



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην παρεμπόδιση της
αύξησης του *Listeria monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα »

Κωστάμη Νικολέτα – Ευαγγελία

ΒΟΛΟΣ 2024

«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην παρεμπόδιση της αύξησης του
Listeria monocytogenes σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα »

«Effect of liquid smoke suspensions on growth inhibition of *Listeria monocytogenes*
in broth»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Επιβλέπων, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας
2. Γκολομάζου Ελένη, Μέλος, Αναπλ. Καθηγήτρια Παν/μίου Θεσσαλίας
3. Φωτεινή Παρλαπάνη, Μέλος, Επικ. Καθηγήτρια, Παν/μίου Θεσσαλίας

*Στην οικογένεια μου,
Βασιλική, Χρήστο, Αποστόλη, Στέφανο και Μιχάλη
που παρέμειναν συνεχώς στο πλευρό μου και με στήριξαν σε όλη τη
διάρκεια των σπουδών μου.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με μεγάλη χαρά, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, η οποία προήλθε από επίμονη προσπάθεια και αναζήτηση. Δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς την καθοδήγηση και την εξαιρετική συνεργασία με την ομάδα του Εργαστηρίου Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων & Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ιδιαίτερη αναγνώριση οφείλω στον Διευθυντή του Εργαστηρίου και Επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Μποζιάρη Ιωάννη, ο οποίος ήταν πάντα διαθέσιμος και υποστηρικτικός καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κα Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή, η οποία με καθοδήγησε και με στήριξε πρακτικά και ψυχολογικά από την αρχή έως το τέλος. Ο ενθουσιασμός και η αφοσίωσή της με ενέπνευσαν να συνεχίσω.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως την υποψήφια διδάκτορα κα. Συροπούλου Φαίδρα για τη σημαντική και άμεση βοήθεια στο πειραματικό κομμάτι, η οποία υπήρξε καθοριστική και ανεκτίμητη. Το αποτέλεσμα αυτής της εργασίας ανήκει σε όλες μας τις κοινές προσπάθειες.

Περιεχόμενα

Περιεχόμεναεικόνων	7
Περιεχόμενα πινάκων	7
Περίληψη.....	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Επεξεργασία τροφίμων-αλιευμάτων	10
1.1.1 Αλλοίωση αλιευμάτων.....	10
1.1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων	11
1.2 Κάπνιση τροφίμων	12
1.2.1 Παραδοσιακές και συμβατικές χρήσεις.....	12
1.2.2 Πλεονεκτήματα και οφέλη	14
1.2.3 Υγρή κάπνιση.....	15
1.2.4 Αντιμικροβιακές ιδιότητες του καπνού	16
1.3. <i>Listeria</i> Γένος και Ταξινόμηση.....	18
1.3.1 <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα	20
1.3.2 Η <i>Listeria</i> στο περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας τροφίμων	21
1.3.3 Παθογόνος <i>Listeriamonocytogenes</i> και ασθένεια	22
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	24
2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	24
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.	24
2.3 Καπνοί	25
2.4 Αναζωογόνηση στελέχους <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.5 Πλήρωση μικροπλάκων.....	26
2.6 Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader.....	27
3. Αποτελέσματα	28
3.1 Αποτελέσματα πρώτης (1ης) μικροπλάκας.	28
3.2 Αποτελέσματα δεύτερης (2ης) μικροπλάκας.....	31
3.3 Αποτελέσματα τρίτης (3ης) μικροπλάκας	34
4. Συζήτηση	39
5. Συμπεράσματα.....	41
6. Βιβλιογραφία	42
ABSTRACT	45
Παράρτημα.....	47

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1:: Επίδραση του καπνού L9 συγκέντρωσης 0,1% 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.	30
Εικόνα 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.	31
Εικόνα 3: 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.	33
Εικόνα 4:Επίδραση του καπνού D4 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.	34
Εικόνα 5: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.	36
Εικόνα 6: Επίδραση του καπνού E5 συγκέντρωσης 1,2% 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.	37

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Τυπική σύνθεση εμπορικών υγρών συμπυκνωμάτων καπνού (προσαρμοσμένο από Maga, 2018).	16
---	----

Πίνακας 2: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της <i>Listeria monocytogenes</i> σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.....	29
Πίνακας 3: Σύνοψη 2ης μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της <i>Listeria monocytogenes</i> σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους.....	32
Πίνακας 4: Σύνοψη 3ης μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της <i>Listeria monocytogenes</i> σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.....	35

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή διπλωματική εργασία διερεύνησε την επίδραση και την αποτελεσματικότητα που έχουν τα υγρά εναιωρήματα καπνών έναντι στο παθογόνο στέλεχος *Listeria monocytogenes* Pirie NCTC 10527. Η διερεύνηση έγινε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της απορροφητικότητας ή οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD), ενώ συνολικά έγινε μελέτη έξι (6) συνολικά καπνών (L9, G6, C3, D4, A1, και E5). Η βιομηχανία τροφίμων και ειδικότερα η βιομηχανία που ασχολείται με την παραγωγή καπνιστών αλιευτικών προϊόντων κάνει ευρεία χρήση των συγκεκριμένων καπνών. Όλοι οι καπνοί μελετήθηκαν εντός υγρού θεραπευτικού υποστρώματος εντός τριών (3) διαφορετικών συγκεντρώσεων και έναντι σε 3 διαφορετικούς αρχικούς μικροβιακούς πληθυσμούς της τάξεως των 10^3 , 10^5 , και 10^7 CFU/ml. Έπειτα από την πλήρωση των μικροπλακών υπό ασηπτικές συνθήκες, έγινε τοποθέτησή τους στο Synergy HTX Multi-Model Microplate Reader για το χρονικό διάστημα σαράντα οκτώ (48) ωρών σε θερμοκρασία 37°C. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα έδειξαν ότι ο καπνός D4 σε συγκέντρωση 1 %v/νείχε την πιο ικανοποιητική δράση στην μείωση του ρυθμού αύξησης στον πληθυσμό 10^3 cfu/ml. Με βάση τα αποτελέσματα από αυτήν την διπλωματική εργασία καταλήγουμε στο ότι ο καπνός D4 θα ήταν δυνατό να χαρακτηριστεί ικανό εμπόδιο ενάντια στο παθογόνο αυτό βακτήριο.

Λέξεις-Κλειδιά: κάπνιση, υγρός καπνός, *Listeria monocytogenes*, οπτική πυκνότητα.

1. Εισαγωγή

1.1 Επεξεργασία τροφίμων-αλιευμάτων

Η *Listeria monocytogenes* είναι πανταχού παρούσα στο περιβάλλον και επομένως ανιχνεύεται εύκολα τόσο σε προϊόντα αλιείας όσο και σε γαλακτοκομικά, κρέατα και γενικά προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, όπου είναι γνωστό ότι η επιμόλυνση και αύξηση εμφανίζεται συχνότερα κατά την επεξεργασία, συσκευασία και διανομή στα προϊόντα (Johnson et al., 1989).

Η επεξεργασία είναι μια σειρά διαδικασιών κατά τις οποίες τα τρόφιμα μεταποιούνται μετά την πρωτογενή παραγωγή και σε ορισμένες περιπτώσεις συνδυάζονται με άλλα συστατικά για την παραγωγή προϊόντων για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση καθώς και πρώτων υλών για την παραγωγή άλλων προϊόντων. Επεξεργασμένα προϊόντα όπως καπνιστά ψάρια και προϊόντα ψαριών. Τα προϊόντα αυτά είναι επεξεργασμένα και μπορούν να αποθηκευτούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τα φρέσκα προϊόντα. Οι μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης των υδρόβιων προϊόντων περιλαμβάνουν την ψύξη, την κατάψυξη, τη συσκευασία υπό κενό, το αλάτισμα, τη θερμική επεξεργασία, την οξύνιση-μαρινάρισμα και το κάπνισμα (Μποζιάρης, 2013).

1.1.1 Αλλοίωση αλιευμάτων

Γενικότερα, η αλλοίωση των τροφίμων σημαίνει μείωση της ποιότητας κυρίως ως προς τις αισθητηριακές (οργανοληπτικές) τους ιδιότητες. Ένα προϊόν θεωρείται χαλασμένο (αλλοιωμένο) όταν υφίσταται κάποιες αλλαγές που το καθιστούν ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (Bloukas, 2004). Υπολογίζεται ότι περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής χάνεται λόγω μικροβιακής αλλοίωσης. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η μικροβιακή αλλοίωση προκαλείται κυρίως από βακτήρια και μύκητες φυκιών (Huisint Velt et al., 1996). Ένζυμα, αφυδάτωση, οξείδωση, μόλυνση και φυσική βλάβη μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση του αλιεύματος (Harbell, 1988). Η κύρια αδυναμία των θαλασσινών που συμβάλλει στη μειωμένη ποιότητά τους

φαίνεται να είναι οι πρωτεΐνες και λίπη που περιέχουν, ιδιαίτερα τα ελεύθερα αμινοξέα (μη πρωτεϊνικό άζωτο) καθώς και το σχετικά υψηλό pH τους. Ως εκ τούτου, οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στο κρέας του ψαριού αμέσως μετά το θάνατο του ψαριού, προκαλώντας το μεταβολισμό των πολυσακχαριτών, αμινοξέων, των λιπών και άλλων μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο κρέας του ψαριού (Liston 1980).

Οι ρυθμοί μικροβιακής και αυτολυτικής αποικοδόμησης φαίνεται να ποικίλλουν ανάλογα με τη μέθοδο σύλληψης και θανάτωσης και ιδιαίτερα τις θερμοκρασίες επεξεργασίας και αποθήκευσης του προϊόντος. Μερικές μελέτες έχουν τονίσει ότι η αιτία της αλλοίωσης των ψαριών δεν εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών σε αυτό, αλλά από ένα μικρό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας του, δηλαδή «ειδικούς ετερόλογους μικροοργανισμούς» (Dalgaard 2003, Dalgaard, 1995).

1.1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Σύμφωνα με τους Moon Dutta et al. (2018) Οι πιο σημαντικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται συνήθως σε προϊόντα καπνιστών ψαριών είναι η *Listeria monocytogenes*, το *Clostridium botulinum type E* και η *Salmonella*.

Αν και το γένος *Listeria* περιλαμβάνει δέκα (10) είδη, οι ανθρώπινες περιπτώσεις λιστερίωσης προκαλούνται σχεδόν αποκλειστικά από το είδος *L. monocytogenes* (EFSA, 2013). Η *Listeria monocytogenes* είναι ένας αερόβιος και προαιρετικός αναερόβιος μικροοργανισμός, που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί τόσο με όσο και χωρίς οξυγόνο (Jorgensen & Huss, 1998). Είναι ένα Gram-θετικό βακτήριο που μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από +1 έως +45°C, ενώ +30 έως +37°C έχει παρατηρηθεί ως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του.

Έχει επίσης την ικανότητα να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες όπως χαμηλό pH ή υψηλή αλατότητα (Economou et al 2013). Αν και δεν θεωρείται θαλάσσιος μικροοργανισμός, μπορεί να απομονωθεί από το θαλασσινό νερό, πιθανώς λόγω της χειρσαίας απορροής (Ben Embarek 1994). Επομένως, είναι πιθανό να βρίσκεται και σε

περιοχές επεξεργασίας ψαριών (Gram 2001). Τα καπνιστά ψάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη λιστερίωση, ειδικά εάν καπνίζονται σε συνθήκες ψυγείου (Ericsson et al. 1997).

1.2 Κάπνιση τροφίμων

Η τυχαία έκθεση στον καπνό από την πυρόλυση του ξύλου(ων) έχει βοηθήσει τους ανθρώπους στη διατήρηση των κρεάτων, των ψαριών και των δερμάτων για περισσότερα από 1.000 χρόνια. Στην πραγματικότητα, τεχνουργήματα από δέρμα μαυρισμένο με καπνό βρέθηκαν κοντά στο Ίνσμπρουκ της Αυστρίας τον Σεπτέμβριο του 1991. Τα τεχνουργήματα από δέρμα συνόδευσαν το 5300 ετών σώμα του ύποπτου «IceMan». Τα τεχνουργήματα πιστεύεται ότι έχουν μαυριστεί από την έκθεσή τους σε ανοιχτές φωτιές από ξύλα που χρησιμοποιούνται για το μαγείρεμα των τροφίμων (Spindler, 1994).

Οι πρωτόγονες μέθοδοι προετοιμασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την επέκταση της ευπαθούς φύσης τροφίμων όπως το κρέας και τα ψάρια περιελάμβαναν το αλάτισμα, το στέγνωμα και την κάπνιση (Barylco-Pikielna, 1977). Οι μηχανισμοί συντήρησης που σχετίζονται με τέτοιες μεθόδους πρέπει να είχαν μια βαθιά επίδραση στον τρόπο με τον οποίο ο άνθρωπος άρχισε να αναπτύσσει τρόπους προετοιμασίας μεγάλων ποσοτήτων τροφής για μελλοντική κατανάλωση. Αυτοί οι διαχρονικοί μηχανισμοί έχουν μεταφερθεί και στις σύγχρονες μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων.

