



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αντιμικροβιακή δράση εναιωρημάτων υγρών καπνών έναντι
του *Listeria monocytogenes*»**

Βλασίου Κωνσταντίνος

Βόλος 2023



«Αντιμικροβιακή δράση εναιωρημάτων υγρών καπνών έναντι του *Listeria monocytogenes*»

«Antimicrobial action of liquid smoke suspensions against *Listeria monocytogenes*»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.

2) **Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη**, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

3) **Έλενα Γκολομάζου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

Στην οικογένεια μου,
Δημήτριο-Χρόνη-Παγόνα-Ιωάννα-Γιώργο-Αριστέα-Μαριάνθη,
που είναι πάντα δίπλα μου σε όλα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να δώσω σε αυτούς που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Μποζιάρη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη μεγάλη σε διάρκεια υποστήριξή του, τόσο κατά τη εκτέλεση του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Επίσης τεράστιες ευχαριστίες στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, κα Γκολομάζου Έλενα και κα Παρλαπάνη Φωτεινή για τις χρήσιμες οδηγίες και συμβουλές τους σε όλες τις φάσεις πραγματοποίησης της εργασίας. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ πολύ την υποψήφια διδάκτορα κα Συροπούλου Φαίδρα για την ανιδιοτελή συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω πολλές ευχαριστίες στην οικογένειά μου για την στήριξη, βοήθεια και την κατανόηση τους καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης εναιωρημάτων υγρών καπνών έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Η μελέτη των συνολικά έξι (6) καπνών (L9, G6, C3, D4, A1, και E5) που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με τη μέθοδο οπτικής πυκνότητας (OD). Οι εν λόγω καπνοί χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων-παραγωγής καπνιστών προϊόντων. Όλοι οι καπνοί ξεχωριστά μελετήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις και έναντι 3 διαφορετικών αρχικών μικροβιακών πληθυσμών της τάξεως των 10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml. Κατά την πλήρωση των microplates υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκαν στο Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader για διάρκεια σαράντα οκτώ (48) ωρών υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την διεξαγωγή του πειράματος έδειξαν ότι το δείγμα με τον καπνό L9 σε συγκέντρωση 0,15 % και το με τον καπνό C3 σε συγκέντρωση 1,00 % είχαν ανασταλτική δράση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 CFU/ml, αφού δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα τελικά αποτελέσματα της μελέτης, οι καπνοί L9 και C3 στις παραπάνω συγκεντρώσεις, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ικανοί ως παρεμποδιστικοί έναντι του *Listeria monocytogenes*.

Λέξεις-Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, αντιμικροβιακή δράση, υγρή κάπνιση, οπτική πυκνότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Βασικές έννοιες στον τομέα μεταποίησης και συντήρησης αλιευμάτων	1
1.2	Βιομηχανία τροφίμων	1
1.3	Μέθοδοι κάπνισης	2
1.3.1	Μέθοδος ψυχρής κάπνισης	3
1.3.2	Μέθοδος θερμής κάπνισης	3
1.3.3	Μέθοδος υγρής κάπνισης	3
1.4	Ασφάλεια και ποιότητα καπνιστών αλιευμάτων	4
1.5	Σύσταση καπνού	5
1.6	Καπνιστά είδη	6
1.7	Αλλοίωση αλιευτικών προϊόντων	7
1.8	Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων	8
1.9	Σκοπός της Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας	11
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
2.1.	Πειραματικός σχεδιασμός	12
2.2.	Αναζωογόνηση παθογόνου μικροοργανισμού	12
2.3.	Θρεπτικά υποστρώματα	13
2.4.	Υγροί καπνοί	13
2.5.	Πλήρωση μικροπλακών	14
2.6.	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας	15
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	17
3.1	Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών L9 και G6 στην αύξηση του <i>L. monocytogenes</i>	17
3.2	Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών C3 και D4 στην αύξηση του <i>L. monocytogenes</i>	21
3.3	Επίδραση των εναιωρημάτων των υγρών καπνών A1 και E5 στην αύξηση του <i>L. monocytogenes</i>	25
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	32
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33
	ABSTRACT	36
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	37





1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βασικές έννοιες στον τομέα μεταποίησης και συντήρησης αλιευμάτων

Η επεξεργασία ή μεταποίηση τροφίμων είναι μια σειρά διαδικασιών κατά τις οποίες τα τρόφιμα επεξεργάζονται μετά την πρωτογενή παραγωγή τους, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις συνδυάζονται με άλλα συστατικά, κι έτσι προκύπτουν προϊόντα προς άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο καθώς και πρώτες ύλες για την παραγωγή άλλων προϊόντων. Μεταποιημένα προϊόντα είναι για παράδειγμα τα καπνιστά ψάρια και τα προϊόντα ιχθυηρών. Τα ανωτέρω προϊόντα ταξινομούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί την ελάχιστη κατάλληλη επεξεργασία. Με άλλα λόγια, τα προϊόντα αυτά επεξεργάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα πολύ περισσότερο από τα νωπά προϊόντα και ταυτόχρονα να έχουν χαρακτηριστικά «φρέσκου προϊόντος», ως προς το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση ορισμένες. Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης αλιευτικών προϊόντων είναι η ψύξη, η κατάψυξη, η συσκευασία σε κενό αέρος, η αλάτιση, η θερμική επεξεργασία, το μαρινάρισμα και η κάπνιση (Μποζιάρης 2013).

1.2 Βιομηχανία τροφίμων

Η βιομηχανία τροφίμων είναι ένας τομέας της βιομηχανίας που ασχολείται με την επεξεργασία τροφίμων. Η αποστολή της βιομηχανίας τροφίμων είναι να παρέχει ποικιλία τροφίμων που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των καταναλωτών ως προς την εμφάνιση, το χρώμα, την υφή, την οσμή, τη γεύση αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι προς επεξεργασία τροφές που έχουν υψηλή θρεπτική αξία, τείνουν να καλύπτουν τις διατροφικές ανάγκες του καταναλωτή, που σημαίνει ότι είναι ασφαλή

για την υγεία του καταναλωτή και έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, επιτρέποντας τη διακίνηση, την πώληση και την αποθήκευση αγαθών μέχρι την κατανάλωσή τους .

1.3 Μέθοδοι κάπνισης

Η κάπνιση αποτελεί μια μέθοδο συντήρησης αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι οι ιχθύες, και σε ορισμένες περιπτώσεις συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους κατά τις οποίες εμφανίζεται ένα μικροβιακό φράγμα όπως είναι η αλάτιση και η αποξηράνση μετά και πριν τη κάπνιση αντίστοιχα. Υπάρχουν τρεις (3) γνωστοί μέθοδοι κάπνισης : η υγρή, η ψυχρή και η θερμή κάπνιση. Η μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w) όσο και η περιεκτικότητα σε οργανικές ουσίες (φαινολικές ουσίες) προσδίδουν αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η σύνθεση του καπνού εξαρτάται από τα παρακάτω:

- Είδος ξύλου
- Χρόνος καύσης
- Θερμοκρασία
- Ροή αέρα
- Περιεκτικότητα οξυγόνου
- Υγρασία

Τέλος, η κάπνιση προσδίδει άρωμα, γεύση και χρώμα στο προϊόν, καθώς και αντιμικροβιακή δράση (Μποζιάρης 2012).

1.3.1 Μέθοδος ψυχρής κάπνισης

Στη μέθοδο της ψυχρής κάπνισης, το προϊόν δεν ψήνεται αλλά αποξηραίνεται και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε ψυγείο. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας η θερμοκρασία στο θάλαμο αυξάνεται έως τους 37°C. Η διάρκεια μπορεί να κυμανθεί από μερικά λεπτά μέχρι και κάποιες εβδομάδες. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της ψυχρής κάπνισης τα προϊόντα δέχονται συνήθως μια προεργασία αλατίσματος(νιτρικά/νιτρώδη άλατα) όπου είναι επιτρεπτό από την Νομοθεσία και εν συνεχεία αρχίζει διαδικασία της κάπνισης. Τέλος, σύμφωνα με πηγές το κρύο κάπνισμα δείχνει να μειώνει τον αριθμό των βακτηρίων, όμως είναι αδύνατο να αναστείλει ή να παρεμποδίσει το παθογόνο μικροοργανισμό.

1.3.2 Μέθοδος θερμής κάπνισης

Η μέθοδος της θερμής κάπνισης αποτελείται δύο στάδια, και η θερμοκρασία του θαλάμου τείνει να αγγίξει σε ορισμένες περιπτώσεις τους 120°C. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αφυδάτωση των ιχθύων σε θερμοκρασίες μεταξύ +30°C και +55°C. Το δεύτερο στάδιο είναι η κύρια κάπνιση, όπου οι ιχθύες ψήνονται μεταξύ των θερμοκρασιών +80°C μέχρι +120°C, με την θερμοκρασία στο κέντρο του ιχθύος να αγγίζει τους 70°C-80°C. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ακολουθείται η ψύξη και τέλος η συσκευασία του προϊόντος.

1.3.3 Μέθοδος υγρής κάπνισης

Η μέθοδος της υγρής κάπνισης διενεργείται με ψεκασμό ή εμβάπτιση σε διάλυμα υγρού καπνού. Ο υγρός καπνός παράγεται μέσω της συμπύκνωσης και της κλασματικής απόσταξης του καπνού που προκύπτει με την καύση ξύλων. Τα βασικότερα θετικά χαρακτηριστικά αυτής της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, ο προσδιορισμός και ο έλεγχος των αρωματικών συστατικών που εκλαμβάνει το προϊόν και η επιλογή διαχωρισμού των βλαβερών ουσιών (όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες).

1.4 Ασφάλεια και ποιότητα καπνιστών αλιευμάτων

Οι κυριότεροι λόγοι για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των καπνιστών τροφίμων είναι οι εξής: μειωμένη ενεργότητα νερού, η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ιδιότητα του καπνού όπως επίσης και η θερμική επεξεργασία. Μέσω της θερμικής επεξεργασίας μπορεί να δημιουργηθεί ένα σύστημα υψηλότερης ασφαλείας για το τρόφιμο.

Η κάπνιση επιφέρει:

- Μείωση του βακτηριακού φορτίου στους ιχθύες
- αδρανοποίηση των ενζύμων και σπορίων
- εμπλουτισμό των ιστών με βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ιδιότητες

Ωστόσο τα καπνιστά αλιεύματα μπορεί να περιέχουν χημικές ουσίες εκτός από αυτές που προϋπήρχαν στον ιχθύ ως πρώτη ύλη, όπως είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) που παράγονται κατά την καύση των ξύλων σε θερμοκρασίες άνω των 400°C. Η συγκέντρωση των PAHs μεγαλώνει σε αναλογία κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης από τους 400°C έως τους 1000°C, γι' αυτό η θερμοκρασία είναι καθοριστικός παράγοντας στον σχηματισμό PAHs. Συναντώνται διακόσια (200) είδη από

πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες εκ των οποίων ορισμένοι είναι καρκινογόνοι, όπως το βενζοπυρένιο (Belichovska et al 2019).

1.5 Σύσταση καπνού

Η σύσταση του καπνού και των συμπυκνωμάτων του δεν έχει διευκρινιστεί σε μεγάλο βαθμό. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 300 ενώσεις στον καπνό, 288 στο συμπύκνωμα και γύρω στις 68 σε τρόφιμα που έχουν υποστεί κάπνιση πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει αυξημένη αντιδραστική ικανότητα των βασικών συστατικών του καπνού (π.χ. αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες) στα τρόφιμα όπως για παράδειγμα τα αλιεύματα. Οι πιο κοινές ενώσεις είναι οι φαινόλες που συντελούν σε όλες της επιδράσεις της κάπνισης του τροφίμου.

