού καπνού μειώθηκε και συνέχισε μια σταθερή πορεία, σε σχέση με τον όγκο του μικροβιακού πληθυσμού που δεν περιείχε υγρό καπνό.

Τέλος, η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml παρουσιάζεται στις καμπύλες χρώματος κόκκινο ανοιχτό (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού), μωβ σκούρο, θαλασσί και μπλε σκούρο και η ανάπτυξή του ξεκινά στις είκοσι μία (21) ώρες και σαράντα έξι (46) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν ($1,56 \text{ h}^{-1}$). Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού 10^3 cfu/ml καθυστερεί περίπου έξι (6) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml , καθώς καθυστερεί και δεκαέξι (16) ώρες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7cfu/ml , ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

του μικροβιακού πληθυσμού 10^3 cfu/ml ήταν μικρότερος (1.56 h^{-1}) σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς 10^5 cfu/ml και 10^7 cfu/ml.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι όλες οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού. Επίσης, η επίδραση του υγρού καπνού D4 1% φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml διότι εκτός του ότι η ανάπτυξή του καθυστερεί περισσότερο από τους άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς, μετά από οχτώ (8) ώρες, παίρνει και μια ελαφρώς καθοδική πορεία.

3.3 Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών A1 και E5 στην αύξηση του *Listeria monocytogenes*

Όλες οι μετρήσεις του τρίτου microplate παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.3.). Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι A1 και E5 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς.

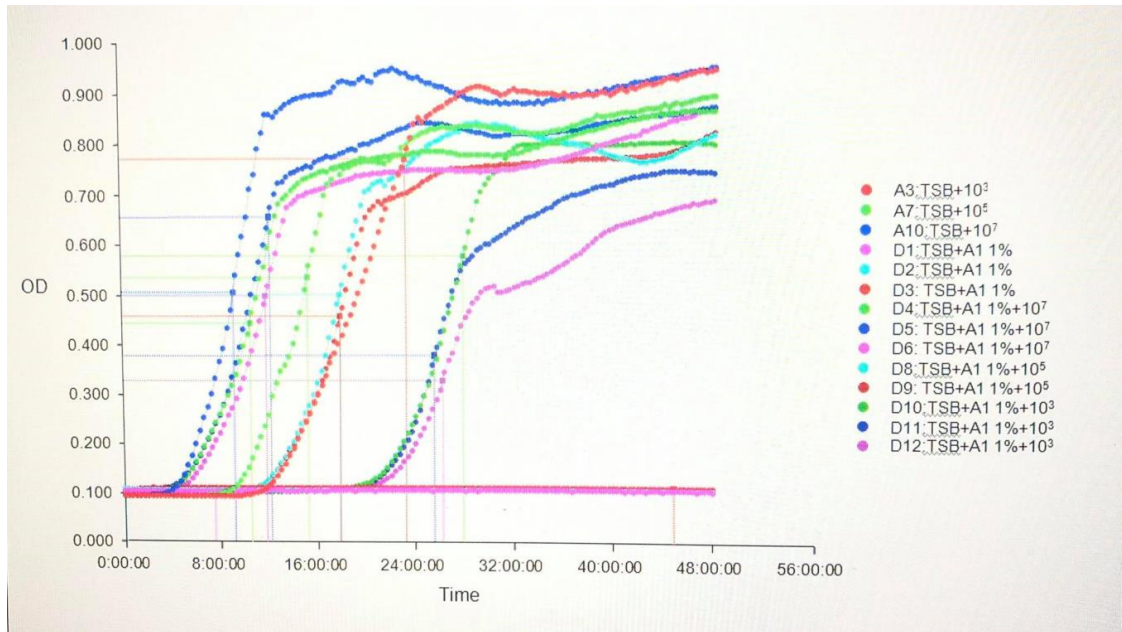
Στο σχήμα 3.3.1 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και οι επιδράσεις του υγρού καπνού A1 1% στην αύξησή του.

Αρχικά η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml παρουσιάζεται στο διάγραμμα με καμπύλες χρώματος μπλε ανοιχτό (χωρίς την προσθήκη υγρού

καπνού A1 1%), μπλε, πράσινο και μωβ (με την προσθήκη του υγρού καπνού), συνεχίζοντας αυξητικά την πορεία τους. Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις πέντε (5) ώρες και είκοσι (20) λεπτά, ενώ η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού με την προσθήκη του υγρού καπνού ξεκίνησε στις πέντε (5) ώρες και πενήντα τρία (53) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν ($1,99 \text{ h}^{-1}$). Δεν υπάρχει κάποια σημαντική επίδραση του υγρού καπνού στον μικροβιακό πληθυσμό καθώς η ανάπτυξη του υπό την επίδραση του υγρού καπνού ξεκινάει στις πέντε (5) ώρες και πενήντα τρία (53) λεπτά έχοντας μια διαφορά τριάντα τριών (33) λεπτών σε σχέση με την καμπύλη ανάπτυξης μπλε ανοιχτό (χωρίς προσθήκη υγρού καπνού) όπου η ανάπτυξή της ξεκίνησε στις πέντε (5) ώρες και είκοσι (20) λεπτά.