1.2.1 Παραδοσιακές και συμβατικές χρήσεις

Οι παραδοσιακές μέθοδοι καπνίσματος τροφίμων περιλαμβάνουν αρκετά απλό εξοπλισμό που βασίζεται σε εύκολα αποκτήσιμες αισθητηριακές ιδιότητες. Ο παραδοσιακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την κάπνιση των τροφίμων συνήθως αποτελούνταν από έναν καπνιστή όπου προκλήθηκε πυρόλυση του ξύλου. Ο καπνιστής φορτώθηκε με ξύλα που κάηκαν και ο καπνός που προέκυψε διοχετεύτηκε προς μια κατεύθυνση ώστε να επιτευχθεί άμεση επαφή με το φαγητό. Αυτοί οι παραδοσιακοί στόχοι του καπνίσματος των τροφίμων ήταν να προσδώσουν και να

αναπτύξουν επιθυμητές αισθητηριακές ιδιότητες (γεύση, άρωμα και εμφάνιση) καθώς και να καταστήσουν το τρόφιμο ασφαλές για κατανάλωση (Fessmann, 1995).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι προσχηματίζονται είτε με τεχνικές ζεστού είτε κρύου καπνίσματος. Η ζεστή κάπνιση εκτελείται σε θερμοκρασίες από 55 έως 80°C και ανάλογα με το μέγεθος και τον τύπο του κρέατος, απαιτείται πολύ μικρότερος χρόνος έκθεσης στον καπνό για να αποκτήσει περιζήτητη γεύση και άρωμα. Η ζεστή κάπνιση αφήνει επίσης το προϊόν διατροφής σε κατάσταση μαγειρέματος λόγω της θερμοκρασίας του καπνού. Η κρύα κάπνιση εκτελείται σε θερμοκρασίες από 15 έως 25°C και ανάλογα με το μέγεθος και τον τύπο του κρέατος, απαιτείται πολύ μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης στον καπνό για να αποκτήσει την επιθυμητή γεύση και άρωμα (Suñen, et al., 2003).

Σε αντίθεση με την ζεστή κάπνιση, η οποία μπορεί να πάρει μόνο ώρες για να ψηθεί σωστά κάτι, η κρύα κάπνιση απαιτεί εκτεταμένο χρόνο έκθεσης, και ακόμη και τότε το προϊόν θα πρέπει να θεωρείται ότι δεν έχει ψηθεί σωστά. Οι διαφορές στις μεθόδους ζεστού και κρύου καπνίσματος μπορεί να επηρεάζουν τις αισθητηριακές ιδιότητες ορισμένων τροφίμων και έχουν καταγραφεί καλά (Maga, 2018).

Τα συμβατικά μέσα καπνίσματος τροφίμων έχουν γίνει πιο τεχνολογικά προηγμένα τις τελευταίες δεκαετίες. Οι μέθοδοι για το κάπνισμα τροφίμων βασίζονται στις νέες εξελίξεις στην τεχνολογία παραγωγής καπνού και στα πλεονεκτήματα εφαρμογής. Το κρύο κάπνισμα που χρησιμοποιεί συμπυκνώματα καπνού έχει γίνει το σημαντικό μέσο για την εφαρμογή καπνού στα τρόφιμα (Fessmann, 1995; Suñen, et al., 2003). Η πρόσθετη τεχνολογία εφαρμογών επιτρέπει εναλλακτικά μέσα για το κάπνισμα, όπως καπνός, υγρός καπνός, καπνός τριβής, υγρός καπνός και θάλαμοι καπνού που μπορούν να φιλοξενήσουν συστήματα παρτίδας και (ημι) συνεχούς ροής σε συνδυασμό με ηλεκτρονικά χειριστήρια. Επίσης, τα νέα συστήματα παραγωγής καπνού έχουν εντολή να χρησιμοποιούν εξοπλισμό ή πλυντρίδες για να βοηθήσουν στον καθαρισμό του καπνού, γεγονός που ενισχύει την άποψη του για μια φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία επεξεργασίας (Fessmann, 1995).

1.2.2 Πλεονεκτήματα και οφέλη

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι νέες εξελίξεις στην τεχνολογία παραγωγής καπνού και τις εναλλακτικές λύσεις εφαρμογής έχουν αυξήσει τα θετικά οφέλη των τροφίμων με κρύα κάπνιση. Τα πλεονεκτήματα και τα οφέλη που σχετίζονται με την κάπνιση τροφίμων περιλαμβάνουν φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές εφαρμογής, αντιοξειδωτικό δυναμικό, οργανοληπτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα συμπυκνώματα καπνού χρησιμοποιούνται ευρέως σε σύγκριση με τον αέριο καπνό λόγω του καλύτερου ελέγχου της διαδικασίας του εμποτισμού, της εμφάνισης ή της αναγέννησης αερίου καπνού για να προσδώσουν σταθερά ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά γεύσης και χρώματος καπνού. Η χρήση συμπυκνωμάτων σε συσκευές εφαρμογής καπνού επιτρέπει στον επεξεργαστή να ελέγχει τη συγκέντρωση του καπνού που εφαρμόζεται πιο εύκολα από την παραγωγή αερίου καπνού επί τόπου (Suñenetal., 2003).

Η αντιοξειδωτική δράση των συμπυκνωμάτων καπνού έχει τεκμηριωθεί εκτενώς και τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη δυνατότητα επιβράδυνσης της οξείδωσης των λιπιδίων σε πολλά προϊόντα κρέατος (Estrada-Munozetal., 1998;Maga, 2018).

Ο έλεγχος των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του καπνού έχει επίσης διερευνηθεί και τεκμηριωθεί ευρέως. Στην πραγματικότητα, ένα ολόκληρο λεξικό νέας περιγραφικής γλώσσας έχει προταθεί για την περιγραφή και την αξιολόγηση των εμπορικών προφίλ γεύσης συμπυκνώματος καπνού (Ojeda, 2002).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των συμπυκνωμάτων καπνού προσθέτουν στα πλεονεκτήματα και τα οφέλη που συνδέονται με την κάπνιση των τροφίμων. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του καπνού στα τρόφιμα έχουν τεκμηριωθεί εκτενώς τα τελευταία πενήντα χρόνια, αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτής της εργασίας αφορούσε τα συστατικά του φυσικά εναποτιθέμενου καπνού (Estrada-Munoz, etal., 1998;Maga, 2018;Painter, 1998;Suñenetal., 2003). Για να προσθέσει αξία στον καπνό, η βιομηχανία έχει ξεκινήσει ένα πρόγραμμα κλασματοποίησης του καπνού και προσδιορισμού της διαφοράς στις λειτουργικές ιδιότητες (γεύση, χρώμα, αντιμικροβιακή δράση, διασύνδεση πρωτεΐνης) των διαφορετικών κλασμάτων καπνού.

1.2.3 Υγρή κάπνιση

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραγωγή καπνού που πρέπει να εφαρμοστούν στα τρόφιμα. Ορισμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μέθοδο smoldering, τριβής, υγρού καπνού ή συμπυκνώματος, ρευστοποίηση, τροποποιημένη ρευστοποίηση (δύο σταδίων), ενανθράκωση, ηλεκτροστατική κάπνιση και μερικές άλλες τεχνολογίες. Μία από αυτές τις διάφορες τεχνολογίες είναι γνωστή ως παραγωγή υγρού καπνού.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της χρήσης υγρού καπνού στην επεξεργασία τροφίμων περιλαμβάνουν: (1) η γεύση μπορεί να ενσωματωθεί ομοιόμορφα στο προϊόν και όχι μόνο στην επιφάνεια, (2) η ένταση της γεύσης μπορεί να αλλοιωθεί, (3) οι επεξεργαστές έχουν περισσότερο έλεγχο στην επιθυμητή γεύση προφίλ, (4) η κλασμάτωση μπορεί να γίνει πιο εύκολα και τα επιβλαβή συστατικά του συμπυκνώματος (PAH) μπορούν να αφαιρεθούν, (5) διαφοροποιημένη εφαρμογή σε προϊόντα που δεν καπνίζονται συνήθως (6) φιλικά προς τον καταναλωτή όσον αφορά την οικιακή χρήση, (7) φιλικά προς το περιβάλλον, (8) ευρείες επιλογές για να εφαρμοστεί ο καπνός όπως είναι η εμβάπτιση, ο ψεκασμός και η ολοκληρωμένη ανάμειξη (Maga, 2018).

Ο υγρός καπνός μπορεί να σχηματιστεί με τη διάλυση ενός συμπυκνώματος καπνού σε νερό, λάδι ή ορισμένους οργανικούς διαλύτες. Το συμπύκνωμα καπνού μπορεί επίσης να απορροφηθεί σε στερεά όπως μπαχαρικά, σάκχαρα και πρωτεΐνες για να δημιουργήσει ξηρές ή κονιοποιημένες μορφές. Τα συμπυκνώματα που διαλύονται στο νερό μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα πολυμερισμένα προϊόντα, προϊόντα πίσσας και καθίζηση PAH με την πάροδο του χρόνου, αλλάζει το χρώμα του διαλύματος καπνού σε ανοιχτό κίτρινο. Παρόλα αυτά, εάν υπάρχει κάποιος διαλύτης όπως είναι η γλυκόλη, η αιθανόλη, τα πολυμερισμένα προϊόντα, τα προϊόντα πίσσας και οι PAH δεν έχουν την δυνατότητα καθίζησης έξω από το διάλυμα. Ο Πίνακας 1 συνοψίζει τη σύνθεση των υγρών καπνών του εμπορίου.

Πίνακας 1: Τυπική σύνθεση εμπορικών υγρών συμπυκνωμάτων καπνού (προσαρμοσμένο από Maga, 2018).

SMOKE-RELATED PHENOLIC COMPOUNDS WITH PROVEN ANTIOXIDATIVE PROPERTIES
Pyrocatechol
Hydroquinone
Guaiacol
Eugenol
Isoeugenol
Vanillin
Salicylaldehyde
2-Hydroxybenzoic acid
4-Hydroxybenzoic acid

1.2.4 Αντιμικροβιακές ιδιότητες του καπνού

Αρκετές δημοσιεύσεις τεκμηριώνουν την αντιμικροβιακή δράση των συμπυκνωμάτων καπνού (Estrada-Munozetal., 1998; Maga, 2018; Painter, 1998; Suñenetal., 2003). Η έρευνα απέδειξε τη δυσκολία αναγνώρισης του μηχανισμού και των ενώσεων που ευθύνονται για τη μικροβιακή αναστολή (Maga, 2018). Διαφορετικά είδη οργανισμών συμπεριφέρονται διαφορετικά και μπορούν να εμφανίσουν σημάδια διαφορετικής ευαισθησίας σε διαφορετικά στελέχη του ίδιου οργανισμού όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία με συμπυκνώματα καπνού. Έτσι, η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής ικανότητας του υγρού καπνού πρέπει να αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικά είδη και στελέχη μικροοργανισμών. Επιπλέον, ορισμένες έρευνες δείχνουν ότι τα συμπυκνώματα καπνού δεν έχουν καθόλου αντιμικροβιακό δυναμικό (Davidson etal., 2012). Αυτό υποδηλώνει και πάλι ότι η σχετική αποτελεσματικότητα μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη σύνθεση των συμπυκνωμάτων καπνού. Άλλες έρευνες αποδεικνύουν ότι ο προσδιορισμός των συνεργατικών επιδράσεων μεταξύ των συμπυκνωμάτων καπνού μπορεί να είναι εξίσου δύσκολος. Επομένως, η αποτελεσματικότητα των συμπυκνωμάτων καπνού σε

σχέση με το αντιμικροβιακό δυναμικό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολών, των καρβονυλίων και των οργανικών οξέων και του εξεταζόμενου μικροοργανισμού.