Ο καπνός αποτελείται από δύο στάδια, την αέρια και αυτή των έμμορφων συστατικών. Έμμορφα συστατικά είναι τα υγρά σωματίδια κολλοειδών ουσιών, χωρίς όμως σταθερό πυρήνα όπως της πίσσας, των ρητινών, των φαινολών σε υψηλό και χαμηλό σημείο βρασμού, τα οποία είναι κατανεμημένα ομοιόμορφα στην αέρια φάση όπου έχουν κ τον ρόλο του μεταφορέα τους. Επιπροσθέτως ο καπνός είναι ένα εναιώρημα σταγονιδίων που βρίσκεται σε συνεχή αέρια φάση και ατμών που σταθεροποιούνται στα σταγονίδια με ηλεκτροστατικά φορτία. Οι πτητικές ουσίες αυτές έχουν την σημαντική ιδιότητα για τη δημιουργία της γεύσης, του αρώματος και του χρωματισμού στα καπνιστά τρόφιμα καθώς και το βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα στην κάπνιση. Χαρακτηριστικά του καπνού η θερμοκρασία, η σκουρότητα, η υγρασία και η ταχύτητα κίνησης. Πιο συγκεκριμένα η θερμοκρασία παίζει ρόλο στο διαχωρισμό της μεθόδου της κάπνισης, δηλαδή σε ψυχρή ή θερμή. Η σκουρότητα όσο πιο μεγάλη είναι τόσο

ατελέστερη είναι η καύση των ξύλων, και τέλος η υγρασία και η ταχύτητα κίνησης επηρεάζουν το χρόνο της κάπνισης και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Επίσης άξιο αναφοράς είναι ότι κατά την κάπνιση κάποια συστατικά εισχωρούν εντός της σάρκας ενώ κάποια άλλα συστατικά του καπνού απορροφούνται από τα κενά που δημιουργούνται μεταξύ των κυττάρων και των επιφανειακών στιβάδων των ιχθύων στην φάση της αποξήρανσης.

Όσον αφορά το καπνό η σύσταση του επηρεάζεται από το είδος του ξύλου, την χημική σύνθεση του, και από τη θερμοκρασία της καύσεως όπως επίσης και από την διαθέσιμη ποσότητα του αέρα που προορίζεται για καύση (Belichovska et al. 2019). Το ιδανικό αποτέλεσμα στην κάπνιση έχουν τα εξής είδη ξύλου όπως η οξιά, η βελανιδιά, η κερασιά, η δρυς, και η καρυδιά όπου σε συνδυασμό με αρωματικά φυτά όπως το θυμάρι, η δάφνη και το δεντρολίβανο. Τέλος για την συντήρηση τροφίμου χρειάζεται η πτώση του pH των οξέων καθώς και η επίδραση της φορμαλδεΰδης και των φαινολικών ενώσεων που έχουν αντιμικροβιακή δράση. Το χρώμα των καπνιστών προϊόντων προκύπτει από την αντίδραση των πρωτεϊνών με τα καρβονύλια ενώ η οσμή από τις αλδεΰδες και τις καρβονυλικές ενώσεις.

1.6 Καπνιστά είδη

Σύμφωνα με αναφορές του παρελθόντος κάποιοι ιθαγενείς Αμερικάνοι για να καταφέρουν να διατηρήσουν τα ψάρια για μεγάλο χρονικό διάστημα, συνήθως για ταξίδια ή λόγω μη εύρεσης των συγκεκριμένων ειδών κατέφευγαν στην κάπνιση των ψαριών (Toledo 2008). Στην Ελλάδα τρία είδη που έχουν την δυνατότητα ανάπτυξης μεταποίησης είναι ο σολομός, η πέστροφα και το χέλι (Καλλίγερος 2004). Γενικότερα οι

κυριότερες οικογένειες αλιευμάτων που υπόκεινται σε τεχνικές μεταποίησης και πιο συγκεκριμένα κάπνισης είναι οι σολομονίδες (*Salmonidae*), οι κυπριανίδες (*Cyprinidae*), οι σκομβρίδες (*Scombridae*), οι κλουπεΐδες (*Clupeidae*), οι μερλουκίδες (*Merluccidae*) και ορισμένα δίθυρα όπως στρείδια και χτένια.

1.7 Αλλοίωση αλιευτικών προϊόντων

Αλλοίωση ενός τροφίμου έχουμε όταν υπάρχει υποβάθμιση της ποιότητας ενός τροφίμου, δηλαδή το τρόφιμο έχει υποστεί κάποιες οργανοληπτικές αλλαγές που το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Βάσει εκτιμήσεων, αναφέρεται ότι περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής χάνεται λόγω της μικροβιακής αλλοίωσης. Αυτό οφείλεται κυρίως σε μύκητες και ψυχρότροφα βακτήρια (Huis int Velt et al 1996) καθώς και άλλες αιτίες όπως δράση ενζύμων, αφυδάτωση, οξείδωση, μόλυνση και φυσική βλάβη (Harbell 1988). Όσον αφορά τα θαλάσσια προϊόντα κατά τη συντήρησή τους, ένα ποσοστό της αρχικής μικροβιακής σύνθεσής τους οι λεγόμενοι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) αυξάνεται με αποτέλεσμα να παραχθούν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις δυσάρεστες οσμές στο προϊόν. Η επιλογή των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τις συνθήκες που βρίσκονται τα προϊόντα κατά της συντήρησή τους, δηλαδή τη θερμοκρασία, την ατμόσφαιρα και τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις (Παρλαπάνη, 2013). Για το λόγο ότι τα θαλασσινά τρόφιμα είναι πιο ευπαθή σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης απαιτείται πολύ πιο προσεκτικός χειρισμός και αποθήκευση (Ashie et al. 1996).

1.8 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Οι κατηγορίες των παθογόνων βακτηρίων που μπορεί να μολύνουν τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι δύο. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει βακτήρια, τα οποία εμφανίζονται φυσικά στο υδάτινο περιβάλλον εντοπίζονται και στα ίδια τα ιχθυηρά. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει βακτήρια, τα οποία εισέρχονται από περιβαλλοντική μόλυνση (βιομηχανικά ή/και αστικά λύματα και οικιακά απόβλητα), καθώς και κατά τη συγκομιδή και επεξεργασία των ιχθυηρών. Ο βασικός κίνδυνος των βακτηρίων εντοπίζεται στην περίπτωση που δεν ακολουθούνται οι Ορθές Βιομηχανικές Πρακτικές (GMPs), συμπεριλαμβανομένων των Ορθών Πρακτικών Υγιεινής (GHPs). Ειδικότερα, έντονο ενδιαφέρον έχει προκληθεί από την μόλυνση του *L. monocytogenes* στην επιστημονική κοινότητα, εξαιτίας της επικινδυνότητας του προβλήματος στη βιομηχανία τροφίμων, με τις έρευνες που εστιάζουν γύρω από το βακτήριο αυτό είναι πολλές.

Listeria monocytogenes

Σύμφωνα με τον FAO, το *Listeria monocytogenes* έχει εντοπιστεί σε πολλά προϊόντα αλιείας, από τα τέλη του 1980. Αυτό γίνεται διότι το βακτήριο επιβιώνει από την μέθοδο της ψυχρής κάπνισης, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας που δεν επαρκεί για την καταστροφή του. Το *Listeria monocytogenes* ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*, μαζί με άλλα εννέα είδη. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξής της είναι: η θερμοκρασία, η παρουσία οργανικών οξέων και το pH τους, η ατμόσφαιρα της συσκευασίας, η συγκέντρωση άλατος και περιεκτικότητα σε σάκχαρα (a_w). Το *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 0-45°C και καταστέλλεται σε θερμοκρασίες άνω των 50°C. Επίσης αναπτύσσεται σε περιβάλλον με pH έως και 4,4. Ποικίλα οξέα (οξικό, κιτρικό, γαλακτικό) σε συγκέντρωση 0,1% μπορούν να

αναστείλλουν την ανάπτυξή της. Η τιμή ενεργότητας ύδατος (a_w) για άριστη ανάπτυξη είναι $\geq 0,97$. Η θερμοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού μεγαλώνει καθώς μειώνεται η τιμή a_w , πράγμα που σημαίνει ότι προκαλείται σοβαρό πρόβλημα στη βιομηχανία τροφίμων. Σε μέτριες συγκεντρώσεις άλατος (π.χ. 6,5%) ο πληθυσμός του παθογόνου αυξάνει σε υψηλά επίπεδα, συνεχίζει όμως να αναπτύσσεται σε ακόμη μεγαλύτερες αλατότητες. Η χαμηλή θερμοκρασία αυξάνει την ανθεκτικότητα του οργανισμού σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Το *L. monocytogenes* είναι ικανό να μολύνει τον άνθρωπο, επιφέροντας λιστερίωση. Εμφανίζεται στο νερό και στο έδαφος και έχει την δυνατότητα να εισέλθει σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων με κίνδυνο να επιμολύνει τα προϊόντα, όταν εντοπίσει τις κατάλληλες συνθήκες. Σε φορείς του βακτηρίου και σε άτομα που νοσούν από λιστερίωση, το *L. monocytogenes* αποβάλλεται μέσω την κένωση. Από το έδαφος, ο μικροοργανισμός μεταφέρεται στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις μέσω των υποδημάτων και των ενδυμάτων των εργαζομένων, καθώς και με τα οχήματα στα οποία προσκολλάται. Ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός μπορεί να βρεθεί παντού στη φύση και να απομονωθεί από τη βλάστηση, το έδαφος, τα λύματα, το νερό, τις ζωοτροφές, το κρέας, τα πουλερικά καθώς επίσης και τα θαλασσινά. Σύμφωνα με τους Gray και Killinger (1966) το ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με τη λιστερίωση στον άνθρωπο αγγίζει το 30% εκδηλώνοντας λοιμώξεις όπως μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα τροφιμογενή παθογόνα, το *L. monocytogenes* επιβιώνει καλά σε θερμοκρασίες ψυγείου. Αν και οι λοιμώξεις που προκαλεί αυτός ο μικροοργανισμός έχουν αναγνωριστεί για περισσότερα από 50 χρόνια, μόνο τέσσερις σημαντικές επιδημίες τροφίμων (1979-1985) έχουν τεκμηριωθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά. Ωστόσο, κρούσματα στο παρελθόν μπορεί να έχουν παραβλεφθεί λόγω της έλλειψης αξιόπιστης, γρήγορης

διαδικασίες απομόνωσης από τα τρόφιμα, και το γεγονός ότι η λιστερίωση ήταν μόνο μια αναφερόμενη ασθένεια από το 1986. Το *L. monocytogenes* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης, μιας σοβαρής νόσου που επηρεάζει ανοσοκατεσταλμένα άτομα, έγκυες γυναίκες, ηλικιωμένους και μικρά παιδιά (Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiwicz, 2014). Διαφορετικό από τα περισσότερα παθογόνα, το *L. monocytogenes* είναι πανταχού παρόν και ένας κοινός ρύπος στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, κυρίως λόγω του σχηματισμού ανθεκτικών βιοφίλμ στις επιφάνειες (Manios and Skandamis, 2014, Silva and Martinis, 2012). Η απουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας σε θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα ευνοεί την ανάπτυξή του (Gombas, Chen, Clavero, & Scott, 2003). Κατά συνέπεια, τα επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος που μολύνονται με *L. monocytogenes* μετά από θερμική επεξεργασία μπορεί να περιέχουν υψηλούς αριθμούς παθογόνου λόγω της παρατεταμένης διάρκειας ζωής στο ψυγείο, θέτοντας σε κίνδυνο τους καταναλωτές. Οι εκτιμήσεις κινδύνου έχουν δείξει ότι τα αλλαντικά ανήκουν στην κατηγορία «πολύ υψηλού κινδύνου» των τροφίμων RTE (FDA-FSIS, 2003). Ένας αριθμός μελετών έχει αξιολογήσει και μοντελοποιήσει τη μεταφορά του *L. monocytogenes* από εξοπλισμό (κόφτες), σκεύη (μαχαίρια, κοπτήρες) και χειριστές τροφίμων σε προϊόντα RTE, καταδεικνύοντας τη σημασία της διασταυρούμενης μόλυνσης μετά την επεξεργασία. Ορισμένες ποσοτικές εκτιμήσεις κινδύνου εξέτασαν την επίδραση των αναστολέων ανάπτυξης (γαλακτικό, διοξικό) που προστέθηκαν στα προϊόντα κρέατος RTE (ζαμπόν και γαλοπούλα), δείχνοντας αριθμητικά πώς ήταν σε θέση να μειώσουν τον σχετικό κίνδυνο θανάτων που σχετίζονται με λιστερίωση.