Πίνακας 3.3: Η επίδραση των υγρών καπνών A1 και E5 διαφορετικών συγκεντρώσεων (% v/v), στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{\max}) και το χρόνο προσαρμογής (Lag time)

Θέση microplate	μ_{\max} (h⁻¹)	Lag time (h)
TSB+10³ cfu/ml	1.74±234,9	12.95±0,904
TSB+10⁵ cfu/ml	2.41±234,9	10.05±0,904
TSB+10⁷ cfu/ml	3.53±234,9	5.2±0,904
TSB+A1(0.6% v/v) +10⁷ cfu/ml	2.125±0,077	5.4±2.875
TSB+A1(0.6% v/v) +10⁵ cfu/ml	1.902±0,042	6.00±17.61
TSB+A1(0.6% v/v) +10³ cfu/ml	1.44±0,246	23.39±3.936
TSB+A1(0.5% v/v) +10⁷ cfu/ml	2.107±0,070	5.28±2.215
TSB+A1(0.5% v/v) +10⁵ cfu/ml	2.28±0,123	11.65±54.47
TSB+A1(0.5% v/v) +10³ cfu/ml	1.915±0,040	19.17±8.237
TSB+A1(1% v/v) +10⁷ cfu/ml	1.993±0,035	5.53±14.26
TSB+A1(1% v/v) +10⁵ cfu/ml	2.283±0,242	12.7±2.439
TSB+A1(1% v/v) +10³ cfu/ml	1.816±0,210	22,3±19.55
TSB+E5(0.6% v/v) +10⁷ cfu/ml	2.00±0,157	5.02±8.273
TSB+E5(0.6% v/v) +10⁵ cfu/ml	1.812±0,203	12.5±8.744
TSB+E5(0.6% v/v) +10³ cfu/ml	2.145±0,412	20.06±31.06
TSB+E5(0.9% v/v) +10⁷ cfu/ml	2.07±0,664	4.83±70758
TSB+E5(0.9% v/v) +10⁵ cfu/ml	1.79±0,106	11.51±6.378
TSB+E5(0.9% v/v) +10³ cfu/ml	1277.3±0,362	21.28±103.3
TSB+E5(1.2% v/v) +10⁷ cfu/ml	1.831±0,137	4.716±7.908
TSB+E5(1.2% v/v) +10⁵ cfu/ml	1.691±0,071	12.78±8.265
TSB+E5(1.2% v/v) +10³ cfu/ml	1.43±0,055	22.15±29.61



Σχήμα3.3.1: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml για τον καπνό A1 συγκέντρωσης 1% (v/v)

Όσον αφορά την περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, οι καμπύλες ανάπτυξης τους παρουσιάζονται με χρώμα πράσινο ανοιχτό (χωρίς προσθήκη υγρού καπνού A1 1%), θαλασσί, κόκκινο σκούρο (με προσθήκη υγρού καπνού). Η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού 10^7 cfu/ml χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις δέκα (10) ώρες και πέντε (5) λεπτά, ενώ η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού με την προσθήκη υγρού καπνού ξεκίνησε στις δώδεκα (12) ώρες και επτά (7) λεπτά ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν ($2,28 \text{ h}^{-1}$). Για τον μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρατηρείται ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του ήταν μεγαλύτερος ($2,28 \text{ h}^{-1}$) σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml.

Τέλος η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml παρουσιάζεται στο διάγραμμα με καμπύλες χρώματος κόκκινο ανοιχτό (χωρίς την προσθήκη υγρού καπνού A1 1%), πράσινο σκούρο, μπλε και μωβ σκούρο (με προσθήκη υγρού καπνού). Είναι εμφανής η επίδραση του υγρού καπνού A1 με συγκέντρωση 1% στο μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml, καθώς η ανάπτυξή του ξεκινάει στις είκοσι δύο (22) ώρες και τρία (3) λεπτά, με τη μεγαλύτερη καθυστέρηση ανάπτυξης του κατά εννιά (9) ώρες και τριάντα πέντε (35) λεπτά, σε σχέση με το μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml και κατά δεκαέξι (16) ώρες και επτά (7) λεπτά σε σχέση με το μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού 10^3 cfu/ml είναι ($1,81 \text{ h}^{-1}$) και είναι ο μικρότερος συγκριτικά με τους προηγούμενους μικροβιακούς πληθυσμούς.

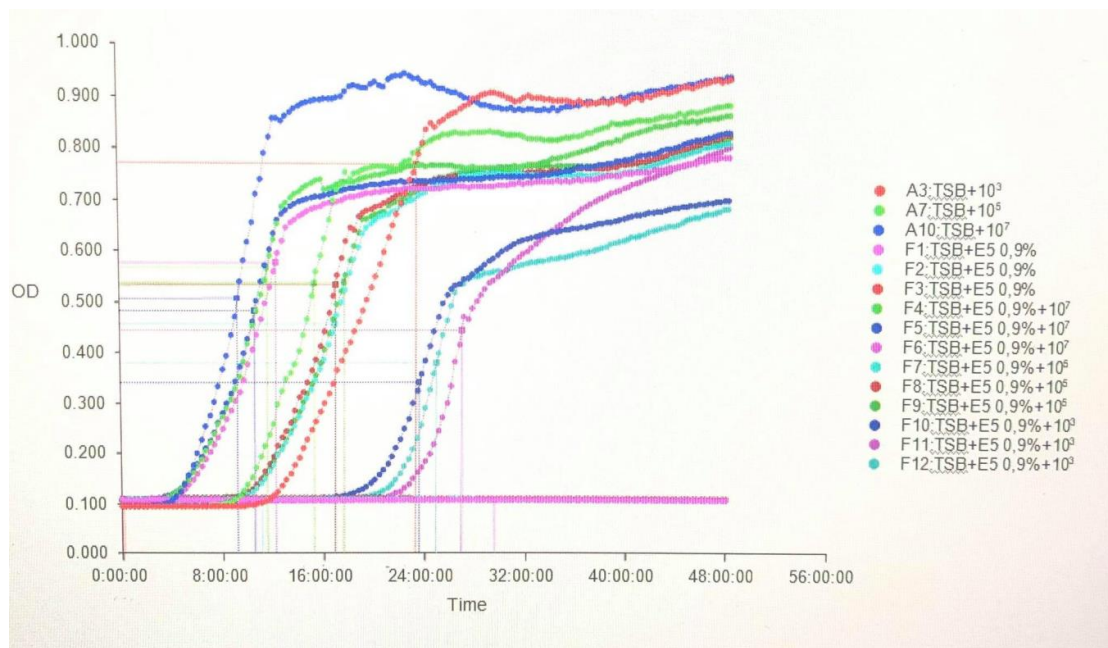
Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι όλες οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού. Επίσης, η επίδραση του υγρού καπνού A1 1% φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml διότι εκτός του ότι η ανάπτυξή του καθυστερεί περισσότερο από τους άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς, μετά από δέκα (10) ώρες, παίρνει και μια ελαφρώς καθοδική πορεία.