Η ποσότητα των φαινολών που υπάρχουν στα εμπορικά υγρά συμπυκνώματα καπνού έχει αναφερθεί ότι είναι περίπου 0,2 έως 2,9 % (Maga, 2018). Οι φυσικές φαινόλες στα τρόφιμα ταξινομούνται ως απλές φαινόλες, φλαβονοειδή, υδροξυκινναμωμικό οξύ και παράγωγα και φαινολικά οξέα. Οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες διαταράσσονται από φαινολικές ενώσεις και προκαλούν διαρροή των ενδοκυτταρικών υγρών του μικροοργανισμού (Davidson et al., 2012). Τα συμπυκνώματα καπνού ξύλου έχουν θεωρηθεί ως μία από τις λίγες πρακτικές πηγές φυσικών φαινολικών ενώσεων που είναι χρήσιμες στη συντήρηση των τροφίμων. Συμβάλλουν κυρίως στα προφίλ γεύσης καπνού, στην αντιοξειδωτική δράση και στις αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Οι αναφορές δείχνουν ότι τα καρβονύλια έχουν αναφερθεί ότι πραγματοποιούνται σε ποσότητες περίπου 2,6 έως 4,6 τοις εκατό σε εμπορικά υγρά συμπυκνώματα καπνού (Maga, 2018). Ο ρόλος των καρβονυλίων ως αντιμικροβιακού έχει περιορισμένη τεκμηρίωση. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους όταν έχουν τη μορφή συμπυκνωμάτων καπνού μπορεί να συναχθεί με βάση τις 133 διαφορετικές αλδεΐδες και κετόνες που υπάρχουν στον καπνό. Από αυτά τα καρβονύλια, η φορμαλδεΐδη και η ακρολεΐνη έχουν αποδεδειγμένη τοξικότητα κατά των μικροοργανισμών. Τα καρβονύλια αναστέλλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη διεισδύοντας στο κυτταρικό τοίχωμα και αδρανοποιώντας τα ένζυμα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Τα καρβονύλια χρησιμοποιούν επίσης τρία μέσα (Τύπου Α, Β και Γ) για να αναστείλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών μέσω παθητικής αναστολής λόγω στέρησης θρεπτικών ουσιών. Η αναστολή τύπου Α θεωρείται ότι «δεσμεύει» θρεπτικά συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους στο μέσο ανάπτυξης, μειώνοντας τελικά την αποτελεσματική συγκέντρωση που είναι διαθέσιμη για τον μικροοργανισμό. Πρόσθετες ενώσεις καρβονυλίου σχηματίζουν χημικές ενώσεις με βασικά, πολυσθενή κατιόντα μετάλλων για να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα. Μερικά από τα καρβονύλια περιλαμβάνουν: α-κετο-καρβοξυλικά οξέα, 3-υδροξυκετόνες, 1,3-διόνες και ενδιόλες. Η αναστολή τύπου Β λειτουργεί αδρανοποιώντας ή ακινητοποιώντας εξωκυτταρικά ένζυμα που εκκρίνονται από

σαπρογονικά βακτήρια και μούχλα. Αυτά τα ένζυμα χρειάζονται για τη διάσπαση πολυμερισμένων υποστρωμάτων όπως οι πρωτεΐνες και οι γλυκάνες (Davidson et al., 2012). Τα καρβονύλια αναστέλλουν τον απόπολυμερισμό αυτών των πολυμερών μέσω αδρανοποίησης εκκρινόμενων ενζύμων ή απομόνωσής τους μακριά από τα υποστρώματα. Αυτό τελικά στερεί από τον μικροοργανισμό τα απαραίτητα αμινοξέα και σάκχαρα που χρειάζονται για τον φυσιολογικό μεταβολισμό. Η αναστολή τύπου C περιλαμβάνει την άμεση τροποποίηση των πολυμερών υποστρωμάτων που οι αποπολυμεράσες προσπαθούν να διασπάσουν. Τα καρβονύλια τροποποιούν τα πολυμερή έτσι ώστε να τα αφήνουν σε μια λιγότερο διαθέσιμη ή ευάλωτη κατάσταση για να δράσουν τα ένζυμα (Painter, 1998).

Τα οργανικά οξέα αποτελούν έως και 2,8 έως 9,5 τοις εκατό των συμπυκνωμάτων καπνού του εμπορίου. Από τα αναφερόμενα οργανικά οξέα που βρίσκονται στα συμπυκνώματα καπνού, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βενζοϊκό οξύ πιστώνονται ότι διαθέτουν το μεγαλύτερο αντιμικροβιακό δυναμικό (Davidson et al., 2012). Το αντιμικροβιακό δυναμικό των οργανικών οξέων είναι πιστοποιημένο για την επίδραση στο συνολικό pH και στην αδιάσπαστη μορφή του οξέος. Η λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί εύκολα να διεισδύσει από οργανικά οξέα στις αδιάσπαστες μορφές τους.

Επειδή το pH στο εσωτερικό του κυττάρου είναι υψηλότερο από το εξωτερικό, το οξύ έχει μεγάλη διάσταση στο εσωτερικό του κυττάρου. Μόλις διαχωριστεί μέσα στο κύτταρο, το κύτταρο θα εξαντλήσει όλη την εφεδρική του ενέργεια ATP μεταφέροντας τα διασπασμένα πρωτόνια έξω από το κύτταρο. Αυτό αφήνει το κύτταρο ανίκανο να εκτελέσει βασικές μεταβολικές οδούς που απαιτούνται για τη διατήρηση της ζωής (Davidson et al., 2012).

Οι φαινόλες, τα καρβονύλια και τα οργανικά οξέα συμβάλλουν σημαντικά στο αντιμικροβιακό δυναμικό των συμπυκνωμάτων καπνού.

1.3. *Listeria* Γένος και Ταξινόμηση

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει θετικά κατά Gram, μη σποριοποιητικά, θετικά σε καταλάση βακτήρια σε σχήμα ράβδου, τα οποία κάποτε ταξινομήθηκαν στην

οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes* από τους Murrayetal. (1926), ο οποίος απομόνωσε μια θετική κατά Gram ράβδο μήκους 1–2 μm και πλάτους 0,5 μm σε νεκρά εργαστηριακά κουνέλια και ινδικά χοιρίδια στο Κέιμπριτζ του Ηνωμένου Βασιλείου (Farber&Peterkin, 1991). Μετά από ασυνήθιστους θανάτους γερβίλων στη Νότια Αφρική στα τέλη της δεκαετίας του 1920, αυτό το βακτήριο ονομάστηκε *Listerella hepatolytica* από τον Pirie προς τιμήν του Λόρδου Joseph Lister, ο οποίος αποφάσισε ότι για την πρόληψη των λοιμώξεων, οι χειρουργοί πρέπει να αποστειρώνουν τα όργανά τους πριν από κάθε επέμβαση (Norton&Braden, 2007). Επειδή τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους Murrayetal. (1926) και Pirie (1927) έδειξαν μεγάλη ομοιότητα, το βακτήριο μετονομάστηκε σε *Listerella monocytogenes*. Ωστόσο, το γενικό όνομα *Listerella* είχε χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για ένα πρωτόζωο και το 1940, ο Pirie πρότεινε έτσι την αλλαγή του ονόματος σε *Listeria monocytogenes*. Αυτό το όνομα έγινε αποδεκτό, παρόλο που το όνομα του γένους υπήρχε ήδη στη βοτανική ταξινόμηση, συμπεριλαμβανομένης μιας ορχιδέας με το όνομα *Listeria*, και στη ζωολογία, συμπεριλαμβανομένου ενός δίπτερου που ονομάζεται *Listeria* (Seeliger, 1961). Τα γένη *Listeria* και *Brochothrix* είναι μέλη της οικογένειας *Listeriaceae*, της τάξης των *Bacillales*, της τάξης *Bacilli* και του γένους *Firmicutes* (Ludwigetal., 2009).

Επί του παρόντος, είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο πυρήνας της φυλογένεσης της *Listeria* αποτελείται από έξι διαφορετικά είδη: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayii* και *L. ivanovii* (Wiedmann, 2002). Ένα έβδομο είδος, το *Listeria murrayi*, είχε αναγνωριστεί στο παρελθόν στο γένος *Listeria*. Ωστόσο, η ανάλυση υβριδισμού DNA-DNA, η ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλών τόκων και η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού θραύσματος rRNA, απέδειξαν ότι το *L. murrayi* φαινόταν να είναι υποείδος εντός της *L. grayii*. (Rocourt et al., 1992). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες περιέγραψαν την εμφάνιση άτυπων αιμολυτικών στελεχών *L. innocua* που φέρουν το νησί παθογένειας της *Listeria I* (Graves et al., 2010; Johnson et al., 2004). Πιο πρόσφατα, μελέτες έχουν προτείνει την αναγνώριση δύο νέων ειδών στο γένος *Listeria*, συμπεριλαμβανομένων των *Listeria marthii* και *Listeria rocourtiae* (Graves et al., 2010).

Τα είδη της *Listeria* εμφανίζονται ως μικρές ράβδοι που κυμαίνονται σε μέγεθος από 0,4 έως 0,5 επί 1-2 μm , και μερικές φορές βρίσκονται διατεταγμένες σε μικρές αλυσίδες όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Μια εμφάνιση κοκκοειδούς

μπορεί να παρατηρηθεί σε απευθείας επιχρίσματα. Η *Listeria* παράγει μαστίγια σε θερμοκρασία δωματίου και εμφανίζει πτωτική κίνηση όταν εξετάζεται σε ζωμό και μπορεί να παρατηρηθεί κινητικότητα της σε ημιμαλακό άγαρ στους 30°C (Robertsetal., 2009), αλλά τα μαστίγια δεν παράγονται στους 37°C (Peelet. al., 1988).

1.3.1 *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Η μόλυνση των τροφίμων από την *L. monocytogenes* μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σημείο της τροφικής αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένων των αγροκτημάτων, των εργοστασίων επεξεργασίας τροφίμων, των επιχειρήσεων λιανικής και στο σπίτι (Saunders, 2006). Η *L. monocytogenes* μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ωμών όσο και των επεξεργασμένων τροφίμων. Πολλά τρόφιμα όπως τα μαλακά τυριά, τα χοτ-ντογκ και τα θαλασσινά έχουν εμπλακεί σε κρούσματα λιστερίωσης, αλλά η *L. monocytogenes* μπορεί επίσης να απομονωθεί από άλλα τρόφιμα όπως το βόειο κρέας, το χοιρινό, τα λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα φρέσκα προϊόντα και τα προϊόντα ψαριών (Rocourt & Cossart, 1997). Όπως αναφέρθηκε από τους Gandhietal (2007), οι ασθένειες που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με παθογόνα όπως η *Listeria monocytogenes* έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις και επιπτώσεις στη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Με βάση όλα τα παραπάνω είναι σαφές η ανάγκη να εξασφαλιστεί η υγεία του καταναλωτή και η υγειονομική θωράκιση των προϊόντων.

Η *Listeria* έχει αποδειχθεί ότι επιβιώνει σε καλλιεργημένο βουτυρόγαλα, βούτυρο και γιαούρτι, εκ των οποίων αυτά τα συγκεκριμένα τρόφιμα εξαρτώνται κυρίως από την επαρκή ζύμωση για να δώσουν χαμηλό pH του προϊόντος που δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη της *Listeria*. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι μια μεγάλη ποικιλία κρεάτων μπορεί να μολυνθεί με *L. monocytogenes* και η μεγαλύτερη μόλυνση παρατηρείται σε προϊόντα κρέατος και πουλερικά. Για παράδειγμα, οι (1990) ανέφερε ότι μεταξύ 12-60% του ωμού κοτόπουλου ήταν μολυσμένο με *L. monocytogenes* και νεαρά πτηνά αποικίστηκαν από αυτό το ανθρώπινο παθογόνο σε υψηλότερο ποσοστό. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα της *L. monocytogenes* να επιβιώνει και να αναπτύσσεται στο κρέας εξαρτάται από τη

θερμοκρασία, το pH του κρέατος, τον τύπο του ιστού και την αρχική μικροχλωρίδα που υπάρχει ήδη στην επιφάνεια του κρέατος (Farber&Peterkin, 1991).

Δεδομένου ότι η *Listeria monocytogenes* βρίσκεται στο έδαφος και στο νερό, τα ωμά λαχανικά μπορούν να υποστούν μόλυνση είτε μέσω εδάφους είτε μέσω της κοπριάς που χρησιμοποιείται ως λίπασμα (Schlechtetal., 1983). Τα ζώα (δηλαδή, η άγρια ζωή και τα κατοικίδια ζώα) μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς της *L. monocytogenes* και να προβούν σε μόλυνση των τροφίμων από ζωική προέλευση όπως γαλακτοκομικά και κρέατα μέσω ασυμπτωματικής αποβολής σε γάλα και κόπρανα. Όχι μόνο μπορεί να απομονωθεί η *L. monocytogenes* από ωμά τρόφιμα (π.χ. λαχανικά, άψητα κρέατα), αλλά μπορεί επίσης να ανιχνευθεί σε επεξεργασμένα τρόφιμα όπως μαλακά τυριά και αλλαντικά (Eetem, 1961; Fenlon, 1999). Αν και η *Listeria* μπορεί εύκολα να αδρανοποιηθεί με το μαγείρεμα και την παστερίωση (Petran&Zottola, 1989), παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (π. περιβάλλον μετά το μαγείρεμα αλλά πριν από τη συσκευασία (Tompkin, 2002).