1.9 Σκοπός της Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης έξι (6) διαφορετικών υγρών καπνών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων και πιο συγκεκριμένα στη βιομηχανία παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Ο βασικός στόχος της εργασίας ήταν εύρεση του πιο αποτελεσματικού υγρού καπνού ως προς την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) διαφορετικά είδη υγρών καπνών σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τους στην ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* Scott A. Για την παρατήρηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, για κάθε συγκέντρωση, έγινε πλήρωση των microplates και στη συνέχεια με τη βοήθεια του μηχανήματος μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD) με την συσκευή Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα με την καμπύλη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε κάθε συγκέντρωση.

2.2. Αναζωογόνηση παθογόνου μικροοργανισμού

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αναζωογόνηση του στελέχους *L. monocytogenes* Scott A από τους -80°C , όπου βρισκόταν αποθηκευμένο σε σωληνάκια με beads, σε 9ml θρεπτικού υποστρώματος TSB και επώαση του στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 2516 g για 12 λεπτά προκειμένου να ληφθεί βακτηριακό ίζημα το οποίο επαναωρήθηκε ξανά σε 10ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 8,5g NaCl και 1 g πεπτόνη/L απιονισμένου νερού). Έπειτα, έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ώστε να ληφθούν οι επιθυμητοί πληθυσμοί του μικροοργανισμού (10^3 , 10^5 , 10^7 cfu/ml) που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια του πειράματος.

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα

Tryptone Soy Broth (TSB)

Το TSB είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης, στο οποίο επιτρέπεται η ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών που έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών.

Διαδικασία παρασκευής: Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 30 gr σκόνης TSB και συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Με τη βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 10 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121°C για 15 λεπτά.

Maximum Recovery Diluent (MRD)

Το MRD (0,85% NaCl (w/v) + 0,1% peptone (w/v)) είναι ισοτονικό ωσμορυθμιστικό διάλυμα, παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων για τη μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων.

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

2.4. Υγροί καπνοί

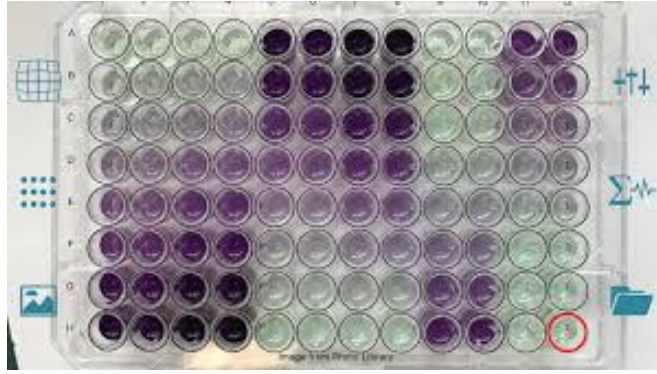
Στο πείραμα οι έξι (6) καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι L9, G6, C4, D4, A1, E5. Ο κάθε ένας δοκιμάστηκε σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 2.1):

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	0.1	0.2	0.35
C3	0.5	0.75	1.0
D4	0.5	0.75	1.0
A1	0.6	0.8	1.0
E5	0.6	0.9	1.2

2.5. Πλήρωση μικροπλακών

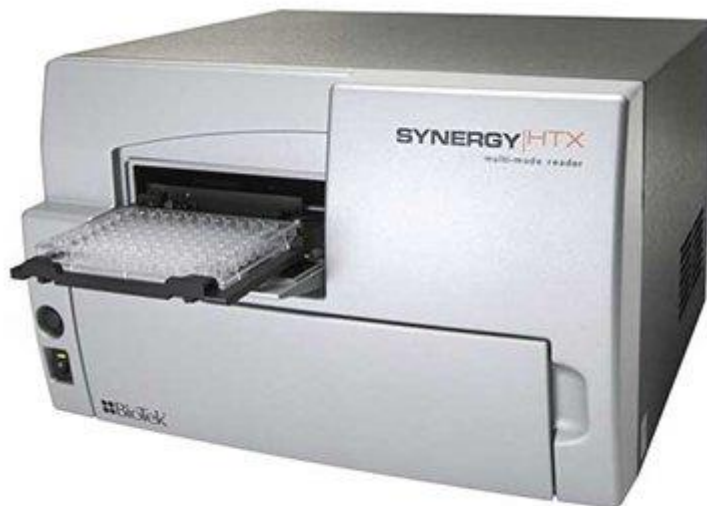
Το γέμισμα της κάθε μικροπλάκας 96 θέσεων (βοθρίων με επίπεδο πυθμένα) πραγματοποιούταν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής. Σε κάθε σειρά βοθρίων της μικροπλάκας έγινε πλήρωση με 180 μl υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB που περιλάμβανε και τον καπνό στην επιθυμητή κάθε φορά συγκέντρωση, μαζί με 20 μl από τον κάθε βακτηριακό πληθυσμό (10^3 , 10^5 , 10^7 cfu/ml). Επίσης, σε μία σειρά της μικροπλάκας προστέθηκαν 180 μl TSB χωρίς καπνό και 20 μl των διαφορετικών πληθυσμών του μικροοργανισμού, τα οποία αποτέλεσαν και τους μάρτυρες. Αφού έγιναν όλες οι παραπάνω ενέργειες, η μικροπλάκα τοποθετήθηκε στο εξειδικευμένο μηχάνημα Synergy HTX MultiMode Microplate Reader.



Εικόνα 2.1. Microplate.

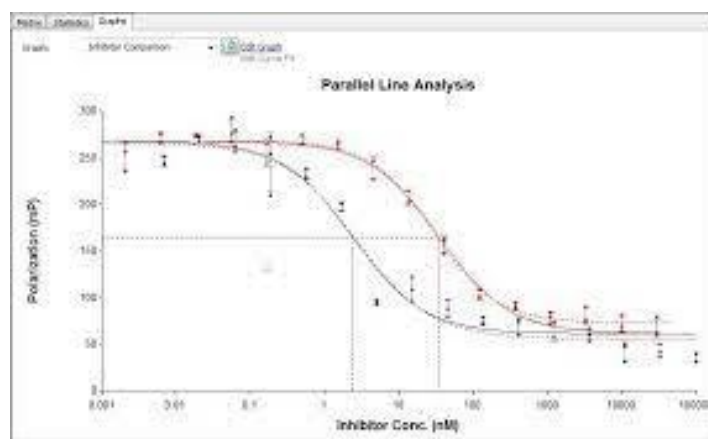
2.6. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) microplates όπου στο καθένα μελετήθηκαν δύο (2) υγροί καπνοί. Στην πρώτη σειρά του microplate τοποθετήθηκαν ανά τέσσερα (4) βοθρία 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 βοθρία τοποθετούνταν 200μl του διαλύματος TSB με την επιθυμητή συγκέντρωση καπνού, όπου αυτά αποτελούσαν τον μάρτυρα, και συνεχίζοντας στα επόμενα βοθρία 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. Έπειτα το κάθε microplate τοποθετήθηκε στη συσκευή Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2. Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader.

Η λήψη των μετρήσεων απορρόφησης γινόταν στα 580 nm, κάθε είκοσι (20) λεπτά σε θερμοκρασία 30°C για 48 ώρες. Τα τελικά αποτελέσματα- διαγράμματα σχηματίστηκαν και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού Gen⁵ Data Analysis Software (Εικ.2.3).



Εικόνα 2.3. Λογισμικό Gen⁵ Data Analysis Software.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά το τέλος του πειράματος και την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι οι καπνοί είχαν επίδραση στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Γενικότερα, στις συγκεντρώσεις, όπου χρησιμοποιήθηκε υγρός καπνός σημειώθηκε αναστολή στην αύξηση του μικροοργανισμού. Ωστόσο ο κάθε καπνός οδήγησε σε διαφορετικό αποτέλεσμα, καθώς η δράση του διέφερε ανάλογα με τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό.

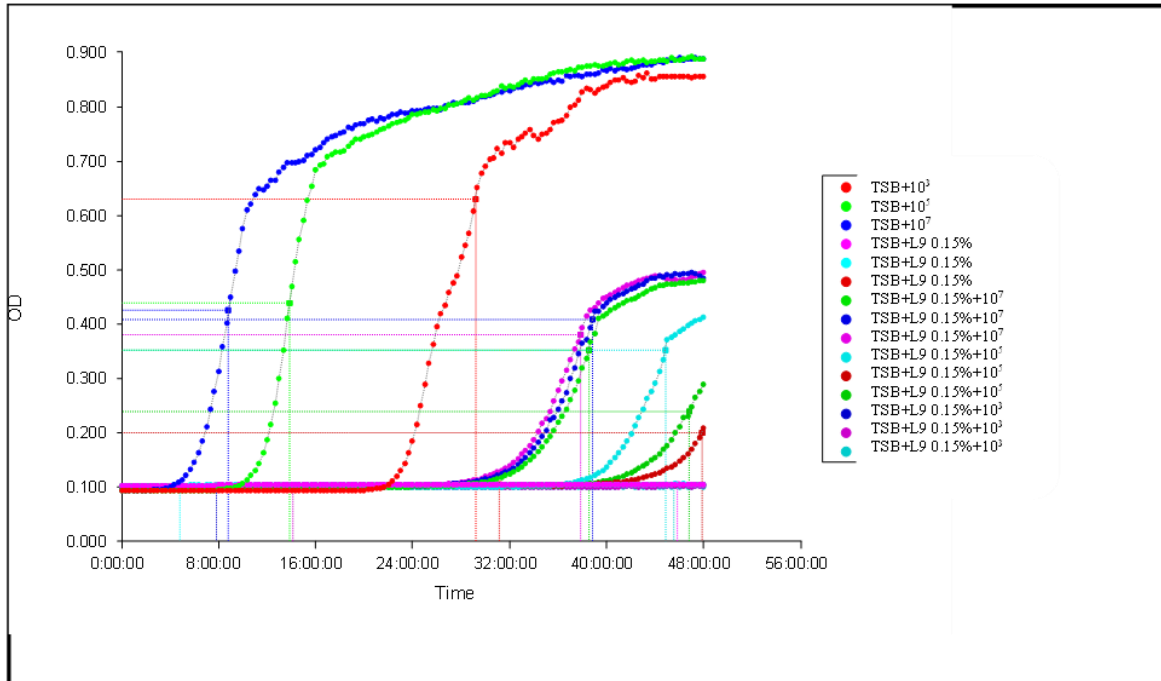
Παρακάτω εμφανίζονται οι τρεις (3) πίνακες με την επίδραση του κάθε καπνού στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης μ_{max} και τον χρόνο προσαρμογής (Lagtime) συνοπτικά για κάθε μικροπλάκα. Οι συγκεντρώσεις των καπνών και αντίστοιχα διαγράμματα είναι: α) L9 0.15%, β) G6 0.35%, γ) C3 1%, δ) D4 0.75%, ε) A1 0.6% και στ) E5 0.9%.

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

Οι μετρήσεις του πρώτου (1ου) microplate παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίν.3.1). Στη συνέχεια, παραθέτονται οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του κάθε καπνού. Οι καπνοί στην περίπτωση αυτή ήταν οι L9 και G6 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία είναι ευδιάκριτες οι μεταβολές.