Στο σχήμα 3.3.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και οι επιδράσεις του υγρού καπνού E5 0.9% στην αύξησή του.

Αρχικά η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^7 cfu/ml παρουσιάζεται με καμπύλες χρώματος πράσινο, μπλε και μωβ και η ώρα έναρξης της αύξησής του εντοπίζεται στις τέσσερις (4) ώρες και ογδόντα τρία (83) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης είναι ($2,07 \text{ h}^{-1}$).

Η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^5 cfu/ml παρουσιάζεται με καμπύλες χρώματος κόκκινο και πράσινο σκούρο και θαλασσί, με ώρα ανάπτυξής του στις έντεκα (11) ώρες και πενήντα ένα (51) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης είναι ($17,9 \text{ h}^{-1}$).



Σχήμα 3.3.2: Μεταβολή οπτικής πυκνότητας μάρτυρα και μικροβιακών πληθυσμών 10^7 , 10^5 , 10^3 cfu/ml για τον καπνό E5 συγκέντρωσης 0,9% (v/v)

Τέλος η περίπτωση με αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 cfu/ml παρουσιάζεται με καμπύλες χρώματος μπλε σκούρο, θαλασσί σκούρο και μωβ σκούρο, και ξεκινά την

ανάπτυξή του στις είκοσι μία (21) ώρες και είκοσι οχτώ (28) λεπτά, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης είναι ($1277,3 \text{ h}^{-1}$).

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζουν αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Παρατηρούμε ότι ο υγρός καπνός E5 σε συγκέντρωση 0,9% δεν ασκεί επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127, διότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική μείωση σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς 10^3 cfu/ml, 10^5 cfu/ml και 10^7 cfu/ml.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη προπτυχιακή εργασία έγινε διερεύνηση της επίδρασης έξι (6) διαφορετικών υγρών καπνών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων – παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, έναντι της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* Pirie 21075 B 127 μπορεί να απομονωθεί από το θαλάσσιο νερό, όπου απαντάται πιθανότατα λόγω απορροής από τη γη, βλάστηση, λύματα, ζωοτροφές, τοποθεσίες επεξεργασίας τροφίμων, και επομένως είναι πολύ πιθανό να επιμολύνει, τα περιβάλλοντα επεξεργασίας αλιευμάτων καθώς και τα τελικά του προϊόντα.

Σύμφωνα με τη παρούσα προπτυχιακή εργασία και τα αποτελέσματα του πειράματος αποδείχθηκε ότι ο καπνός πράγματι επιδρά στην ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* Pirie 21075 B 127 με διαφορές βέβαια στα διάφορα είδη καπνών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να προκύπτουν λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης σε καρβονύλια και φαινολικές ουσίες στους καπνούς αυτούς, σύμφωνα με τη σύσταση που διατίθεται από την εταιρεία παρασκευής τους.

Πράγματι, ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* μπορεί να απομονωθεί από γλυκό και θαλασσινό νερό και πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τους (Dien et al. 2019) αναφέρεται ότι οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες συνιστούν τον καπνό καταστρέφουν τη δομή των βακτηριακών κυττάρων και αναστέλλουν τη διαδικασία σχηματισμού του βακτηριακού τοιχώματος. Σύμφωνα με τους (Sikorski et al. 1995) αναφέρεται ότι οι καρβονυλικές ενώσεις ή καρβονύλια όπως η φορμαλδεύδη και η μεθυλογλυοξάλη, δρουν ως βακτηριοκτόνα. Η φορμαλδεύδη έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της βακτηριοστατικής ή βακτηριοκτόνου ιδιότητάς της σύμφωνα πάντα με στόχο τη διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων μέσω της χρήσης της. Η συγκέντρωσή της

εξαρτάται από το είδος καύσης του ξύλου και τη θερμοκρασία καύσης. Σύμφωνα με τους (Faith et al. 1992), από έντεκα (11) μεμονωμένες φαινόλες που δοκιμάστηκαν, μόνο η ισοευγενόλη εμφάνισε αντιλισταρική δράση στη φυματίωση στους 37 °C. Η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού παρουσία ισοευγενόλης (100ppm) αναστάλη σε μεγαλύτερο βαθμό σε TB οξινισμένη σε οξικό οξύ σε pH 5,8 σε σύγκριση με pH 7,0. Αυτές οι μελέτες επιβεβαιώνουν την ισχυρή αντιλισταρική δράση του υγρού καπνού και αποδεικνύουν τη δυνατότητα της ισοευγενόλης για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε ορισμένα επεξεργασμένα κρέατα.

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία, με βάση το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι έγινε περισσότερο αντιληπτή η αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κυρίως σε σχέση με την διάρκεια της φάσης προσαρμογής (Lag time) της *L. monocytogenes* Pirie 21075 B 127. Πιο συγκεκριμένα από τον καπνό C3 σε συγκέντρωση 1% v/v και αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml η έναρξη της ανάπτυξης του καθυστέρησε κατά εννιά (9) ώρες, με αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml η έναρξη της ανάπτυξης του καθυστέρησε δέκα (10) ώρες ενώ στον αρχικό πληθυσμό 10^3 cfu/ml η έναρξη της ανάπτυξης του καθυστέρησε δώδεκα (12) ώρες. Προφανώς οι διαφορές στην διάρκεια της φάσης προσαρμογής με αρχικούς πληθυσμούς 10^5 και 10^3 cfu/ml σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, οφείλονται στο γεγονός ότι απαιτείται χρόνος να αυξηθεί ο πληθυσμός από το επίπεδο των 10^5 και 10^3 cfu/ml στο επίπεδο των 10^7 cfu/ml όπου είναι και το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης της οπτικής πυκνότητας. Η μεγαλύτερη φάση προσαρμογής των χαμηλότερων μικροβιακών πληθυσμών δεν οφείλεται μόνο στην επίδραση του καπνού, αλλά και στο ότι για να καταγράψει μέτρηση οπτικής πυκνότητας το μηχάνημα πρέπει ο μικροβιακός πληθυσμός να φθάσει 10^6 και πάνω.