1.3.2 Η *Listeria* στο περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας τροφίμων

Ένας βασικός λόγος που η *Listeria* παρουσιάζει τέτοιο πρόβλημα για πολλούς κατασκευαστές τροφίμων είναι απλώς επειδή οι συνθήκες επεξεργασίας τροφίμων και το σχετικό περιβάλλον επεξεργασίας επιτρέπουν την ανάπτυξη της *Listeria*. Αυτή η θετική κατά Gram, προαιρετική αναερόβια, ενδοκυτταρική ράβδος είναι ικανή να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, συμπεριλαμβανομένης της ψύξης (π.χ. 1°C έως 45°C), μεγάλου εύρους συνθηκών pH (π.χ. 4,3-9,5), σχετικά χαμηλής ενεργότητας νερού ($a_w > 0,90$) και υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού (έως 10%w/w), επιτρέποντας την επιβίωση και την ανάπτυξη σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα που έχουν σχέση με τα τρόφιμα και τα τρόφιμα (Farber&Peterkin, 1991). Πολλές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της *L. monocytogenes* να αποικίζεται, να πολλαπλασιάζεται και να παραμένει στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων καθώς και στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων για εκτεταμένες περιόδους, δείχνοντας τα

περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά επιβίωσης αυτού του τριτογενούς παθογόνου (Kabukietal., 2004). Συνολικά, η *Listeria* είναι ένα πολύ προσαρμόσιμο παθογόνο που είναι ικανό να επιβιώσει ακόμη και μετά από κατάψυξη, αφυδάτωση της επιφάνειας και ψύξη με ψεκασμό. Ωστόσο, η *Listeria* μπορεί εύκολα να θανατωθεί με το σωστό μαγείρεμα.

1.3.3 Παθογόνος *Listeriamonocytogenes* και ασθένεια

Στον άνθρωπο, τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης παρατηρούνται σε νεογνά, ηλικιωμένους, έγκυες γυναίκες ή άλλως ανοσοκατεσταλμένα άτομα όπως αυτά που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που συνήθως μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων (Meadetal., 1999). Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις, το παθογόνο μπορεί επίσης να μεταδοθεί απευθείας από μολυσμένα ζώα στον άνθρωπο. που έχει παρατηρηθεί σε κτηνιάτρους, αγρότες και προσωπικό σφαγείων που χειρίζονται μολυσμένους ιστούς (Poulsen&Czuprynski, 2013). Η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό μπορεί να συμβεί διαπλακουντιακά ή το βρέφος μπορεί να μολυνθεί κατά τον τοκετό μέσω επαφής με οργανισμούς στο κανάλι γέννησης (Poulsen&Czuprynski, 2013). Οι Schuchatetal (1991) περιέγραψαν ένα ασυνήθιστο παράδειγμα μετάδοσης της *Listeria* σε νοσοκομειακή εστία που αφορούσε νεογνά, τα οποία μολύνθηκαν μέσω επαφής με μολυσμένο ορυκτέλαιο που χρησιμοποιήθηκε για το μπάνιο των βρεφών σε μια συγκεκριμένη νεογνική μονάδα.

1.4 Σκοπός της διατριβής

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να διερευνήσει τις ανασταλτικές επιδράσεις των υγρών εναιωρημάτων καπνού στην ανάπτυξη της *Listeriamonocytogenes* σε υγρά θρεπτικά μέσα. Η μελέτη στοχεύει να διερευνήσει εάν οι βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στον καπνό μπορούν να χρησιμεύσουν ως πιθανοί αντιμικροβιακοί παράγοντες κατά αυτού του παθογόνου. Εξετάζοντας τα πρότυπα ανάπτυξης της *L.*

monocytophages παρουσία ποικίλων συγκεντρώσεων υγρών εναιωρημάτων καπνού, αυτή η έρευνα επιδιώκει να προσδιορίσει την αποτελεσματικότητα, τη βέλτιστη συγκέντρωση στην αναστολή του βακτηριακού πολλαπλασιασμού. Τα ευρήματα θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών συντήρησης τροφίμων, αξιοποιώντας φυσικές ενώσεις για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και της δημόσιας υγείας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Έγινε χρήση 6 υγρών καπνών σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις έκαστος, για να γίνει η διερεύνηση της επίδρασή τους στον τρόπο ανάπτυξης που έχει το στέλεχος *Listeria monocytogenes* Pirie NCTC 10527. Για να διεξαχθεί το πείραμα έγινε χρήση του μηχανήματος μέτρησης οπτικής πυκνότητας, όπου η καταγραφή των μεταβολών στις τιμές της οπτικής πυκνότητας προέβησαν στο να αναπτυχθεί η καμπύλη του μικροοργανισμού για όλες τις συγκεντρώσεις καπνού.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.

Tryptone Soy Broth (TSB)

Το TSB είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης, το οποίο επιτρέπει να αναπτυχθούν όλοι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να έχουν ανάπτυξη σε εργαστηριακά υλικά. Το TSB θεωρείται κατάλληλο για να καλλιεργηθούν τόσο αερόβιοι όσο και αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας περιέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) έχει χρήση για να ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση. Διαδικασία παρασκευής:

Εντός μιας φιάλης έγινε ζύγιση και προσθήκη 30 g σκόνης TSB και επιπλέον έγινε συμπλήρωση 1000 ml από απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 10 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες και έγινε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

Maximum Recovery Diluent (MRD).

Το MRD (0,85% w/v+ 1%w/v peptone) είναι ισοτονικό ωσμωρυθμιστικό διάλυμα, όπου παρασκευάζεται από διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για την επίτευξη μικροβιολογικής ανάλυσης των τροφίμων. Διαδικασία παρασκευής :

Εντός μιας φιάλης έγινε ζύγιση και προσθήκης 8,5g NaCl και 1g peptone, και εν συνεχεία υπήρξε πλήρωση της φιάλης με 1000 ml από απιονισμένο νερό. Τέλος, με τη βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 9 ml MRD σε σωληνάκια (δοκιμαστικούς σωλήνες) και έγινε αποστείρωσή τους στους 121°C για 15 λεπτά.

2.3 Καπνοί

Όπως έγινε αναφορά και στις προηγούμενες ενότητες έγινε χρήση 6 καπνών σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας, προκειμένου να γίνει διερεύνηση της επίδρασης αυτών στον τρόπο που αναπτύσσεται το στέλεχος *Listeria monocytogenes* Pirie NCTC 10527. Για να προετοιμαστούν τα διαλύματα προστέθηκαν οι επιθυμητές ποσότητες του κάθε καπνού σε 10 ml TSB. Οι συγκεντρώσεις τους θρεπτικό υλικό ήταν οι εξής :

ΚΑΠΝΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (% v/v)		
L9	0,05%	0,1%	0,15%
G6	0,10%	0,2%	0,35%
C3	0,50%	0,75%	0,10%
D4	0,50%	0,75%	0,01%
A1	0,60%	0,90%	0,12%
E5	0,60%	0,90%	0,12%

2.4 Αναζωογόνηση στελέχους *Listeria monocytogenes*

Για να διεξαχθεί σωστά το πείραμα, κατέστη αναγκαίο να αναζωογονηθεί το στέλεχος *Listeria monocytogenes* από τους -80°C όπου γινόταν η φύλαξή του υπό συνθήκες βαθιάς κατάψυξης. Αφού έγινε επώαση στους 37°C για 24 ώρες, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 5000 rpm για διάρκεια 12 λεπτών, με σκοπό την λήψη βακτηριακού ιζήματος. Στην συνέχεια υπήρξε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10 ml MRD και έπειτα υπήρξε εκτέλεση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων εντός δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν 9 ml MRD. Από αυτές έγινε χρήση των αραιώσεων που αντιστοιχούσαν στο θρεπτικό υλικό αύξησης σε μικροβιακούς πληθυσμούς 10^7 , 10^5 , 10^3cfu/ml

2.5 Πλήρωση μικροπλακών

Για να πληρωθεί η κάθε μικρόπλακα που έχει 96 θέσεις (βοθρία με επίπεδο πυθμένα) γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής.

Σε κάθε σειρά βοθρίων της μικροπλάκας γινόταν προσθήκη 180 μL υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB, το οποίο εκτός από τον κάθε καπνό στην επιθυμητή συγκέντρωση περιείχε και 20 μL από τους βακτηριακούς πληθυσμούς από την κατάλληλη αραιώση ώστε στο θρεπτικό υλικό αύξησης να επιτευχθούν συγκεντρώσεις των 10^3 , 10^5 και 10^7cfu/mL). Επίσης, σε μία σειρά της μικροπλάκας έγινε προσθήκη 180mL TSB άνευ καπνού και 20 mL από διαφορετικούς πληθυσμούς του μικροοργανισμού, τα οποία αποτέλεσαν και τους μάρτυρες. Αφού έγιναν όλες οι παραπάνω ενέργειες, το plate έγινε τοποθέτησή τους στο Synergy HTX MultiModeMicroplateReader.

2.6 SynergyHTXMulti-ModeMicroplateReader.

Η συσκευή Reader είναι ένας αυτοματοποιημένος μετρητής οπτικής πυκνότητας. Οι μετρήσεις απορρόφησης λαμβάνονταν στα 580 nm κάθε 20 λεπτά, αφού γινόταν προήγησης της ανακίνησης του plate για 10 δευτερόλεπτα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν για διάστημα 48 ωρών στους 30°C, ενώ τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με το λογισμικό Gen5 DataAnalysis Software. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν το V max (ρυθμός αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού), καθώς και διαγράμματα με τις καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

3. Αποτελέσματα

Η ανάλυση στα πειραματικά δεδομένα έδειξε ότι επιδρά ο καπνός στο να αναπτυχθεί ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* στελέχους Pirie NCTC 10527 B124. Στις συγκεντρώσεις στις οποίες έγινε χρήση του υγρού καπνού παρατηρήθηκε αναστολή στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε διαφορετική απόκριση στον τρόπο που επιδρούσε ο κάθε καπνός αναλόγως του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού. Παρακάτω γίνεται παρουσίαση τριών (3) πινάκων με την επίδραση του κάθε καπνού επί του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ($\mu_{\max}$) και του χρόνου προσαρμογής (Lagtime) συνοπτικώς για κάθε microplate, όπως επίσης και γίνεται παρουσίαση των διαγραμμάτων που είχαν οι τρεις καπνοί και οι συγκεντρώσεις καπνών: α) L9 0,1%, β) G6 0.35%, γ) C3 1%, δ) D4 0,75%, ε) A1 1% ζ) E5 0,9%.

3.1 Αποτελέσματα πρώτης (1ης) μικροπλάκας.

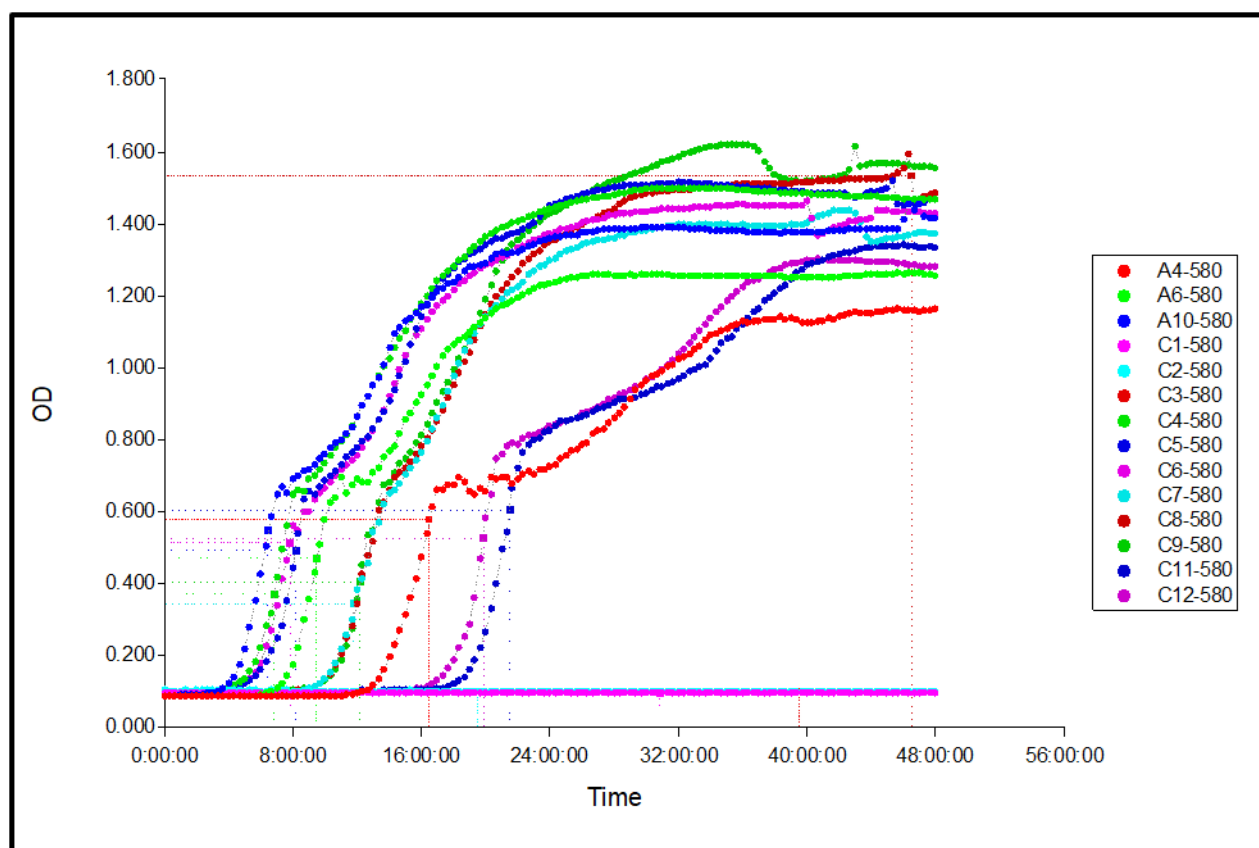
Στον πίνακα 2 γίνεται σύνοψη των μετρήσεων που έγιναν στην πρώτη (1η) μικροπλάκα συνοψίζονται. Πιο συγκεκριμένα αναφέρονται οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Εν συνεχεία γίνεται παρουσίαση αναλυτική των μετρήσεων και των διαγραμμάτων που έχει ο εκάστοτε καπνός.