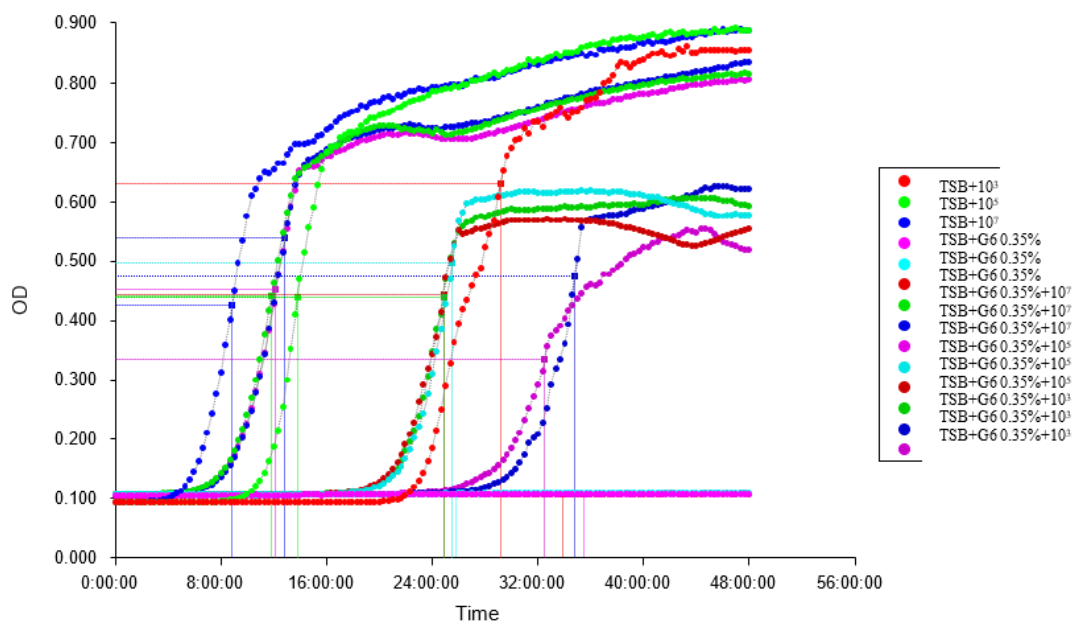
Πίνακας 3.1. Σύνοψη 1ης μικροπλάκας: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) του *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C (Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων).

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	10^3	2,23±0,31	23,02±436,84
	10^5	2,96±0,31	10,53±436,84
	10^7	2,37±0,31	4,22±436,84
L9 0,05 %	10^3	0,02±0,63	25,50±477,69
	10^5	2,10±0,25	31,9±76,36
	10^7	1,72±0,10	24,5±2,82
L9 0,1 %	10^3	3,1±1,48	43,31±0,01
	10^5	1,58±0,24	35,3±2,88
	10^7	1,34±0,25	26,44±3,49
L9 0,15 %	10^3	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη	
	10^5	1,15±0,43	40,83±113,37
	10^7	1,42±0,10	31,57±12,71
G6 0,1 %	10^3	2,29±0	22,05±0
	10^5	2,54±0,39	14,1±8,10
	10^7	2,78±0,17	4,6±3,29
G6 0,2 %	10^3	3,23±1,6	25,05±6,21
	10^5	2,42±0,43	18,16±10,12
	10^7	2,54±0,21	6,52±10,38
G6 0,35 %	10^3	2,53±0,48	27,6±31,27
	10^5	2,82±0,03	20,13±2,13
	10^7	2,35±0,07	6,53±2,10



Σχήμα 3.1.1. Επίδραση του καπνού L9 συγκέντρωσης 0,15% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού L9 0,15% v/v παρατηρούμε ότι το *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 31,57 h, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $1,42 \text{ h}^{-1}$. Για τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν περίπου κατά 9 h μεγαλύτερος, (40,83 h), σε σχέση με το αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml, με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης να εμφανίζεται ελαφρώς μικρότερος ($1,15 \text{ h}^{-1}$). Όσον αφορά στην περίπτωση του αρχικού πληθυσμού 10^3 cfu/ml, η συγκέντρωση 0,15% του καπνού L9, είχε ανασταλτική δράση καθώς δεν καταγράφηκε η ανάπτυξή του. Τέλος, λόγω της ύπαρξης του καπνού παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.



Σχήμα 3.1.2. Επίδραση του καπνού G6 συγκέντρωσης 0,35% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

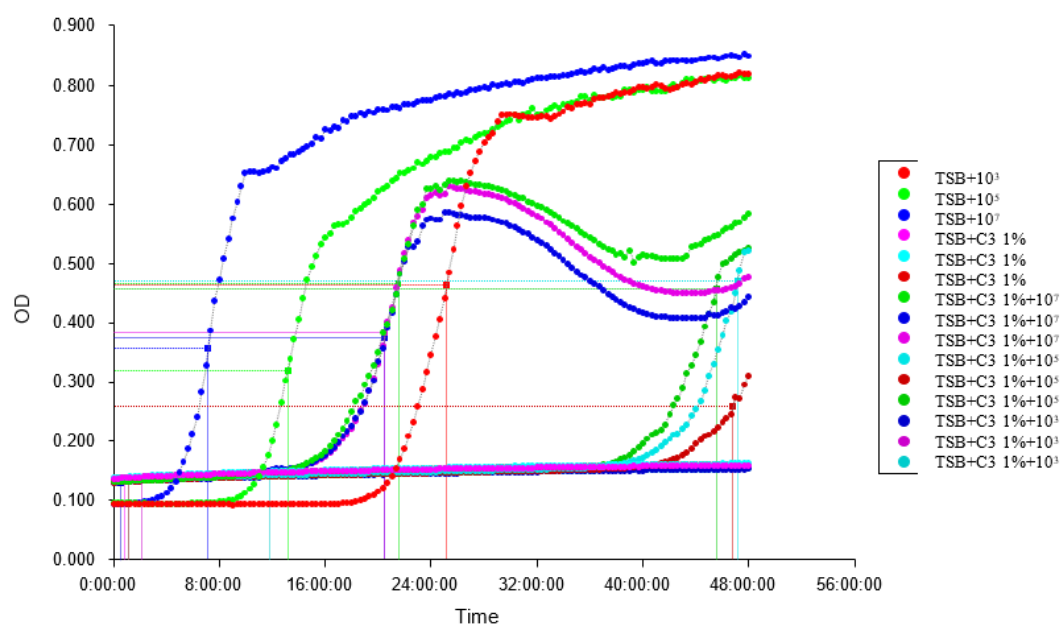
Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού G6 συγκέντρωσης 0,35% v/v παρατηρούμε ότι το *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 6,53 h, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $2,35 \text{ h}^{-1}$. Για τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν σχεδόν τριπλάσιος (20,13 h), ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν οριακά μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού 10^7 cfu/ml. Στον αρχικό πληθυσμό 10^3 cfu/ml η παρουσία του καπνού αύξησε περαιτέρω το μέσο χρόνο προσαρμογής (27,6 h), αλλά αντίθετα μειώθηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ($2,53 \text{ h}^{-1}$) σε σύγκριση με τον πληθυσμό 10^5 cfu/ml. Τέλος, παρατηρούμε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών, ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, λόγω της ύπαρξης του καπνού, με εντονότερη την αύξηση αυτή στη συγκέντρωση 10^5 cfu/ml.

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

Οι μετρήσεις του δεύτερου (2ου) microplate παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίν.3.2). Στη συνέχεια, αναλύονται οι μετρήσεις του κάθε καπνούσε διαγράμματα. Οι καπνοί που εξετάστηκαν στην δεύτερη μικροπλάκα ήταν οι C3 και D4. Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία είναι ευδιάκριτες οι μεταβολές.

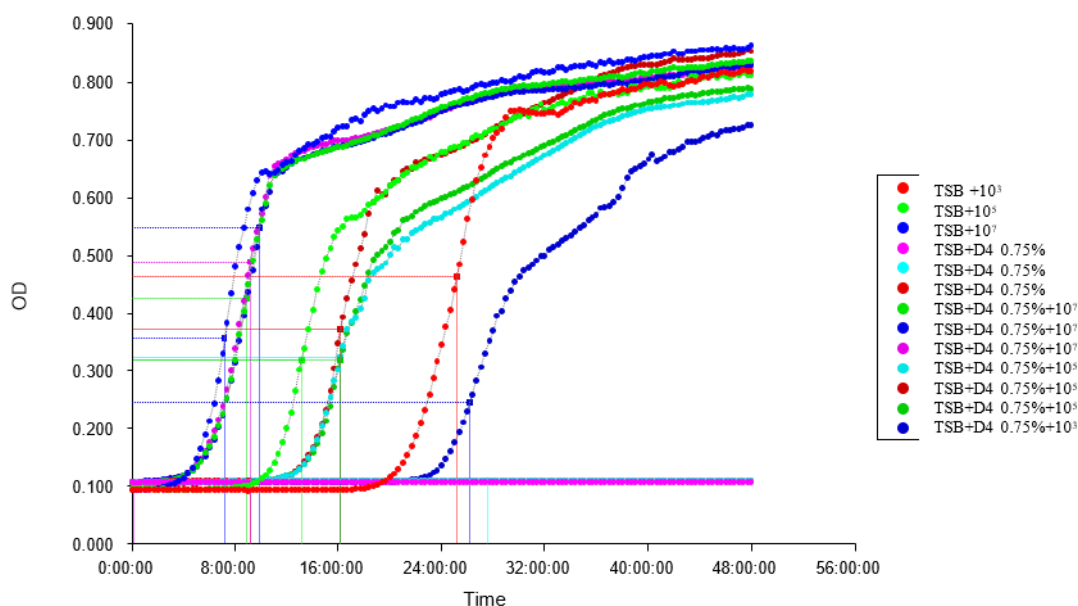
Πίνακας 3.2. Σύνοψη 2ης μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) του *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C (Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων).

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	10^3	2,07±0,41	22,11±429,95
	10^5	1,89±0,41	11,11±429,95
	10^7	2,85±0,41	4,51±429,95
C3 0,5 %	10^3	2,55±0	28,4±0
	10^5	2,27±0,36	12,18±458,70
	10^7	3,14±0,63	4,64±212,33
C3 0,75 %	10^3	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη	
	10^5	1,84±0,05	31,45±10,20
	10^7	1,95±0,02	10,18±3,5
C3 1 %	10^3	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη	
	10^5	1,78±0,28	40,82±105,97
	10^7	1,82±0,09	15,3±4,62
D4 0,5 %	10^3	1,99±0,13	20,08±2,39
	10^5	2,42±0,34	12,16±1,60
	10^7	2,53±0,29	4,34±4,67
D4 0,75 %	10^3	1,42±0,1	23,46±103,8
	10^5	1,98±0,26	13,21±7,45
	10^7	2,64±0,41	5,03±6,24
D4 1 %	10^3	2,24±0,68	18,89±3,76
	10^5	2,21±0,32	11,04±3,13
	10^7	2,28±0,27	4,66±6,17



Σχήμα 3.2.1. Επίδραση του καπνού C3 συγκέντρωσης 1% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού C3 συγκέντρωσης 1% v/v παρατηρούμε ότι το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 15,3 h, ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $1,82 \text{ h}^{-1}$. Για αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν παραπάνω από διπλάσιος (40,82 h), ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν κατά ελάχιστα μικρότερος ($1,78 \text{ h}^{-1}$) συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού 10^7 cfu/ml. Όσον αφορά στην περίπτωση του αρχικού πληθυσμού 10^3 cfu/ml, η συγκέντρωση 1% του καπνού C3, δεν καταγράφηκε η ανάπτυξή του. Τέλος, λόγω της ύπαρξης του καπνού παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.