Σύμφωνα με το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, εκτός από την επίδραση που είχε στη φάση προσαρμογής (Lag time) της *L. monocytogenes* Pirie 21075 B 127, είχε επίδραση και στον ειδικό ρυθμό αύξησης. Πιο συγκεκριμένα από τον καπνό **C3 σε συγκέντρωση 1% v/v** και αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν $1,59h^{-1}$, με αρχικό πληθυσμός 10^5 cfu/ml ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν $1,58h^{-1}$, ενώ στον αρχικό πληθυσμό 10^3 cfu/ml ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν $1,56h^{-1}$. Παρατηρείται λοιπόν ότι από τον καπνό **C3 σε συγκέντρωση 1% v/v** πως μετά το πέρας κάποιων ωρών η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μειώνεται, καθώς και μετά το πέρας κάποιων ωρών παίρνει και μια καθοδική πορεία.

Σύμφωνα με τους (Lou & Yousef 1997), έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε υποθανάτια επίπεδα μιας καταπόνησης, μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της ανθεκτικότητας στην ίδια ή διαφορετικού είδους δριμύτερες καταπονήσεις. Σύμφωνα με τους (Koutsoumanis et al. 2003), η απόκτηση αυξημένης όξινης ανθεκτικότητας περιλαμβάνει την έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες ανάπτυξης. Σύμφωνα με μια μελέτη (Elisabetta et al, 2007) αποδείχθηκε ότι το ψυχρό κάπνισμα εξαλείφει το *L. monocytogenes* σε δοκιμές πρόκλησης σε θερμοκρασίες από $17,1^{\circ}C$ έως $21,1^{\circ}C$, ενώ από $22,2^{\circ}C$ έως $30^{\circ}C$ τα βακτήρια επέζησαν. Υπό φυσικές συνθήκες ψυχρού καπνίσματος (19 έως $22^{\circ}C$) η συχνότητα και το επίπεδο του *L. monocytogenes* φαίνεται να μειώνεται. Το ζεστό κάπνισμα φαίνεται να εξαλείφει τα βακτήρια όταν ο καπνός εφαρμόζεται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας θέρμανσης.

Οι (Nithin et al. 2020) παραδέχονται την σημαντικότητα της χρήσης των υγρών καπνών τόσο στα μειωμένα επίπεδα των κυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) όσο και στη διατήρηση της καλής ποιότητας γεύσης και οσμής καπνιστών προϊόντων. Λόγω του ότι ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* συναντάται σε πολλά

οικοσυστήματα και έχει εντοπιστεί τόσο σε άγρια ψάρια και οστρακοειδή όσο και σε εκτροφής, υπάρχει η ανησυχία για τον τρόπο εξάλειψής του από τη βιομηχανία τροφίμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης της παρούσας προπτυχιακής εργασίας βλέπουμε ότι ο καπνός C3 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα ισχυρό μέσο παρεμπόδισης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ο πιο δραστικός καπνός έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Pirie 21075 B 127 είναι ο καπνός C3 σε συγκέντρωση 1% (v/v) και συγκεκριμένα στον πληθυσμό 10^3 cfu/ml διαπιστώνεται η μεγαλύτερη καθυστέρηση ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού (καθυστέρηση 12 ώρες). Είναι πιθανό ο πληθυσμός αυτός (10^3 cfu/ml) να ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες σε σχέση με τους μικροβιακούς πληθυσμούς (10^5 cfu/ml) και (10^7 cfu/ml).

Τα αποτελέσματα του πειράματος μας οδήγησαν σε ένα σημαντικό πόρισμα το οποίο αναφέρεται στην επίδραση του καπνού C3 στον πληθυσμό (10^3 cfu/ml) καθώς μας δείχνει πως χάρη στο καπνό αυτό, έχουν μικρότερη ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών σε αλιεύματα στην πραγματική ζωή. Η δραστικότητα των υπόλοιπων καπνών ήταν μη παρατηρήσιμη καθώς δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στελέχους **Piere 21075 B 127**.

Η εξαγωγή των συμπερασμάτων και των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας βασίστηκαν στη μελέτη της επίδρασης των καπνών μέσω του μέγιστου ρυθμού αύξησης (μ_{max}) και του χρόνου προσαρμογής (Lag time) των πληθυσμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

1. Ashie I.N., Smith J.P., Simpson B.K. (1996). Spoilage and Self-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36: Pages 87–121.
2. Belichovska K., Belichovska D., Pejkovski Z. (2019). Smoke and Smoked Fish Production, *Meat Technology* 60: Pages 37-43.
3. Cornu A., Beaufort S., Rudelle L., Laloux H., Bergis N., Miconnet T., Serot M.L., Delignette-Muller,(2006).,Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models.106 , Pages 159-168
4. Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., Kirby R.M (2001) Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 12: Pages 67-71.
5. Dien H.A., Montolalu R.I., Berhimpon S. (2019) Liquid smoke inhibits growth of pathogenic and histamine forming bacteria on skipjack fillets, IOP Publishing Conference Series: Earth and Environmental Science, Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University Manado, Manado, Indonesia : Pages 3-9
6. Elisabetta Toméab Paul A. Gibbs Paula C.Teixeiraa (2007), 121, 3, : Pages 285-294
7. Gram, L., Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33 : Pages 121–137.