Οι καπνοί που έγινε χρήση αυτών ήταν οι L9 και G6 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για να παρουσιαστούν τα διαγράμματα έγινε επιλογή αυτών όπου είναι πιο εύκολα αντιληπτή η κάθε μεταβολή.

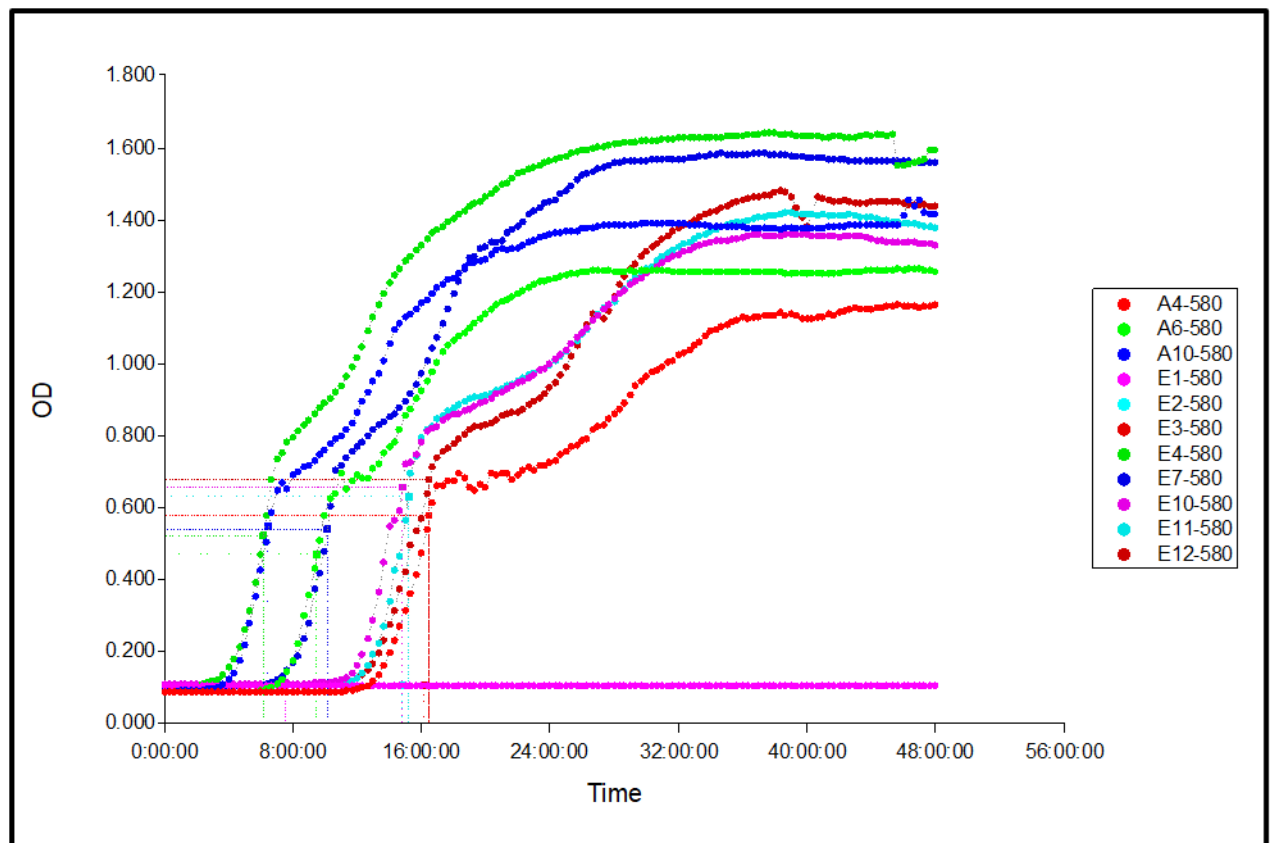
Πίνακας 2: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lagtime (h)
0,0% v/v (μάρτυρες)	10^3	3,67	12,16
	10^5	3,96	6,53
	10^7	4,17	3,40
L9 0,05%	10^3	5,89	18.21
	10^5	4,50	10.00
	10^7	4,83	5,22
L9 0,1%	10^3	4,91	12,09
	10^5	4,74	7,28
	10^7	5,49	3,40
L9 0,15%	10^3	5,31	18,03
	10^5	4,94	9,54
	10^7	4,53	4,24
G60,1%	10^3	6,28	11,44
	10^5	6,26	7,00
	10^7	4,54	3,30
G6 0,2%	10^3	6,59	11,16
	10^5	7,17	6,28
	10^7	6,06	3,22
G6 0,35%	10^3	5,79	10,52
	10^5	6,88	6,40
	10^7	5,86	3,22



Εικόνα 1:: Επίδραση του καπνού L9 συγκέντρωσης 0,1% 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 1, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη εκτός από την διάρκεια του 10^7 cfu/ml που ήταν ίδια σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.



Εικόνα 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 2, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.

3.2 Αποτελέσματα δεύτερης (2ης) μικροπλάκας

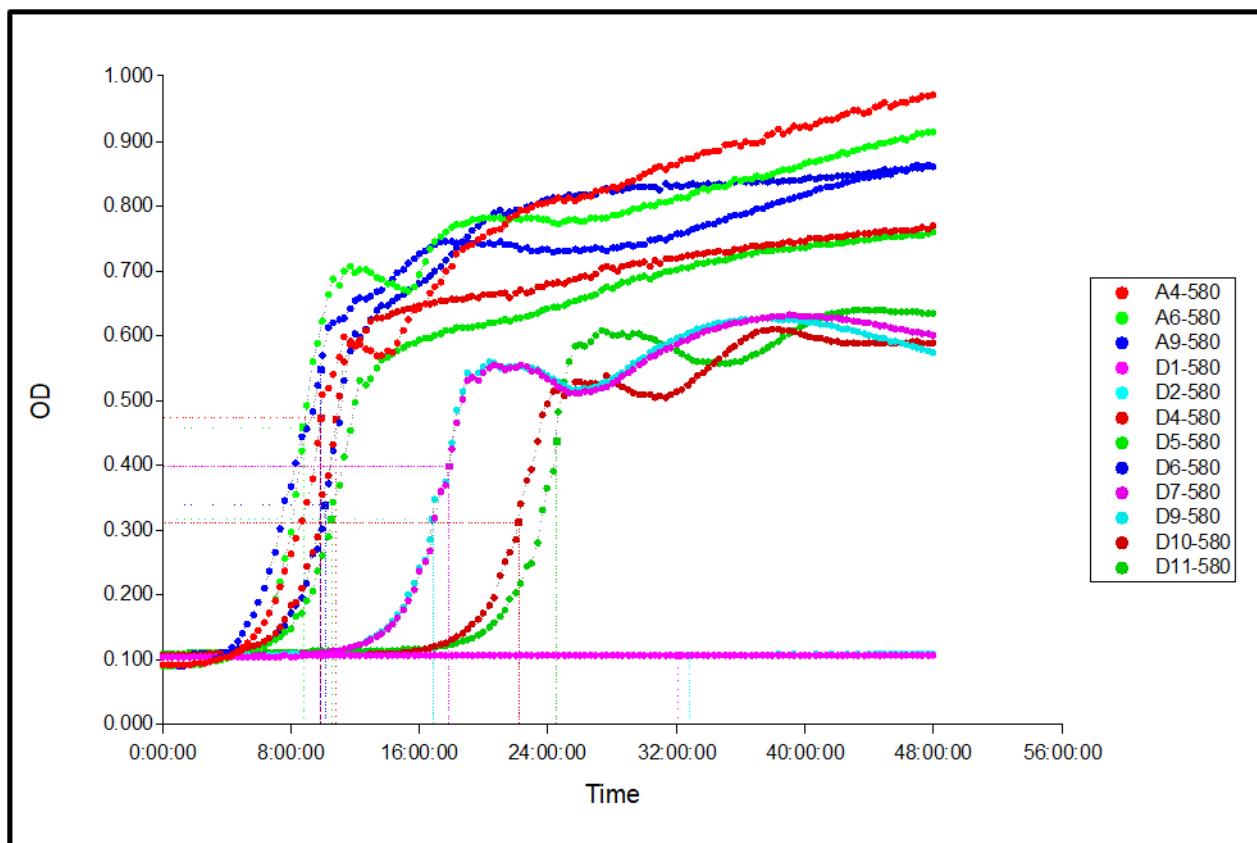
Στον πίνακα 3 γίνεται σύνοψη των μετρήσεων που έγιναν στην πρώτη (3η) μικροπλάκα συνοψίζονται. Εν συνεχεία γίνεται παρουσίαση αναλυτική των μετρήσεων και των διαγραμμάτων που έχει ο εκάστοτε καπνός.

Οι καπνοί που έγινε χρήση αυτών ήταν οι C3 και D4 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για να παρουσιαστούν τα διαγράμματα έγινε επιλογή αυτών όπου είναι πιο εύκολα αντιληπτή η κάθε μεταβολή.

*Πίνακας 3: Σύνοψη 2ης μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους*

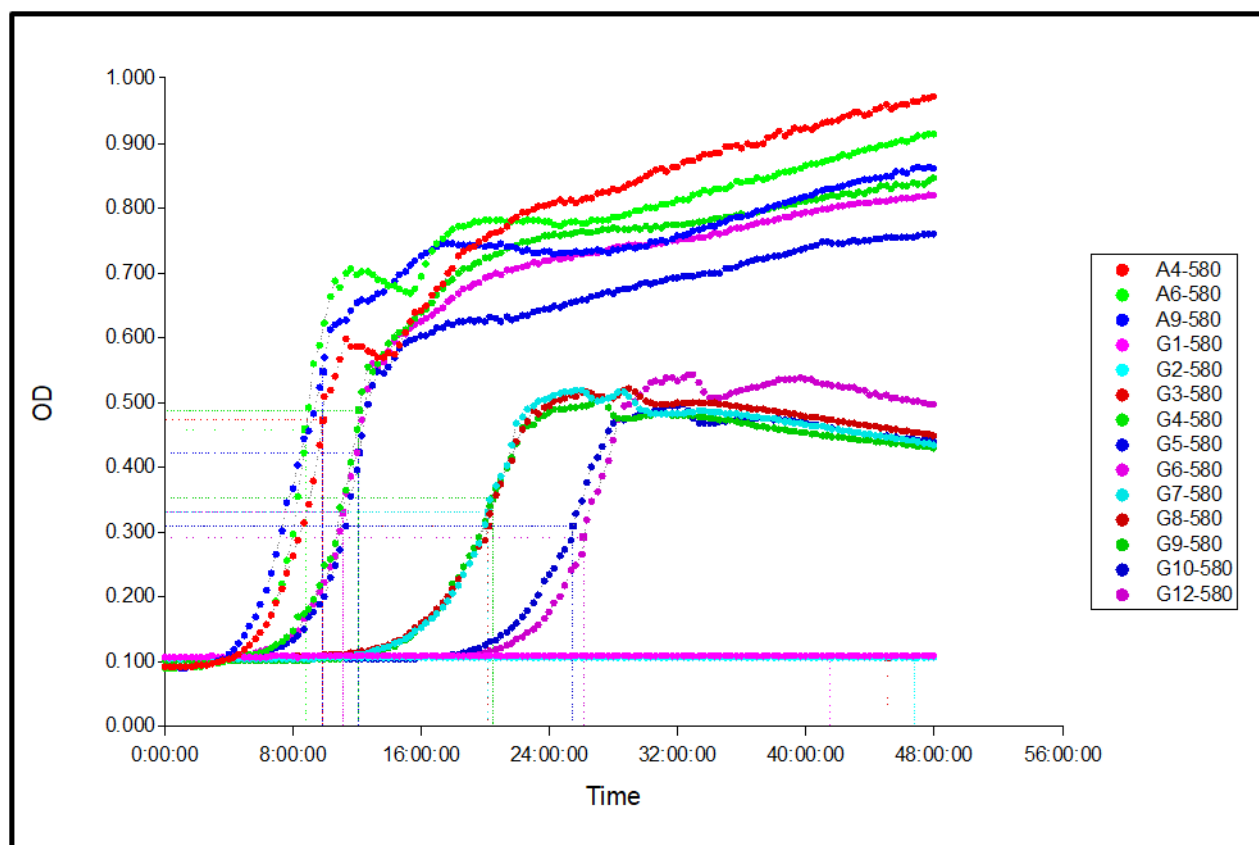
Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{\max}(h^{-1})$	Lagtime (h)
0,0% v/v (μάρτυρες)	10^3	3,77	6,09
	10^5	3,90	5,04
	10^7	2,39	4,38
C30,5%	10^3	3,92	16,07
	10^5	3,20	12,19
	10^7	3,69	6,23
C3 0,75%	10^3	2,97	16,22
	10^5	2,54	13,06
	10^7	2,77	7,07
C31%	10^3	3,71	16,37
	10^5	2,98	11,54
	10^7	3,90	6,09
D40,5%	10^3	2,51	17,46
	10^5	2,45	12,29
	10^7	2,93	7,23
D4 0,75%	10^3	2,87	11,43
	10^5	2,77	11,48
	10^7	2,78	6,38