Σχήμα 3.2.2. Επίδραση του καπνού D4 συγκέντρωσης 0,75% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

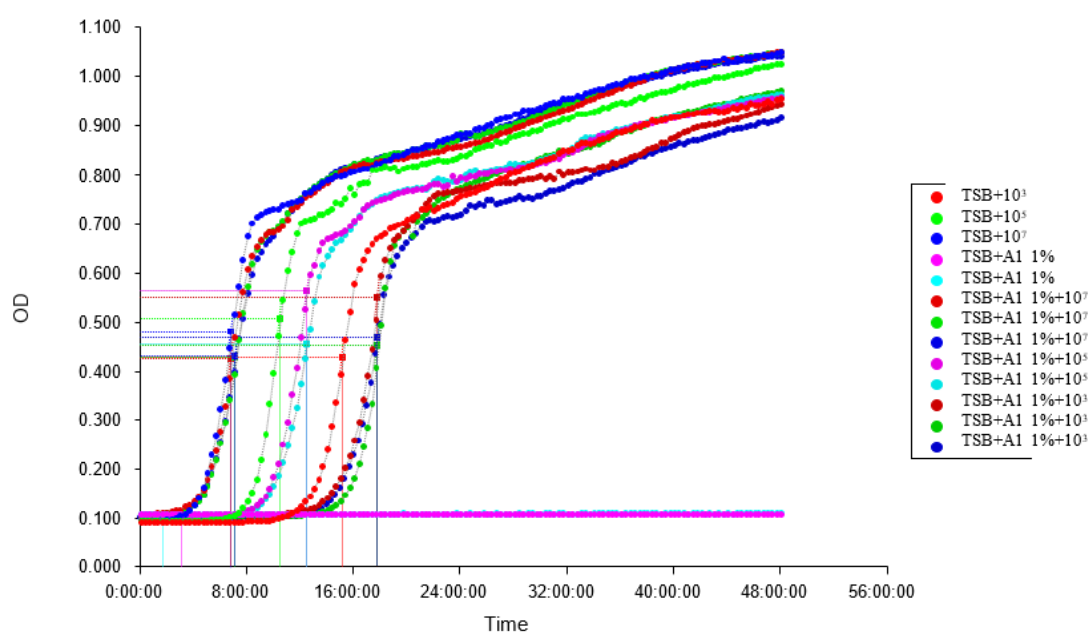
Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού D4 συγκέντρωσης 0,75% v/v παρατηρούμε ότι το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής μόλις 5,03 h, ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $2,64\text{ h}^{-1}$. Για τον αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού αυξήθηκε κατά περίπου τρεις (3) φορές (13,21 h), ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε μειώθηκε ($1,98\text{ h}^{-1}$). Στον αρχικό πληθυσμό 10^3 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής αυξήθηκε κατά περίπου 10 h (23,46 h) σε σύγκριση με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μειώθηκε σε $1,42\text{ h}^{-1}$. Τέλος, λόγω της ύπαρξης του καπνού παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν, και στην εν λόγω περίπτωση, ελαφρώς μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.

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

Οι μετρήσεις του τρίτου (3ου) microplate παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίν.3.3). Στη συνέχεια, αναλύονται οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του κάθε καπνού. Οι καπνοί που εξετάστηκαν ήταν οι A1 και E5. Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία είναι ευδιάκριτες οι μεταβολές.

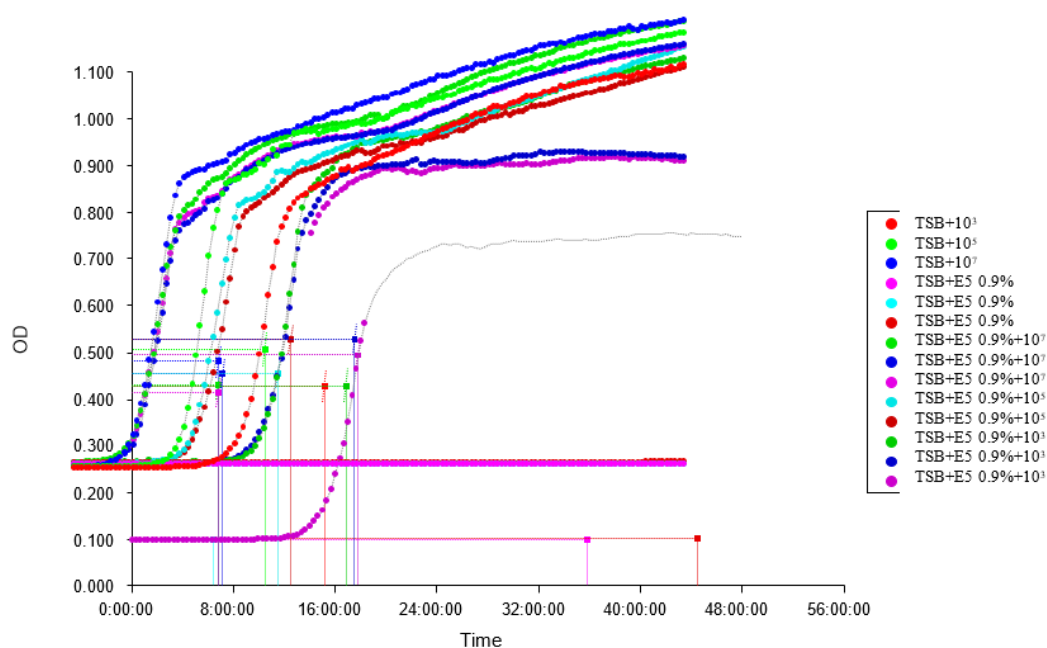
Πίνακας 3.3. Σύνοψη 3ης μικροπλάκας: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) του *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C (Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων).

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	10^3	3,39±0,13	12,38±205,40
	10^5	3,71±0,13	7,39±205,40
	10^7	3,5±0,13	4,18±205,40
A1 0,6 %	10^3	2,98±0,32	13,92±1,99
	10^5	2,97±0,19	8,27±1,95
	10^7	3,38±0,20	4,38±2,35
A1 0,8 %	10^3	3,52±0,30	13,3±5,87
	10^5	3,34±0,13	9,59±2,81
	10^7	3,49±0,38	4,65±23,68
A1 1 %	10^3	4,37±0,19	14,6±26,13
	10^5	3,25±0,25	9,25±3,66
	10^7	3,63±0,35	4,37±6,20
E5 0,6 %	10^3	4,16±0,14	12,47±3,14
	10^5	3,48±0,28	7,91±5,00
	10^7	3,48±0,18	4,14±4,51
E5 0,9 %	10^3	3,31±0,10	14,37±3,84
	10^5	3,09±0,04	8,37±0.61
	10^7	3,11±0,05	4,15±4,73
E5 1,2 %	10^3	3,36±0,03	14,66±37,38
	10^5	3,3±0,37	8,53±4,.06
	10^7	3,24±0,20	4,07±9,44



Σχήμα 3.3.1. Επίδραση του καπνού A1 συγκέντρωσης 0,6% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού A1 συγκέντρωσης 0,6% v/v παρατηρούμε ότι το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,38 h, ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $3,38 \text{ h}^{-1}$. Για αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής σχεδόν διπλασιάστηκε (8,27 h), ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν κατά ελάχιστα μειωμένος ($2,97 \text{ h}^{-1}$) συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού 10^7 cfu/ml. Όσον αφορά στην περίπτωση του αρχικού πληθυσμού 10^3 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής αυξήθηκε κατά περίπου 5 h (13,92 h), με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης να αυξάνεται και αυτός ($2,98 \text{ h}^{-1}$). Τέλος, λόγω της ύπαρξης του καπνού παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.



Σχήμα 3.3.2. Επίδραση του καπνού E5 συγκέντρωσης 0,9% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού (10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

Αρχικά, σχετικά με την επίδραση του καπνού E5 συγκέντρωσης 0,9% v/v παρατηρούμε ότι το *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 10^7 cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,15 h, ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $3,11 \text{ h}^{-1}$. Για αρχικό πληθυσμό 10^5 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής σχεδόν διπλασιάστηκε (8,37 h), ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν κατά ελάχιστα μειωμένος ($3,09 \text{ h}^{-1}$) συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού 10^7 cfu/ml. Όσον αφορά στην περίπτωση του αρχικού πληθυσμού 10^3 cfu/ml, ο μέσος χρόνος προσαρμογής αυξήθηκε κατά περίπου 6 h (14,37 h), με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης να αυξάνεται και αυτός ($3,31 \text{ h}^{-1}$). Τέλος, λόγω της ύπαρξης του καπνού παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν λίγο μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το *L. monocytogenes* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παθογόνους που απασχολούν την βιομηχανία τροφίμων δεδομένου ότι α) είναι ψυχρότροφος παθογόνος μικροοργανισμός δηλαδή έχει την ικανότητα να αυξάνει σε θερμοκρασίες ψύξης, β) έχει την ικανότητα να δημιουργεί βιοϋμένια σε επιφάνειες επεξεργασίας αλιευτικών προϊόντων και λοιπών τροφίμων ζωικής προέλευσης και γ) μπορεί να προκαλέσει σοβαρή λοίμωξη έως και θάνατο σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (θνητότητα πάνω από 30%). Επομένως, η ανάδειξη αποτελεσματικών εμποδίων έναντι της αύξησης αυτού του παθογόνου είναι πρωταρχικής σημασίας τόσο για τη βιομηχανία τροφίμων όσο και για την κοινωνία γενικότερα. Η παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης εναιωρημάτων υγρών καπνών έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Η επίδραση του κάθε καπνού ήταν διαφορετική ανάλογα με το είδος του καπνού που χρησιμοποιήθηκε και τον αρχικό πληθυσμό του παθογόνου (με τον οποίο πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός). Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική συγκέντρωση σε καρβονύλια και φαινολικές ουσίες. Είναι γνωστό ότι οι φαινόλες μπορούν να βλάψουν τη βακτηριακή μεμβράνη ενώ οι καρβονυλικές ενώσεις μπορούν να διεισδύσουν στο κυτταρικό τοίχωμα και να αδρανοποιήσουν τα ένζυμα του κυτταροπλάσματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Lingbeck et., 2014). Σύμφωνα με μελέτες (Huss et al., 2000) που έχουν γίνει δείχνουν ότι ο υγρός καπνός έδειξε ανασταλτικά αποτελέσματα έναντι των τροφιμογενών παθογόνων όπως το *L. monocytogenes* κ.α. σε προϊόντα RTE.

Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα προπτυχιακή εργασία εξετάστηκαν οι καπνοί L9, G6, C3, D4, A1, E5 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας με πιο αποτελεσματικούς, τον L9 σε συγκέντρωση 0,15% v/v και τον C3 σε συγκέντρωση 1%

v/v καθώς δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού. Όσον αφορά τον καπνό L9 αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι στη συγκέντρωση 10^7 μέσο χρόνο προσαρμογής 31.57 h, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $1,42 \text{ h}^{-1}$ ενώ για 10^5 cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν περίπου κατά 9 h μεγαλύτερος, (40,83 h), με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης να εμφανίζεται ελαφρώς μικρότερος ($1,15 \text{ h}^{-1}$). Όπως είναι εμφανές από τα αποτελέσματα αυτό που βλέπουμε είναι ότι χρειάστηκε περισσότερος χρόνος προσαρμογής αλλά ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε, δηλαδή ο συγκεκριμένος καπνός ενήργησε αποτελεσματικότερα αφού στην συνέχεια δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη. Οι υπόλοιποι καπνοί δεν εμφάνισαν κάποια ιδιαίτερη επιρροή εκτός από τον D4 σε συγκέντρωση 0,75 % v/v όπου εμφάνισε μία μικρή επίδραση καθώς παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τους Milly et al. (2005), οι δύο αποτελεσματικότεροι υγροί καπνοί, έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes*, ήταν οι L9 και G6, οι οποίοι είχαν με διαφορά την υψηλότερη συγκέντρωση καρβονυλίων. Αυτή η αντίθεση των αποτελεσμάτων ωστόσο, είναι γνωστό φαινόμενο καθώς ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αντιμικροβιακή δράση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών, έναντι του *L. monocytogenes* και άλλων παθογόνων βακτηρίων οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις (Vitt et al., 2001; Paranjpye et al., 2005; Gedela et al., 2007; Kim et al., 2012; Van Loo et al., 2012), ενώ οι υπόλοιποι αναφέρουν ότι οι καρβονυλικές ενώσεις είναι αυτές που προσδίδουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες (Milly et al., 2005; Montazeri et al., 2013). Πράγματι, ο καπνός L9 περιέχει περίπου 350 g/l καρβονύλια και 1 g/l φαινόλες, ενώ το G6 είναι ένα πραγματικό συμπυκνωμένο καπνού με υψηλή περιεκτικότητα σε καρβονύλιο (160 g/l) και επίσης χαμηλότερες ενώσεις φαινόλης (0,0 – 2,0 g/l).