8. Kolodziejska C., Niecikowska E., Januszewska Z., Sikorski E., The Microbial and Sensory Quality of Mackerel Hot Smoked in Mild Conditions., *LWT – Food Science and Technology.*, February 2002, Pages 87-92
9. Nancy G., Ahmed E., John B., Luchansky (1992), Inhibition Of *Listeria Monocytogenes* by Liquid Smoke and Isoeugenol, A Phenolic Component Found in Smoke, 12 : Pages 303 – 324
10. Nithin C.T., Joshy C.G., Chatterjee Niladri Sekhar, Panda Satyen Kumar, Yathavamoorthi R., Ananthanarayanan T.R., Mathew Suseela, Bindu J., Gopal T.K.S. (2020) Liquid smoking - A safe and convenient alternative for traditional fish smoked products. *Food Control*, Elsevier Ltd : Pages 107 - 186
11. Konstantinos P., Koutsoumanis A., Patricia A., Kendall B., John N., Sofos A., (2003) A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface, 21., Pages 415-422
12. Lin H., Jiang J., Li D. (2008) Potential Hazards in Smoke-Flavored Fish, *Journal of Ocean University of China*, 7, Pages 294-298.
13. Rørvik L., (2000) *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry, 62, Pages 183-190
14. Marianne C., Frédérique G., Florence D., Roger T., (1999), Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315, 52 , Pages 105-108
15. Nithin C., Joshy C., Chatterjee N., Panda S., Yathavamoorthi R., Ananthanarayanan T., Mathew S., Bindu J., Gopal T. (2020) Liquid smoking - A safe and convenient

- alternative for traditional fish smoked products. Food Control, Elsevier Ltd, 113, Pages 107-186
16. Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V.,(1991), ASM Journals, Clinical Microbiology Reviews, Epidemiology of human listeriosis, Vol 4, No.2.
 17. Seeliger H., Jones D., (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In: Genus Listeria (Kandier O. and Weiss N.). Williams & Wilkins, Baltimore, Pages 1235-1245.
 18. Shewan J.M. (1977) The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. Proceedings of the Conference on "Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish". Pages 328 - 334
 19. Sikorski E., Gilberg A., Ruitter A. (1995) Fish Products. In A. Ruitter (Ed.), Fish and fishery products, Composition, nutritive properties and stability. CAB International, Wallingford, UK, Page 398
 20. Hansen T., Knøchel S., (1996).,Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in sous vide cooked beef., Page 32
 21. Jemmi T., Keusch A., (1992) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants., Pages 309-316
 22. Lou Y., Yousef E., (1997) Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors., 63, Pages 1252 - 1255

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Athenslab.gr/diagnostikes-exetaseis/uersinia-yersinia-enterocolitica-antisomata.
2. Μποζιάρης Ι. (2013) Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 3η Έκδοση.

3. Eclass Πανεπιστήμιο Πατρών. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών σελ 21.
4. Μπλούκα Ιωάννη Γ. (2004), Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη ΑΕ Αθήνα 2004.
5. Μποζιάρης Ι. (2012), Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2^η Έκδοση.
6. Μποζιάρης Ι. (2013), Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 3^η Έκδοση.
7. Χριστοδούλου Χ.Ε. (2013) Αλληλεπίδραση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύων και του παθογόνου *Yersinia enterocolitica* σε φιλέτο τσιπούρας και μοντέλο υπόστρωμα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Προπτυχιακή Διατριβή, σελ. 6.
8. Παρλαπάνη Φ. (2013) Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Διδακτορική Διατριβή.
9. Παρλαπάνη Φ. (2013) Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Διδακτορική Διατριβή, σελ. 315.
10. Καρρά Φ. (2019) Μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις- βιογενείς αμίνες κατά τη συντήρηση του μαριναρισμένου γαύρου. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 31-32.
11. Κοντοτόλης Σ. (2016) Αλλοιωγόνοι και Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα δίθυρα μαλάκια. Προπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 25-30, 33-35.
12. Αναγνωστόπουλος Δ. (2015) Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού

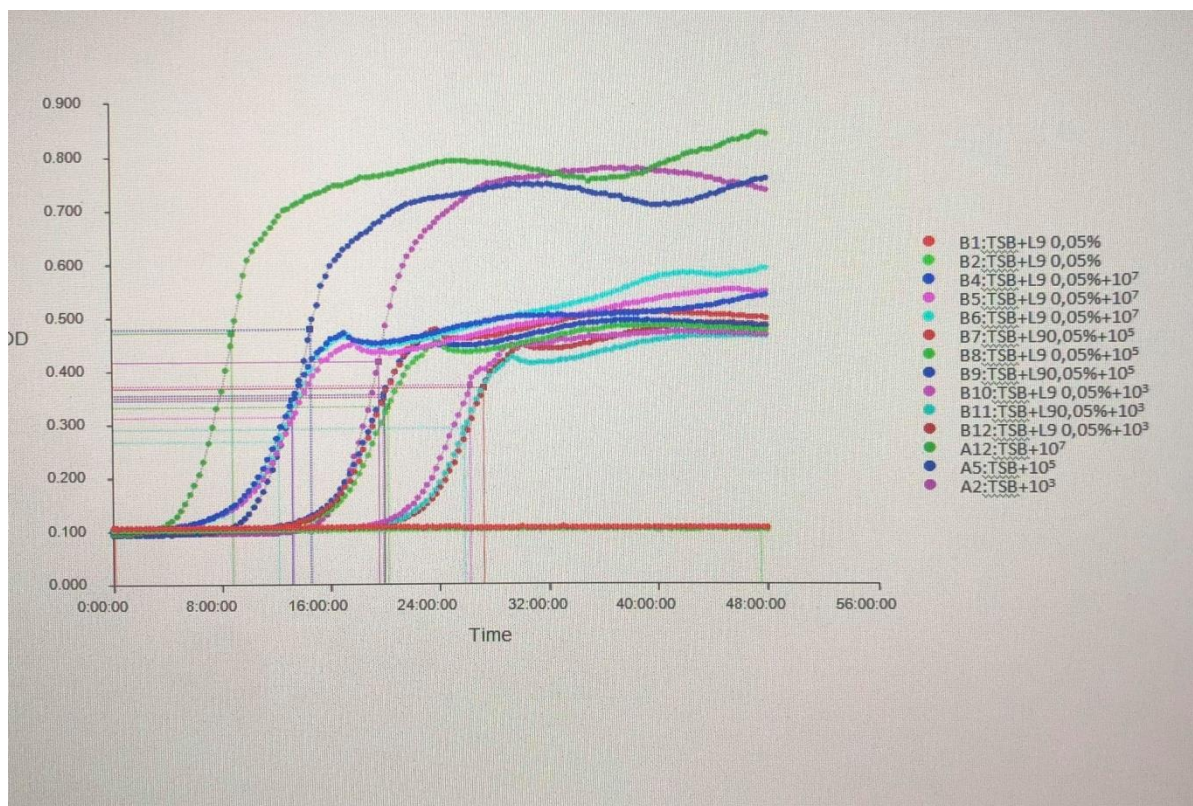
Callinectessapidus στους 10 °C, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Προπτυχιακή Διατριβή, σελ. 16-19.

13. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων Διπλωματική Εργασία.

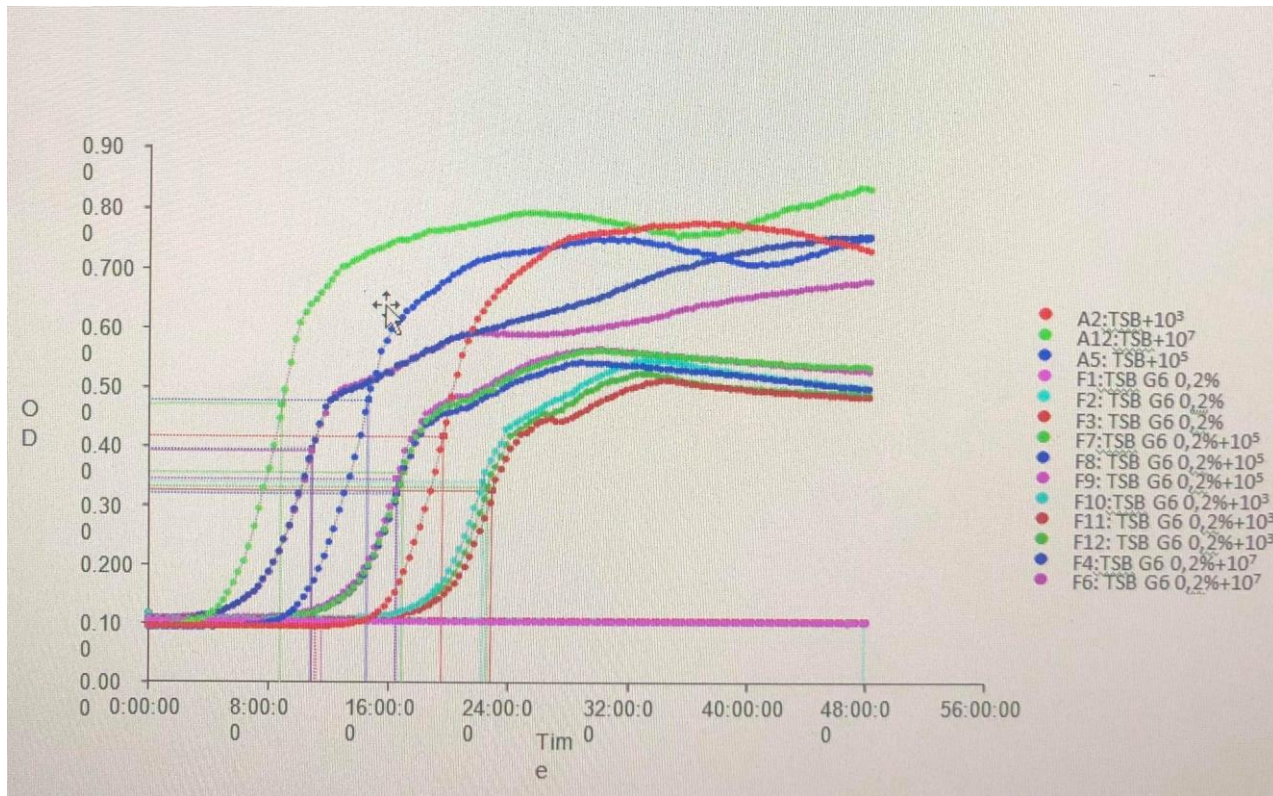
ABSTRACT

The aim of this study is to investigate how they affect and what are the results of liquid smokes, which are used in production in the food and fishery industry, against the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* strain Pirie 21075 B 127. The effect of Liquid smokes L9, G6, C3, D4, A1, E5 were investigated by the method of optical density (OD) at 580nm, in three different increasing concentrations. Each liquid smoke was investigated at nutrient medium in three (3) different populations for the microbial population (10^3 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^7 cfu/ml) and for forty-eight (48) hours after the microplates were filled under aseptic conditions, they were placed at 30°C using the Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader. C3 liquid smoke at a concentration of 0.1% had an effect against the pathogen *Listeria monocytogenes* Piere 21075 B 127, because no growth of the organism was observed. The results of this study showed that C3 liquid smoke could be an important weapon in the food and fishery industry against the growth of the pathogenic microorganism *L. monocytogenes*.