D4 1%	10^3	2,33	19,23
	10^5	1,76	13,20
	10^7	2,86	6,08



Εικόνα 3: Επίδραση του καπνού C3 συγκέντρωσης 1% ν/ν 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 3, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.



Εικόνα 4: Επίδραση του καπνού D4 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 4, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.

3.3 Αποτελέσματα τρίτης (3ης) μικροπλάκας

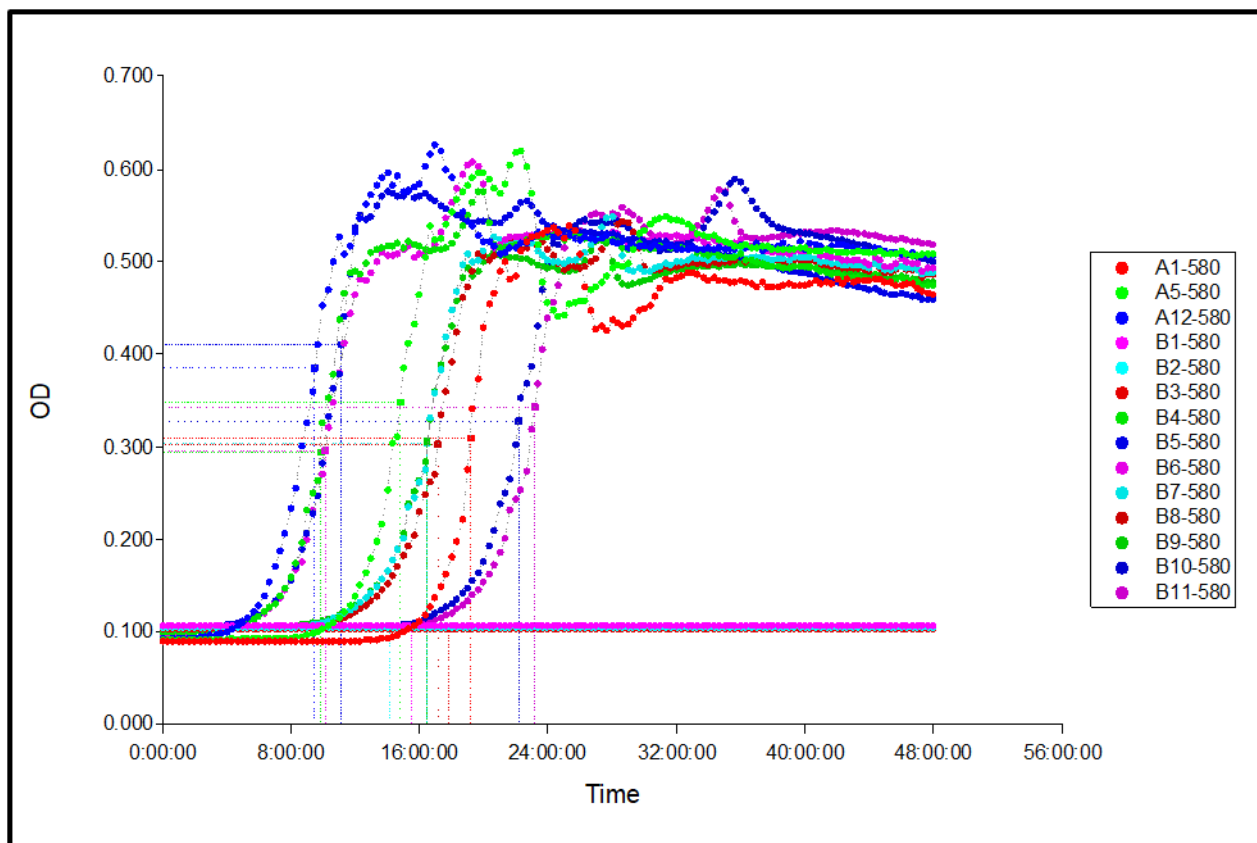
Στον πίνακα 4 γίνεται σύνοψη των μετρήσεων που έγιναν στην τρίτη (3^η) μικροπλάκα. Εν συνεχεία γίνεται παρουσίαση αναλυτική των μετρήσεων και των διαγραμμάτων που έχει ο εκάστοτε καπνός.

Οι καπνοί που έγινε χρήση αυτών ήταν οι Α1 και Ε5 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για να παρουσιαστούν τα διαγράμματα έγινε επιλογή αυτών όπου είναι πιο εύκολα αντιληπτή η κάθε μεταβολή.

*Πίνακας 4: Σύνοψη 3ης μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής Lagtime (h) της *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.*

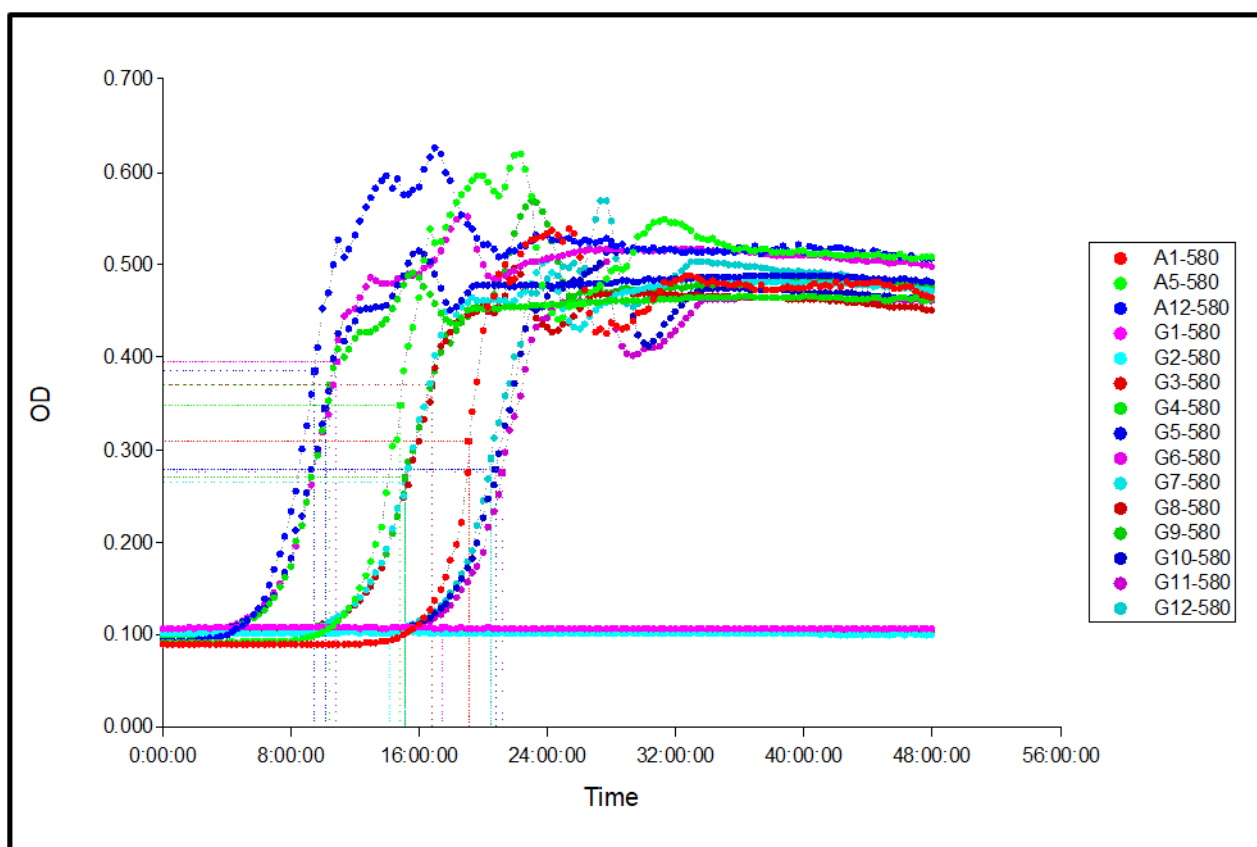
Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Lagtime (h)
0,0% v/v (μάρτυρες)	10^3	3,25	15,02
	10^5	3,76	9,42
	10^7	2,49	3,32
Α10,6%	10^3	2,50	16,07
	10^5	2,73	10,28
	10^7	2,91	5,43
Α1 0,8%	10^3	3,10	4,32
	10^5	3,08	10,25
	10^7	2,78	4,28
Α11%	10^3	3,26	16,01
	10^5	3,56	10,14
	10^7	3,07	4,30
Ε50,6%	10^3	3,53	15,22
	10^5	3,63	10,28
	10^7	3,74	3,26

E5 0,9%	10^3	2,47	17,00
	10^5	3,05	10,23
	10^7	3,12	3,36
E5 1,2%	10^3	2,03	18,09
	10^5	1,70	10,37
	10^7	2,00	3,53



Εικόνα 5: Επίδραση του καπνού A1 συγκέντρωσης 0,6% ν/ν 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 5, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.



Εικόνα 6:Επίδραση του καπνού E5 συγκέντρωσης 1,2% ν/ν 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.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην εικόνα 6, η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και στους τρεις πληθυσμούς είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική διάρκεια που χρειάστηκαν οι μάρτυρες εξαιτίας της ύπαρξης του καπνού.

4. Συζήτηση

Σε αυτήν την προπτυχιακή εργασία, διερευνήθηκε ο πιθανός αντίκτυπος έξι διαφορετικών ειδών καπνού που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων (παραγωγή αλιευτικών προϊόντων) στο κατά πόσο αναπτύσσεται ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Murrayetal.) Pirie NCTC 10527 που ευθύνεται σε έναν μεγάλο βαθμό για περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης και προέρχεται κατά κύριο λόγο από την κατανάλωση διατροφικών ομάδων όπως είναι το κρέας (βοδινό), τα πουλερικά και τα θαλασσινά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, ο καπνός βρέθηκε πράγματι ότι επηρεάζει την ανάπτυξη του στελέχους της *Listeria monocytogenes* με τη χρήση της μεθόδου οπτικής πυκνότητας. Ωστόσο, οι επιπτώσεις κάθε είδους καπνού στη *Listeria* φάνηκε ότι είχαν διαφορετική επίδραση τόσο στο είδος του καπνού όσο και στους πληθυσμούς του παθογόνου. Αυτές οι διαφορές μπορεί να προκύψουν από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις καρβονυλίων και φαινολικών ουσιών σε αυτούς τους καπνούς.

Οι Messina etal. (1987) ανέφεραν πώς ο καπνός επηρεάζει τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* στελέχους (Murrayetal.) Pirie NCTC 10527 B124, ο οποίος επίσης μελετάται σε αυτή την εργασία. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση του καπνού εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε πολική φαινόλη, μια ουσία που αυξάνει τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες.