Συνοψίζοντας, εξαιτίας της άμεσης μόλυνσης του εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων καθώς και των τροφίμων με *L. monocytogenes*, η χρήση υγρών καπνών με σκοπό την καταστολή των παθογόνων μικροοργανισμών, που οδηγούν μέχρι και στο θάνατο, θεωρείται αναγκαία. Με το τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η υγεία του καταναλωτή και η υγειονομική ασφάλεια των προϊόντων. Έτσι, από τα αποτελέσματα του πειράματος συμπεραίνουμε, ότι ο καπνός L9 σε συγκέντρωση 0,15% v/v και ο καπνός C3 σε συγκέντρωση 1% δείχνει να εμφανίζει εκείνα τα χαρακτηριστικά που χρειάζονται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα του πειράματος της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας οι πιο δραστικοί καπνοί έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* είναι ο καπνός L9 σε συγκέντρωση 0,15% (v/v) και συγκεκριμένα στο πληθυσμό 10^3 cfu/ml καθώς δεν υπήρξε καθόλου ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς και ο καπνός C3 σε συγκέντρωση 1% (v/v) και συγκεκριμένα στο πληθυσμό 10^3 cfu/ml καθώς δεν υπήρξε ούτε σε αυτόν ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού.

Τα αποτελέσματα του πειράματος μας δίνουν μία σημαντική πληροφορία η οποία αναφέρεται στους καπνούς L9 και C3 σε πληθυσμό 10^3 cfu/ml αφού χάρη σε αυτούς τους καπνούς δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών σε αλιεύματα στην πραγματική ζωή. Στους υπόλοιπους καπνούς που εξετάστηκαν δεν υπάρχει κάποιο άξιο σημείο αναφοράς διότι δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes*.

Τα συμπεράσματα των αποτελεσμάτων στην παρούσα πτυχιακή εργασία 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. A. Morey et al. Effect of liquid smoke as an ingredient in frankfurters on *Listeria monocytogenes* and quality attributes (2012)
2. A.K. Pradhan et al. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in selected categories of deli meats: Impact of lactate and diacetate on listeriosis cases and deaths (2009)
3. A.K. Pradhan et al. Quantitative risk assessment of listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail (2010)
4. 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, pp. 87-121.
5. Belichovska K., Belichovska D., Pejkovski Z., (2019), Smoke and smoked fish production, *Scientific Journal "Meat Technology"*, 60(1), pp. 37-43.
6. C. Meyer et al. Occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat poultry products available on the German market (2012)
7. C.B. Lewus et al. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (1991)
8. D.E. Gombas et al. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (2003)
9. E.M. Balciunas et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review *Food Control* (2013)
10. Ekonomou S. I., Bulut S., Karatzas K. A. G. and Boziaris I. S., (2020), Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw and hot smoked trout fillets by high hydrostatic pressure processing combined with liquid smoke and freezing, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102427.
11. F. Devlieghere et al. New preservation technologies: Possibilities and limitations *International Dairy Journal* (2004)
12. F. Pérez-Rodríguez et al. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: A review (2008)
13. Fasano E., Yebra-Pimentel I., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., (2016), Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods, *Food Control*, 59, pp. 581-590.
14. Gedela, Saritha. Oklahoma State University ProQuest Dissertations Publishing, 2005. 1431642.
15. Gram L., (2001), Potential hazards in cold-smoked fish: *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*.
16. Gray M. L., Killinger A. H., (1966), *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol*, 30, pp. 309-382.
17. Harbell S., (1988), Controlling seafood spoilage.
18. Huis Int Veit J.H.J., (1996), Microbial and biochemical spoilage of food, *International Journal of Food Microbiology*.
19. *International Dairy Journal* (2006)
20. J.M. Lingbeck et al. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation (2014)
21. J.M. Lingbeck et al. Temperature effects on the antimicrobial efficacy of condensed smoke and lauric arginate against *Listeria* and *Salmonella* (2014)

22. L.H. Deegan et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension
23. M. Modzelewska-Kapitula et al. The microbial safety of ready-to-eat raw and cooked sausages in Poland: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. Occurrence (2014)
24. McClain, D. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, USDA-FSIS, 322ARC, Beltsville, MD.
25. Montazeri N., Himelbloom B. H., Oliveira A. C., Leigh M. B., Crapo C. A., (2013), Refined liquid smoke: a potential antilisterial additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of food protection*, 76(5), pp. 812-819.
26. N. Chaitiemwong et al. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces (2014)
27. N.A. Lavieri et al. Investigating the control of *Listeria monocytogenes* on alternatively-cured frankfurters using natural antimicrobials ingredients or post-lethality interventions (2014)
28. Ralovich B., (1983), What is the role of food-stuff in transportation of *Listeria*. In I. Kiss, T. Deak, and K. Incze (eds.), *Microbial Associations and Interactions in Foods*, Reidel Publishing Co., Budapest.
29. Ralovich, B. 1983. What is the role of food-stuff in transportation of *Listeria*. In I. Kiss, T. Deak, and K. Incze (eds.), *Microbial Associations and Interactions in Foods*. Reidel Publishing Co., Budapest.
30. Rodriguez, L. D., G. S. Fernandez, J. Fernandez, F. Garayzabal, and E. R. Ferri. 1983. New methodology for the isolations of *Listeria* microorganism from heavily contaminated environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1188-1190.
31. Ryser, E. T., and E. H. Marth. 1987. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J. Food Prot.* 50:7-13.
32. S. Gedela et al. Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters (2007)
33. Schlech III, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* 308:203-206.
34. Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi. A. C. Allen. E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E.S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* 308:203-206.
35. Seeliger, H. P. R., and D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383. pp. 1235-1245. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
36. Silliker, J. H. 1986. New bacteria in the news. *Food Technol.* 40:16- 26.
37. Suñen E., Fernandez-Galian B., Aristimuño C., (2001), Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature, *Food microbiology*, 18(4), pp. 387-389
38. T.M. Osaili et al. Prevalence of *Salmonella* serovars, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in mediterranean ready-to-eat meat products in Jordan (2014)

39. Theobald A., Arcella D., Carere A., Croera C., Engel K. H., Gott D., Simon R., (2012), Safety assessment of smoke flavouring primary products by the European Food Safety Authority. *Trends in food science & technology*, 27(2), pp. 97-108.
40. Toledo R. T., (2008), Wood smoke components and functional properties, *International Smoked Seafood Conference Proceedings 55 Alaska Sea Grant College Program*.
41. United States Public Health Service, Centers for Disease Control, 1985. Listeriosis outbreak associated with Mexican style cheese. *California Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 34:357-359
42. V. Ferreira et al. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health *Journal of Food Protection* (2014)
43. V. Garrido et al. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain (2009)
44. Van Loo E. J., Babu D., Crandall P. G., Ricke S. C., (2012), Screening of commercial and pecan shell–extracted liquid smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens, *Journal of food protection*, 75(6), pp. 1148-1152.
45. Watkins, J., and K. P. Sleath. 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* 50:1-9.

Ελληνική Βιβλιογραφία

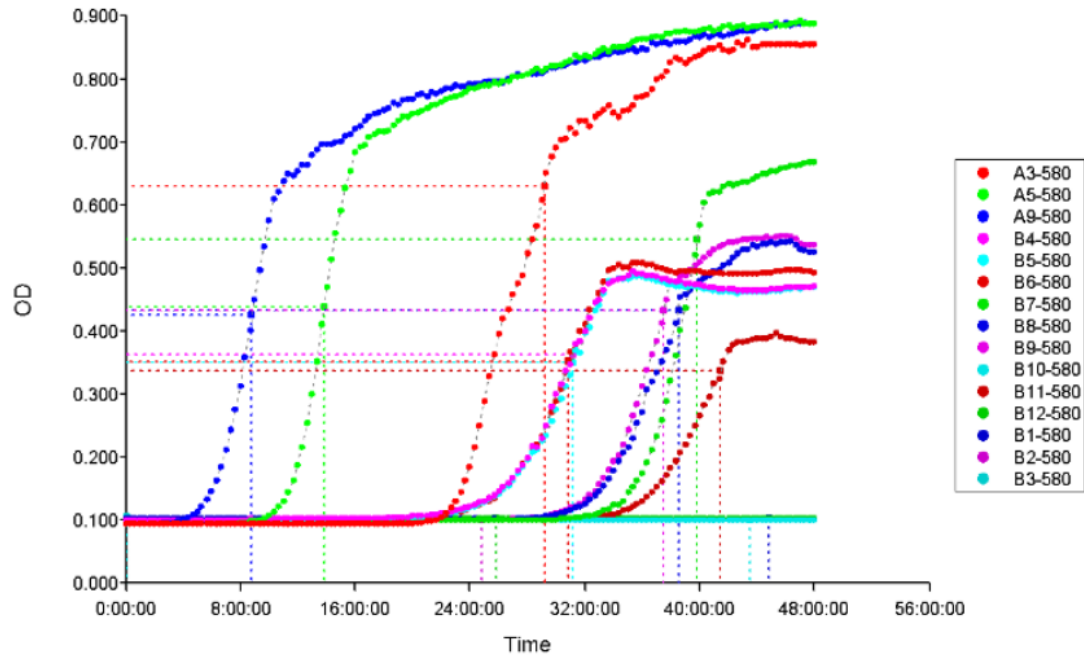
1. Καλλίγαρος Π., (2004), Η ιστορία της Ελληνικής αλιείας κατά την τελευταία δεκαετία του 20ου αιώνα, *Διπλωματική Εργασία για το Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών*.
2. Μπλούκας Ι., (2004), *Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλη, ΑΕ Αθήνα 2004.
3. Μποζιάρης Ι., (2012), *Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων*, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2η Έκδοση.
4. Μποζιάρης Ι., (2013), *Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων*, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 3η Έκδοση.
5. Παρλαπάνη Φ., (2013), *Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα*, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ABSTRACT

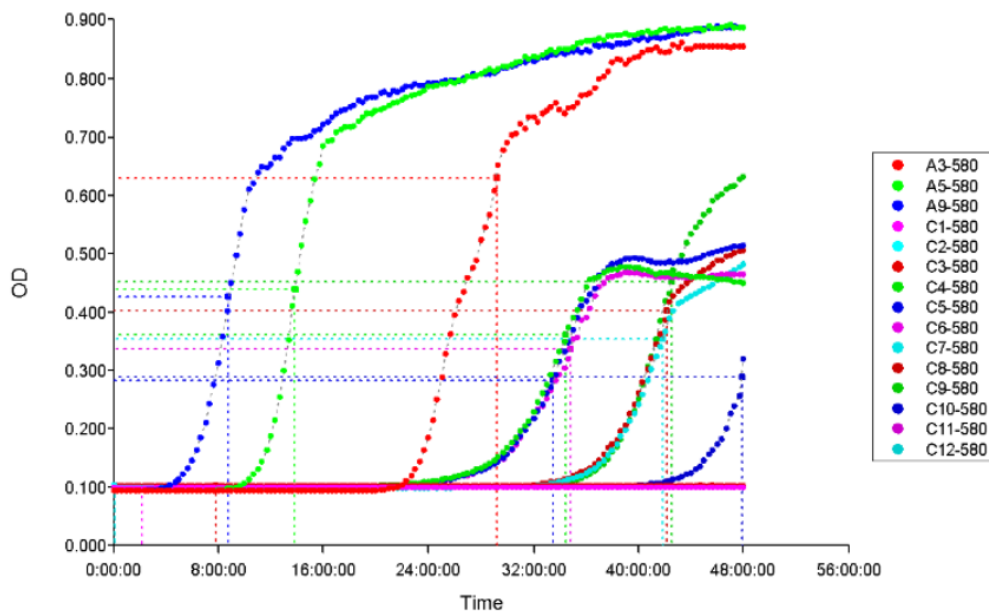
In the present undergraduate dissertation, the effect of liquid smoke suspensions against the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* strain Scott A, was investigated. The absorption or optical density at 600 nm (OD) method was used to study a total of six (6) kinds of smoke (L9, G6, C3, D4, A1, and E5) which are used in the food industry-production of smoked fishery products. Each smoke was studied in three (3) different increasing concentrations for the initial microbial populations 10^3 , 10^5 and 10^7 CFU/ml. After filling the Microplates under aseptic conditions, they were placed in the Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader for a period of forty-eight (48) hours. The results of the samples showed that L9 smoke at a concentration of 0.15%, as well as the C3 smoke at concentration of 1% had a total effect against the pathogenic microorganism in the initial microbial population of 10^3 CFU/ml, since no growth of the organism was observed. Taking into account the results of the present study, L9 and C3 smokes could be characterized as a capable "obstacle" of this pathogenic bacterium.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, antimicrobial action, liquid smoke, optical density