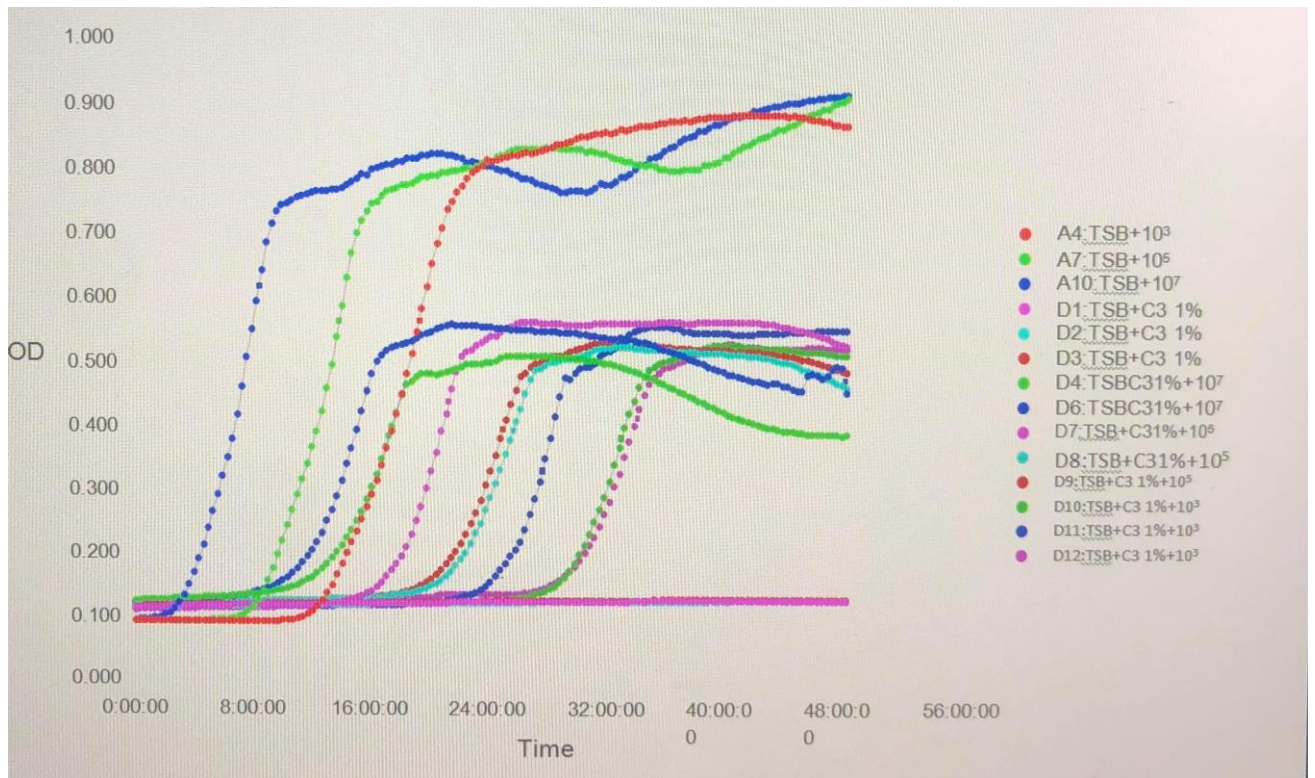
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