Σε πειράματα των Faith etal. (1992), έγινε εξέταση 11 εμπορικών φαινολών (συστατικά υγρού καπνού), μεταξύ των οποίων η ισοεγενόλη αποδείχθηκε αποτελεσματική έναντι της *Listeria monocytogenes* στελέχους (Murrayetal.) Pirie NCTC 10527 για τις ανασταλτικές του επιδράσεις, ενώ τόνισαν την ύπαρξη και άλλων φαινολών που δεν περιλαμβάνονται στην εργασία τους αλλά που θα μπορούσαν να ξεχωρίσουν για τις αντιμικροβιακές τους επιδράσεις. Στην παρούσα μελέτη, η αναστολή της ανάπτυξης του μικροβιακού στελέχους της *Listeria monocytogenes* στελέχους (Murrayetal.) Pirie NCTC 10527 B124 ήταν πιο έντονη από τον καπνό D4 σε συγκέντρωση 1 % στον μικροβιακό πληθυσμό 10^3cfu/ml όπου παρατηρήθηκε ο μέγιστος μέσος χρόνος μικροβιακής ανάπτυξης έναντι των μαρτύρων στον αντίστοιχο πληθυσμό και επίσης παρατηρήθηκε ανάπτυξη του

πληθυσμού 10^5 . Οι υπόλοιποι καπνοί L9 0.1%, G6 0,1% , C3 1% , A1 0,6% και E9 1,2 % δεν εμφάνισαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση.

Με δεδομένο αυτό και τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη καταλήγουμε στο γεγονός ότι ο καπνός D4 σε συγκέντρωση 1 % φαίνεται να είναι εκείνος που μπορεί να παρεμποδίσει αποτελεσματικά το παθογόνο να αναπτυχθεί.

5. Συμπεράσματα

Ο πιο δραστικός καπνός ως προς τη *Listeria monocytogenes* στελέχους Pirie NCTC 10527 ήταν ο καπνός D4 σε συγκέντρωση 1%w/v , όπου στον πληθυσμό 10^3 και 10^5 cfu/ml διαπιστώθηκε η μέγιστη επίδραση στην αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, αφού στον πρώτο υπήρξε αύξηση πάνω από το τριπλάσιο του μέσου χρόνου προσαρμογής με ταυτόχρονη μείωση του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Οι υπόλοιποι καπνοί δεν επέδρασαν σημαντικά στην μείωση του ρυθμού αύξησης και την αύξηση του χρόνου προσαρμογής του *L. monocytogenes* στελέχους Pirie NCTC 10527 με αποτέλεσμα να μην είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματικοί για την παρεμπόδιση αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού .

6. Βιβλιογραφία

- Bailey, J. S., Fletcher, D. L., & Cox, N. A. (1990). *Listeria monocytogenes* colonization of broiler chickens. *Poultry science*, 69(3), 457-461.
- Barylko-Pikielna, N. (1977). Contribution of smoke compounds to sensory, bacteriostatic and antioxidative effects in smoked foods. *Pure and Applied Chemistry*, 49(11), 1667-1671.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2012). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 765-801.
- Estrada-Muñoz, R., Boyle, E. A. E., & Marsden, J. L. (1998). Liquid smoke effects on *Escherichia coli* O157: H7, and its antioxidant properties in beef products. *Journal of Food Science*, 63(1), 150-153.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.
- Fenlon, D. R. (1999). *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: *Listeria: Listeriosis and food safety*, (2nd Ed). edited by Elliot T. Ryser, Elmer H. Marth, pp 21-37.
- Fessmann, K. D. (1995). Smoking technology at a time of change. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 75(9), 1124-1126.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., ... & Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1280-1288.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Messer, J., ... & Hitchins, A. D. (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4256-4266.

- Kabuki, D. Y., Kuaye, A. Y., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2004). Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2803-2812.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.
- Maga, J. A. (2018). *Smoke in food processing*. CRC press.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.
- Norton, D. M., & Braden, C. R. (2007). 10 Foodborne Listeriosis. *Listeria, listeriosis, and food safety*, 305.
- Ojeda, M., Bárcenas, P., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., & Guillén, M. D. (2002). Chemical references in sensory analysis of smoke flavourings. *Food chemistry*, 78(4), 433-442.
- Painter, T. J. (1998). Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. *Carbohydrate polymers*, 36(4), 335-347.
- Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria manocytoenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting. *Microbiology*, 134(8), 2171-2178.
- Petran, R. L., & Zottola, E. A. (1989). A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of food science*, 54(2), 458-460.
- Pirie, J. H. (1927). A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease". *Publ S Afr Inst Med Res*, 3(13), 163-187.

- Poulsen, K. P., & Czuprynski, C. J. (2013). Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Animal health research reviews*, 14(1), 30-39.
- Roberts, A. J., Williams, S. K., Wiedmann, M., & Nightingale, K. K. (2009). Some *Listeria monocytogenes* outbreak strains demonstrate significantly reduced invasion, *inlA* transcript levels, and swarming motility in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5647-5658.
- Rocourt, J., & Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 161, 1.
- Sauders, B. D., Durak, M. Z., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo Jr, A. J., ... & Wiedmann, M. (2006). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. *Journal of food protection*, 69(1), 93-105.
- Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206.
- Schuchat, A., Lizano, C., Broome, C. V., Swaminathan, B., Kim, C., & Winn, K. (1991). Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. *The Pediatric infectious disease journal*, 10(3), 183-189.
- Seeliger, H. P. R. (1961). *Listeriosis* Hafner Publishing Company. Inc., New York, 183.
- Spindler, K. (1994). *The Man in the Ice* London Weidenfeld and Nicolson.
- Suñen, E., Aristimuño, C., & Fernandez-Galian, B. (2003). Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 °C. *Food Research International*, 36(2), 111-116.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection*, 65(4), 709-725.
- Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85(2), 524-532.

Ελληνική Βιβλιογραφία

-Μποζιάρης Ι., (2013), Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 3η Έκδοση.

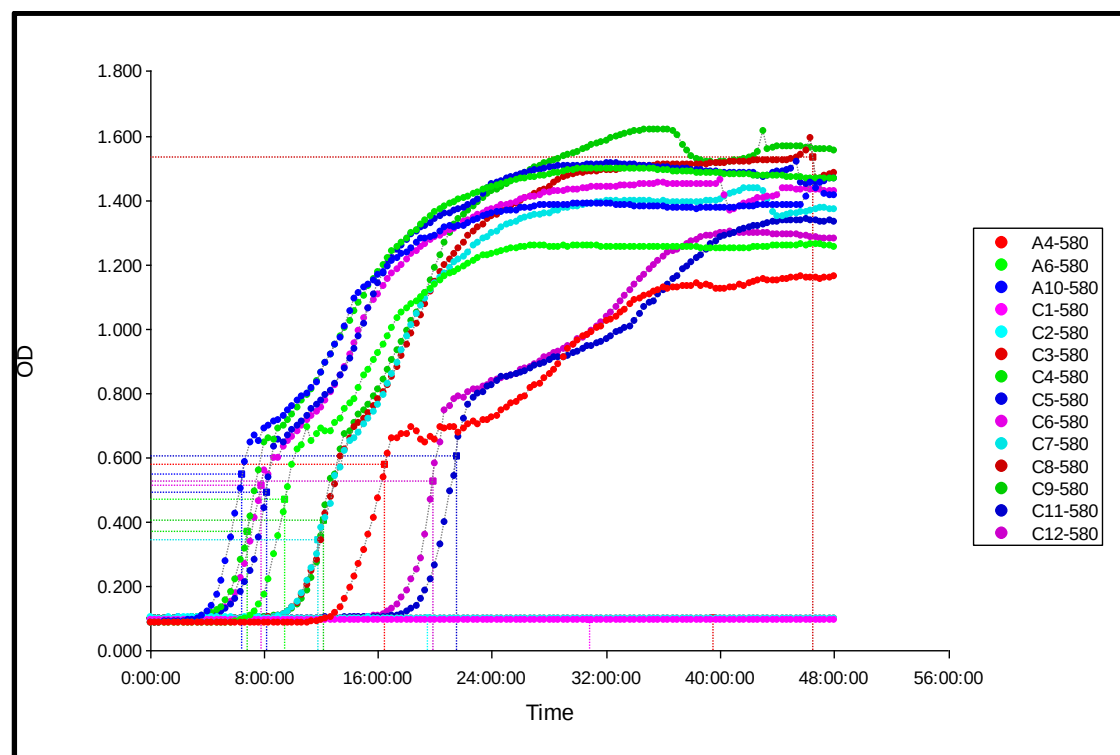
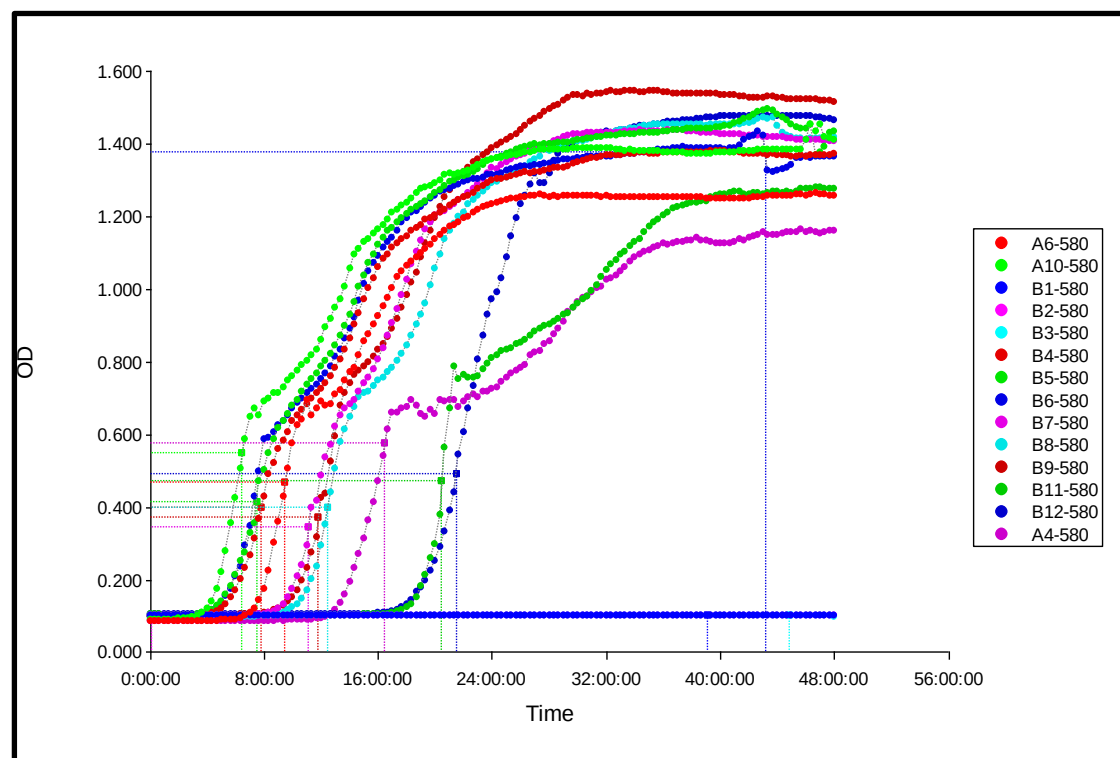
ABSTRACT