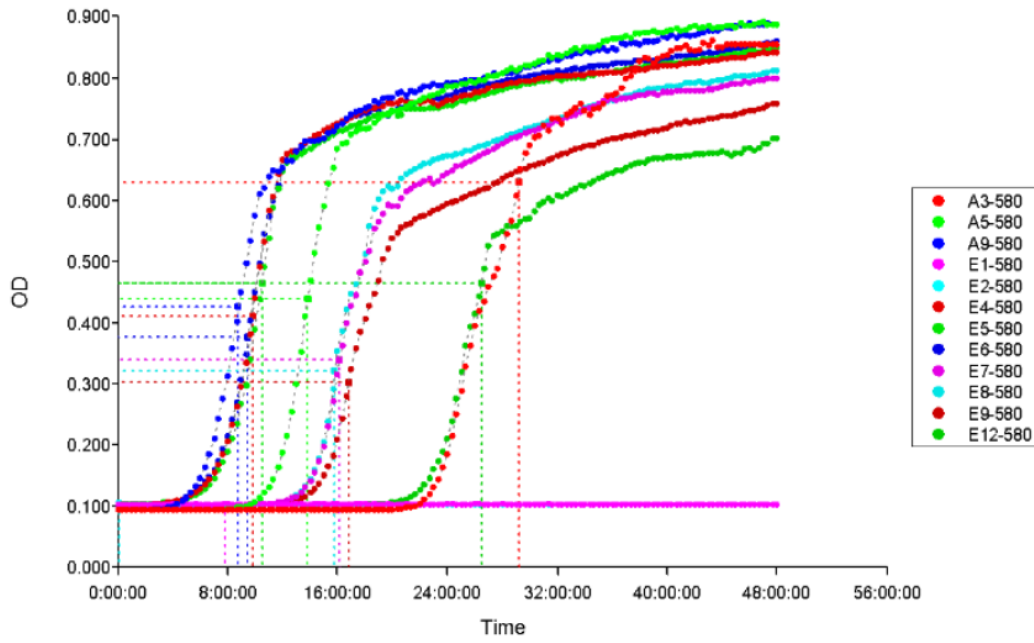
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