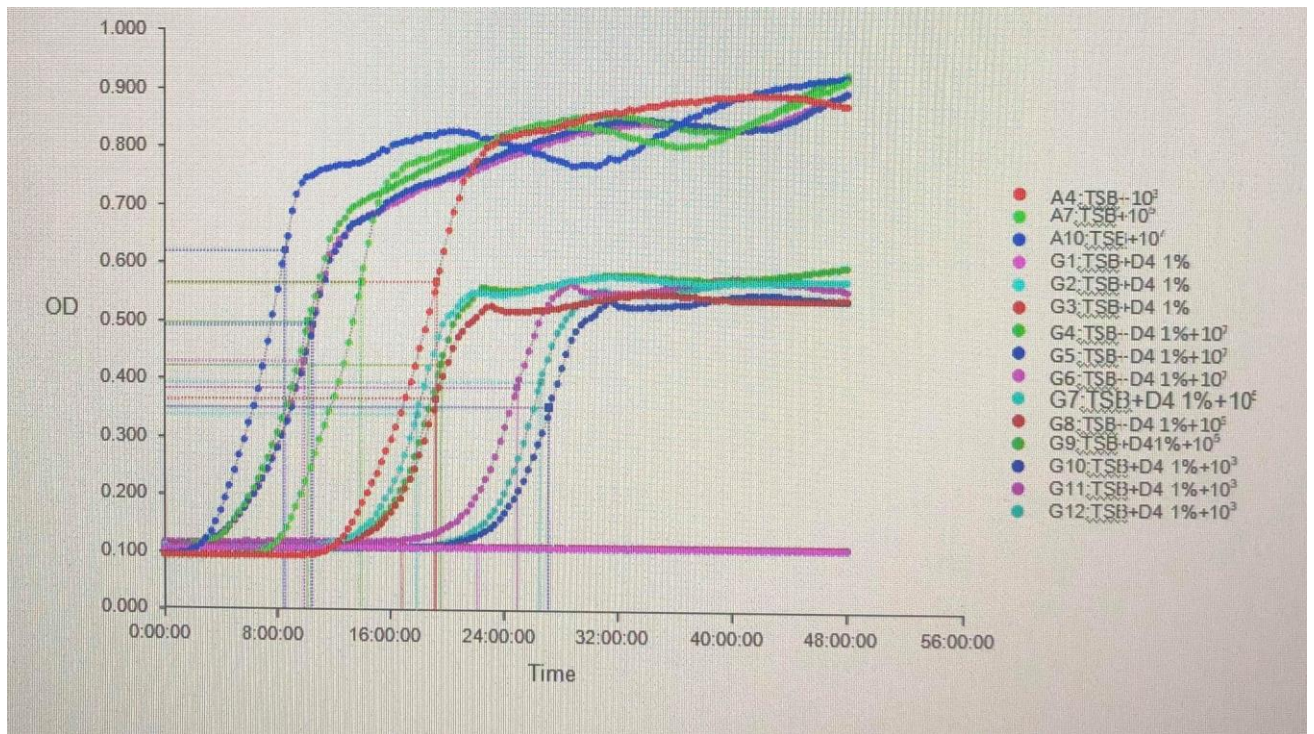
ΕΙΚΟΝΑ 8.1: L9 0.05 %



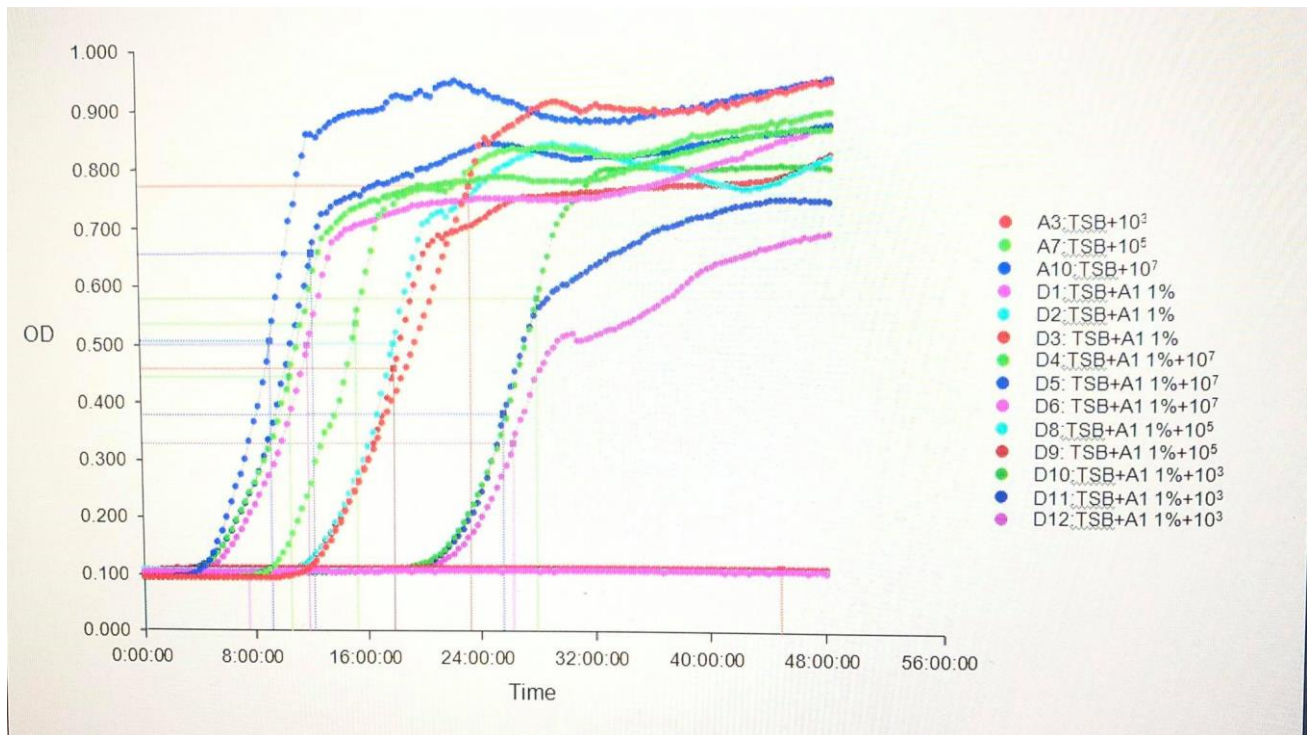
EIKONA 8.2: G6 0.2 %



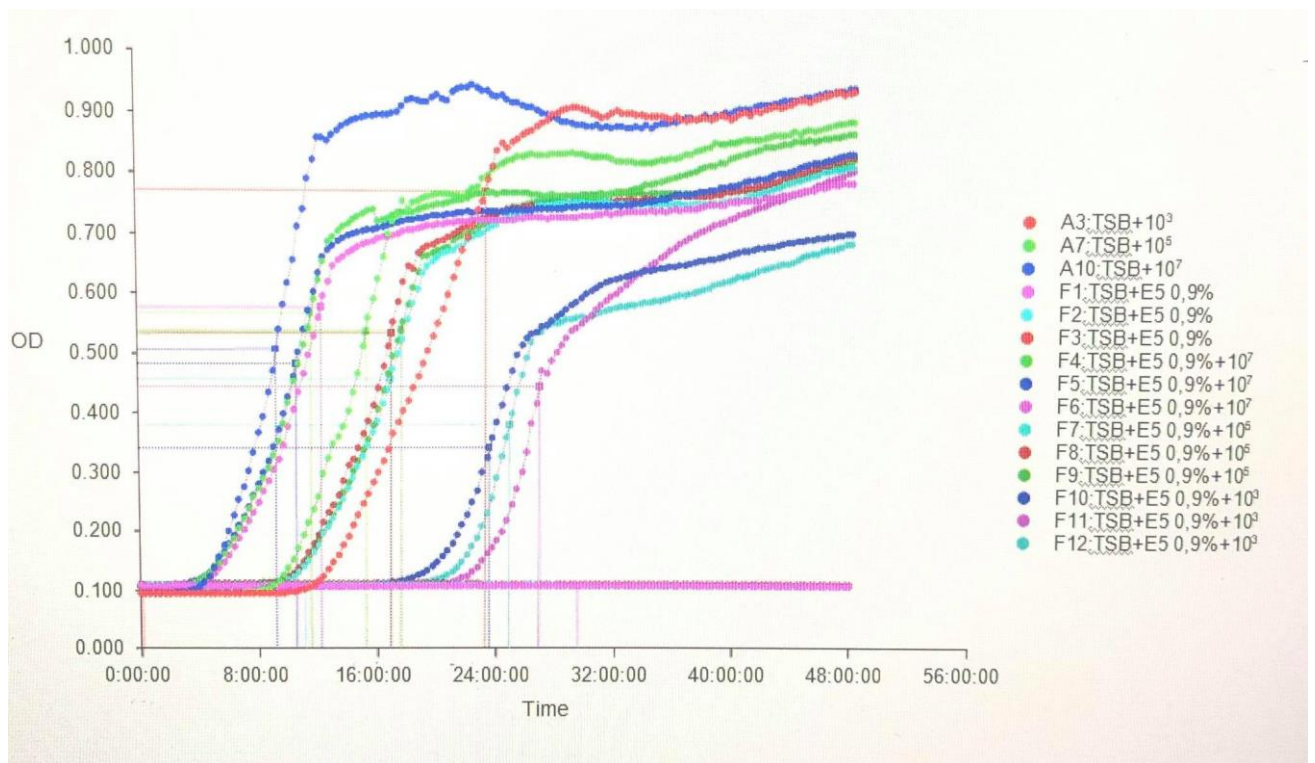
EIKONA8.3:C31%



EIKONA 8.4: D4 1%



EIKONA 8.5: A1 1%



EIKONA 8.6: E5 0.9%