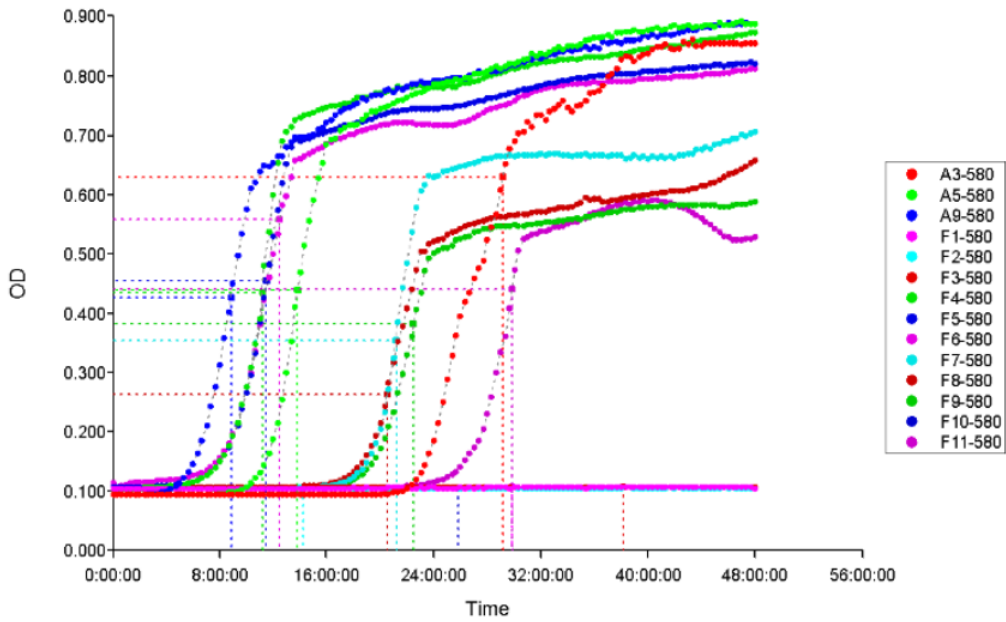
Εικόνα 8.1. L9 0,05 %



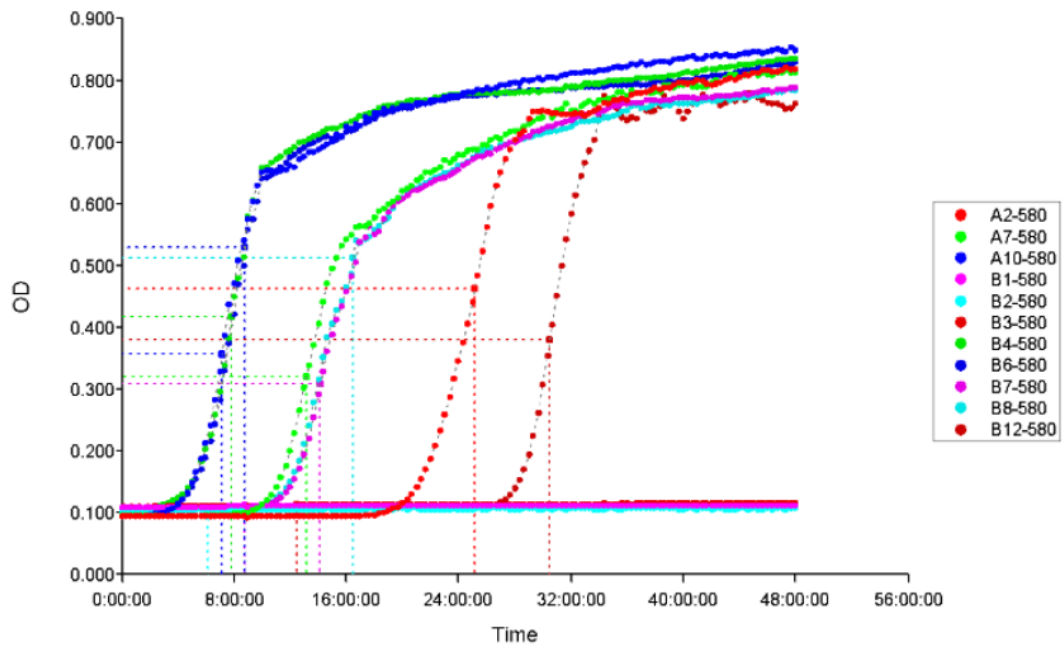
Εικόνα 8.2. L9 0,1%



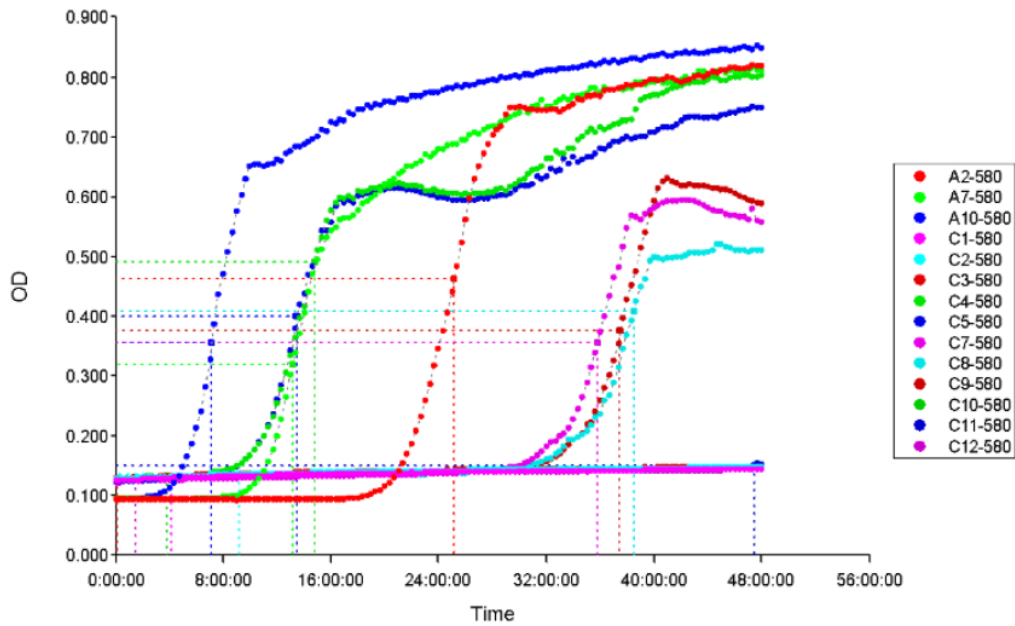
Εικόνα 8.3. G6 0,1%



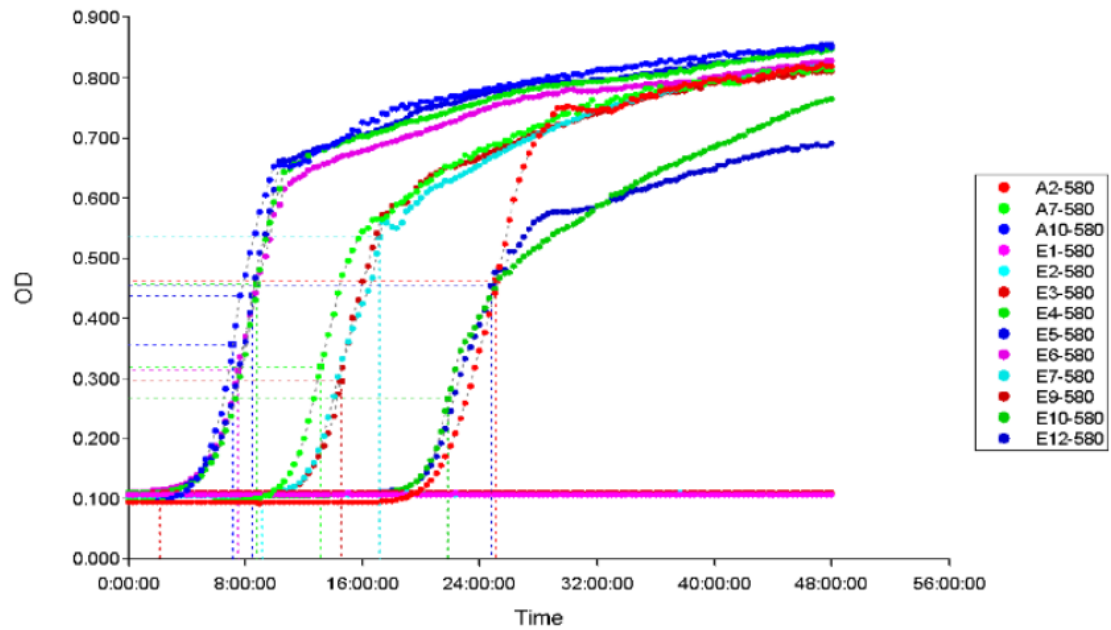
Εικόνα 8.4. G6 0,2%



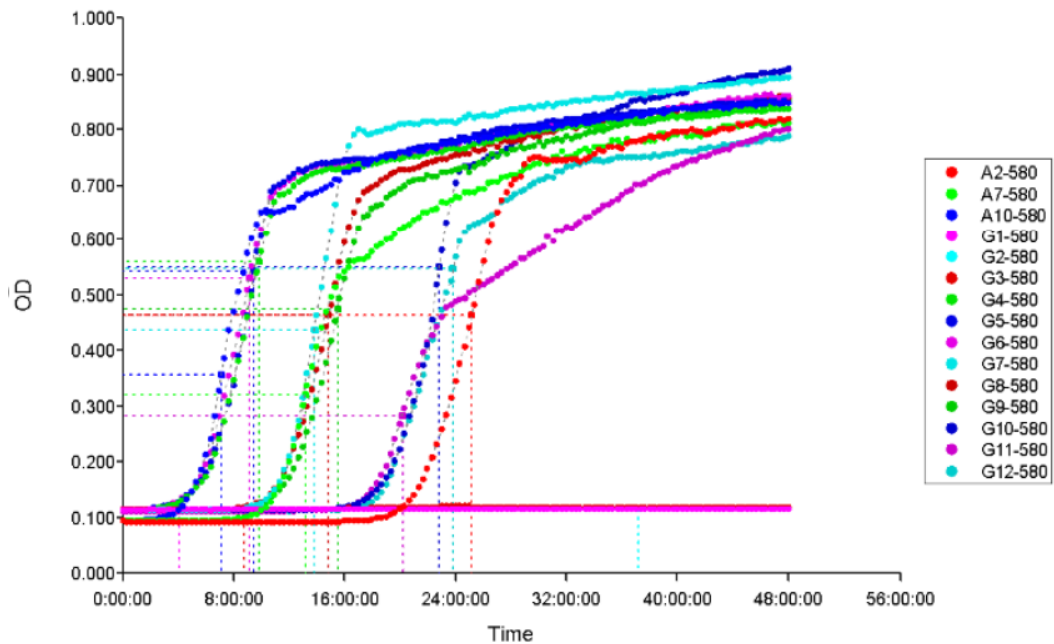
Εικόνα 8.5. C3 0,5%



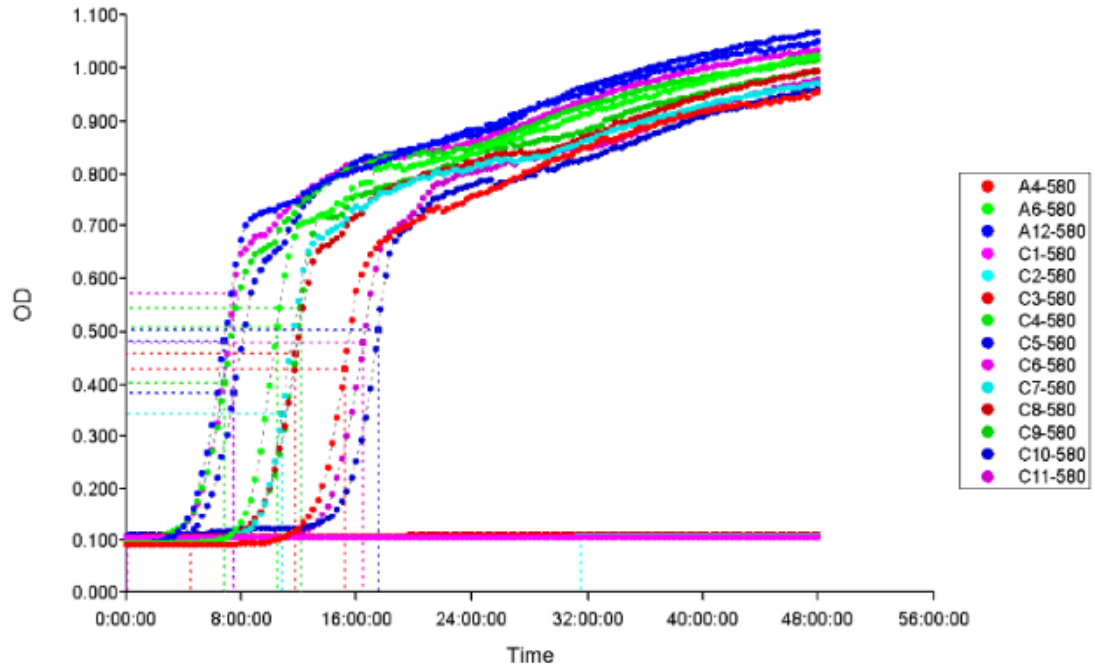
Εικόνα 8.6. C3 0,75%



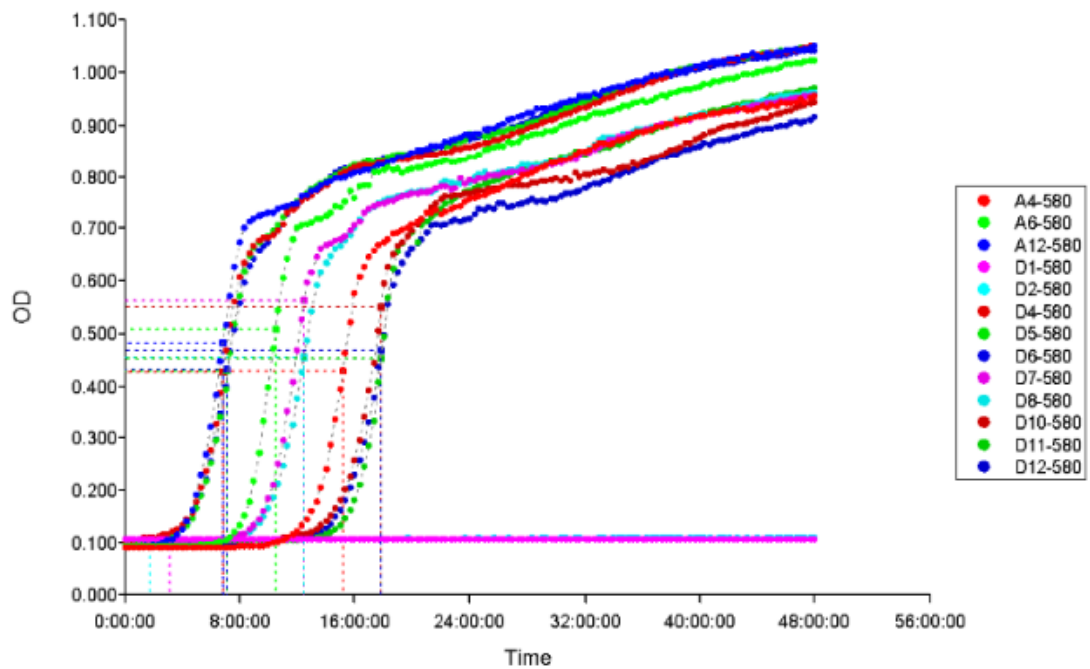
Εικόνα 8.7. D4 0,5%



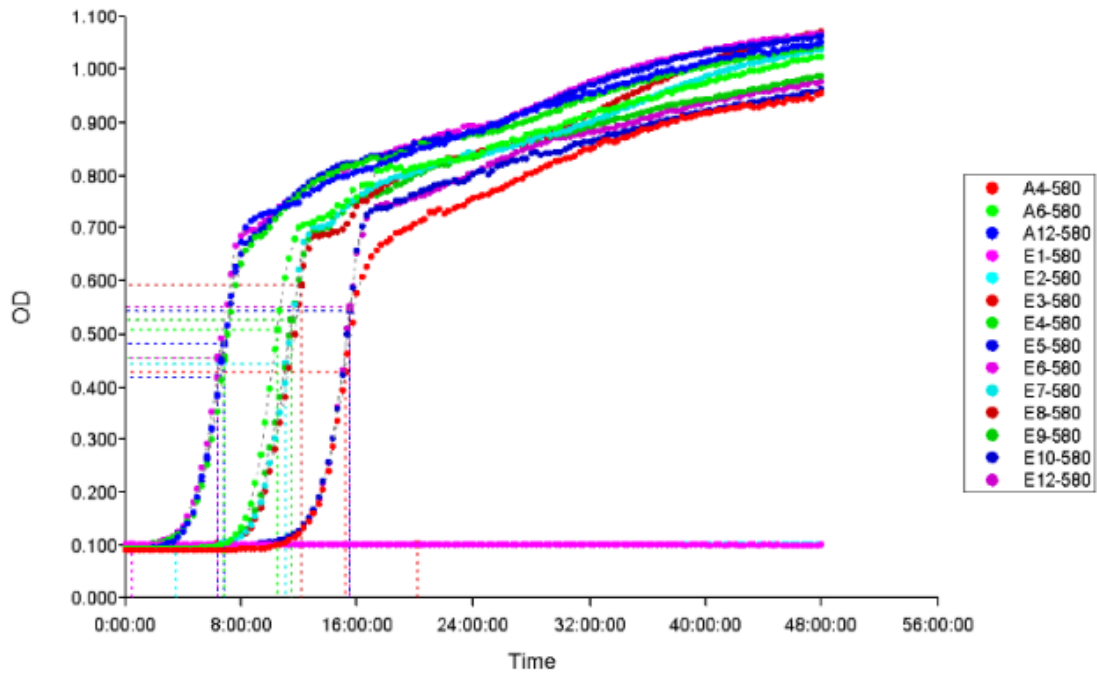
Εικόνα 8.8. D4 1%



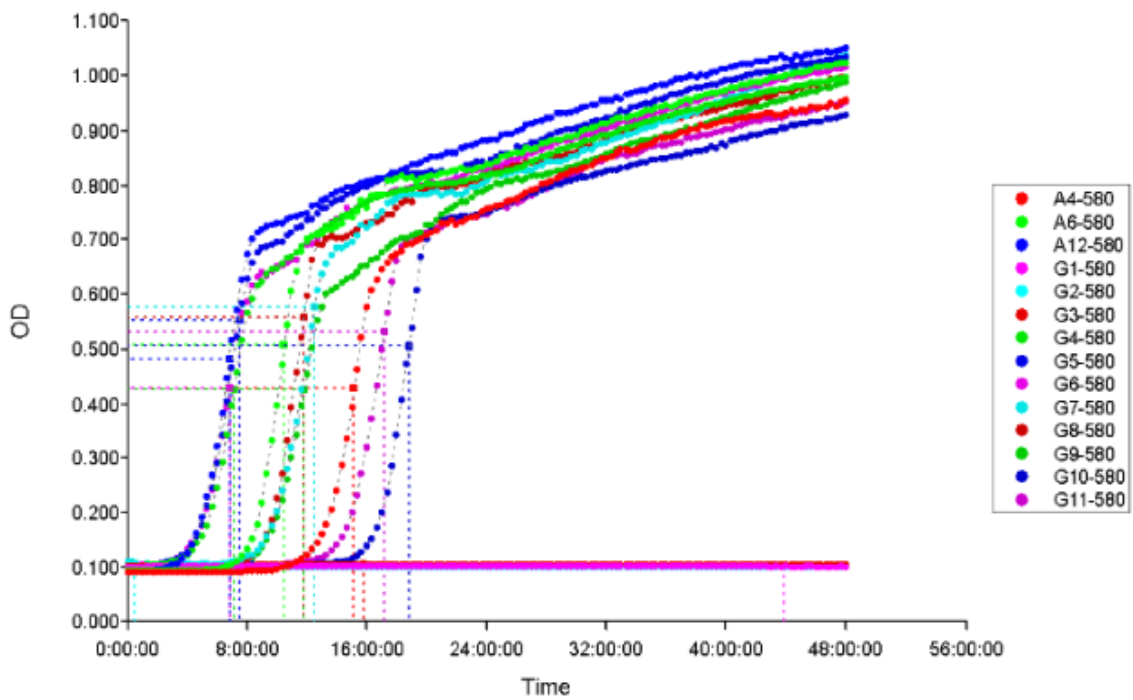
Εικόνα 8.9. Al 0,8%



Εικόνα 8.10. Al 1%



Εικόνα 8.11. E5 0,6%



Εικόνα 8.12. E5 1,2%