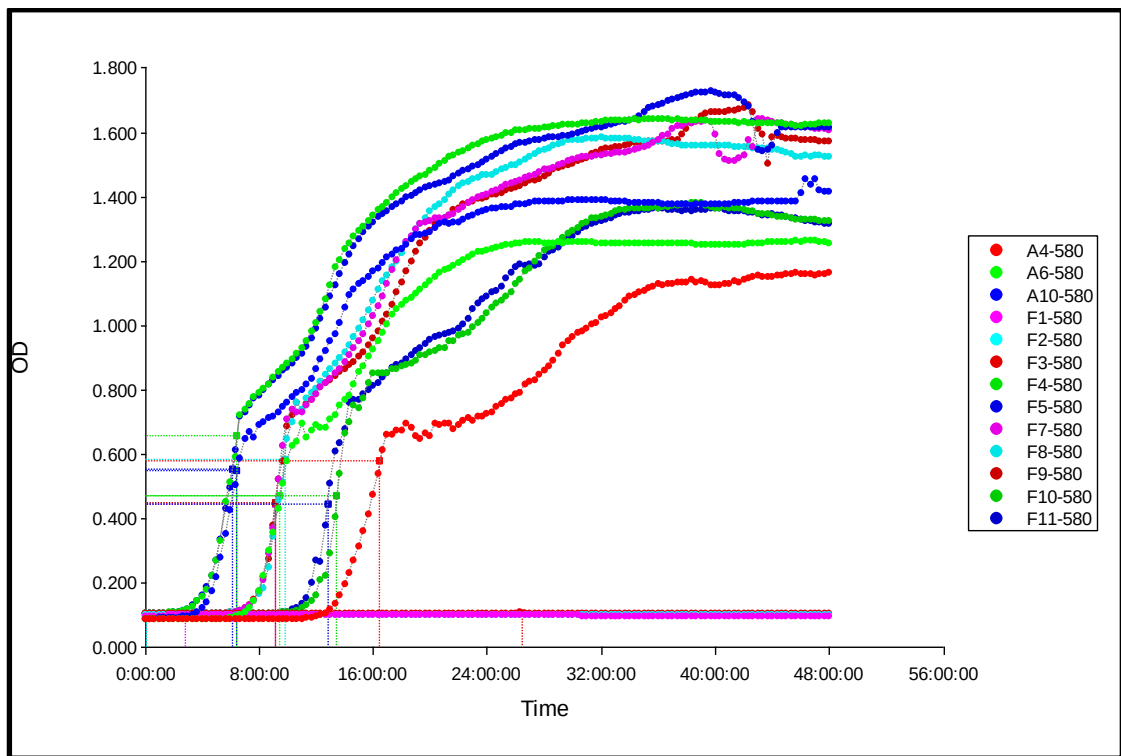
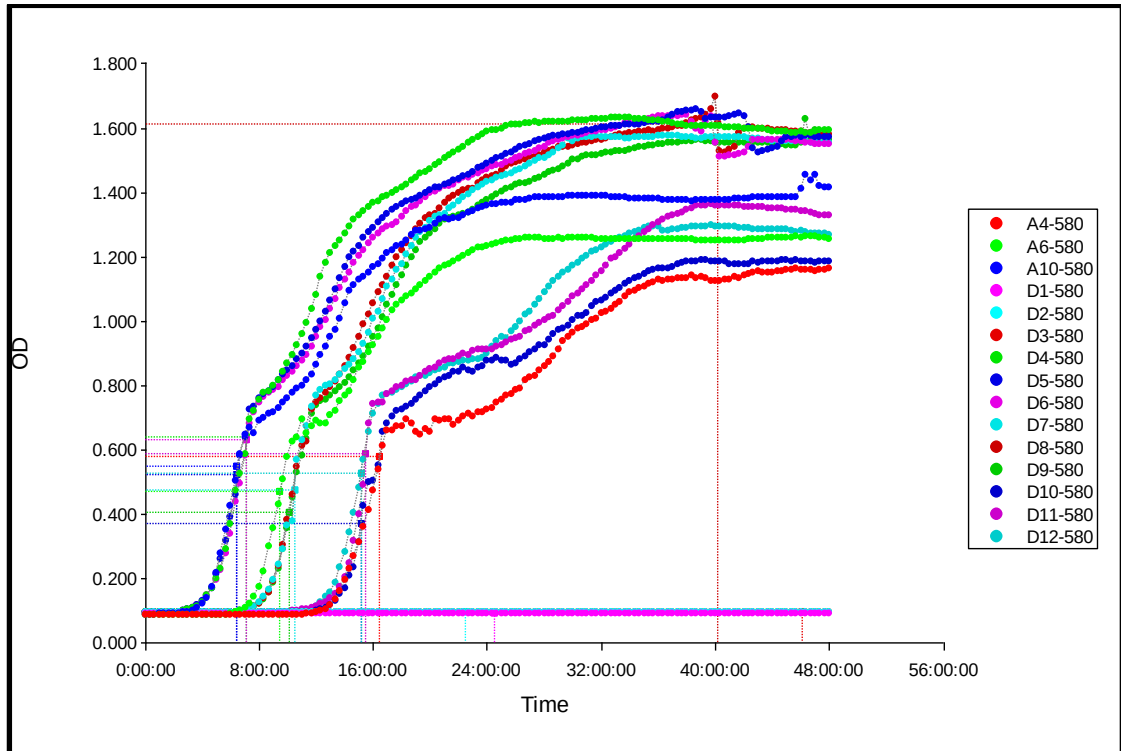
This thesis investigated the effect of liquid smoke suspensions against the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* Pirie NCTC 10527. The investigation was done using the method of absorbance or optical density at 600 nm (OD), A total of six (6) smoke suspensions (L9, G6, C3, D4, A1, and E5) were studied. The food industry and in particular the industry dealing with the production of smoked fish products makes extensive use of these smokes. The food industry and in particular the industry dealing with the production of smoked fish products makes extensive use of these tobaccos. All tobaccos were studied in liquid nutrient medium at three (3) different concentrations and against 3 different initial microbial populations of 10^3 , 10^5 , and 10^7 CFU/ml. After filling the microplates under aseptic conditions, they were placed in the Synergy HTX Multi-Model Microplate Reader for a period of forty-eight (48) hours at a temperature of 37°C. The results from the samples showed that D4 tobacco at a concentration of 1%v/v had the most satisfactory effect in reducing the population growth rate of 10^3 cfu/ml. Based on the results from this thesis we conclude that D4 tobacco could be characterized as an effective barrier against this pathogenic bacterium.

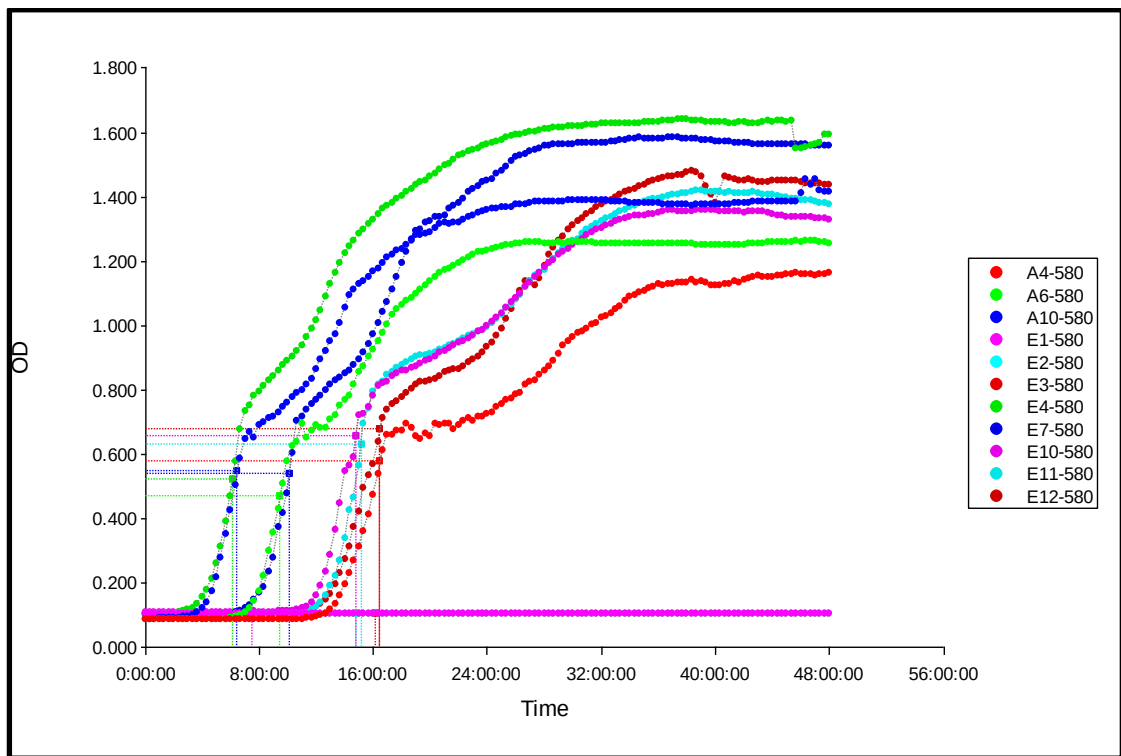
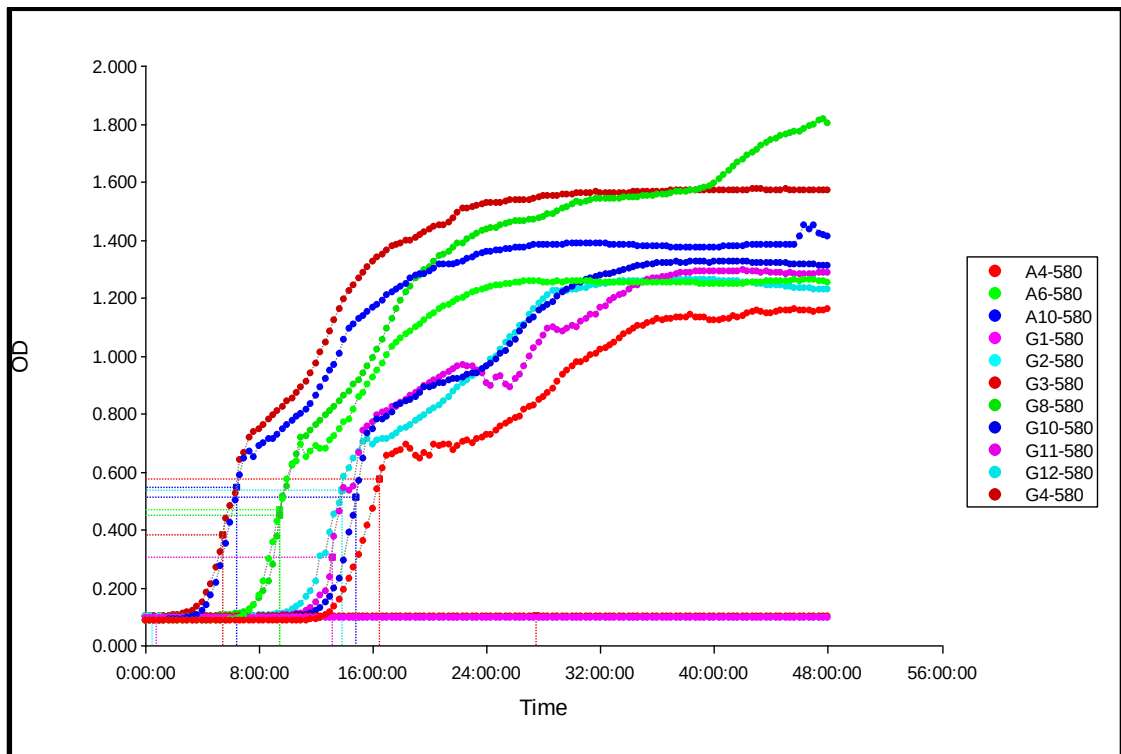
Keywords : smoking, liquid smoke, *Listeria monocytogenes*, optical density.

Παράρτημα

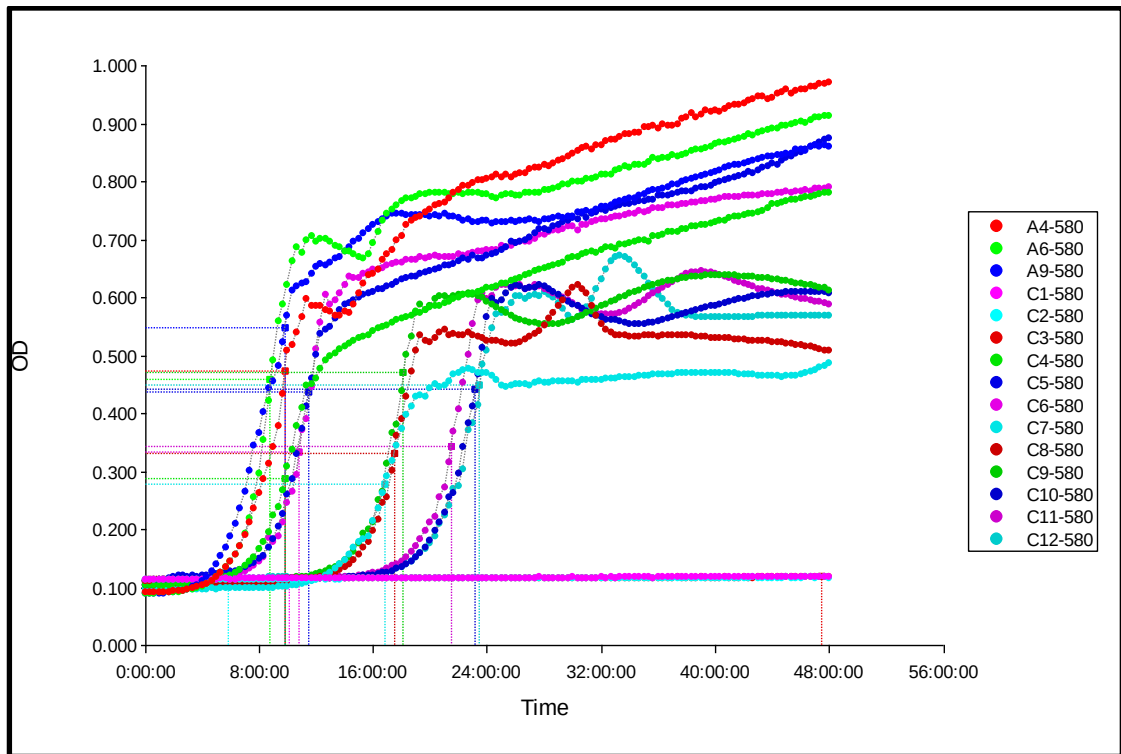
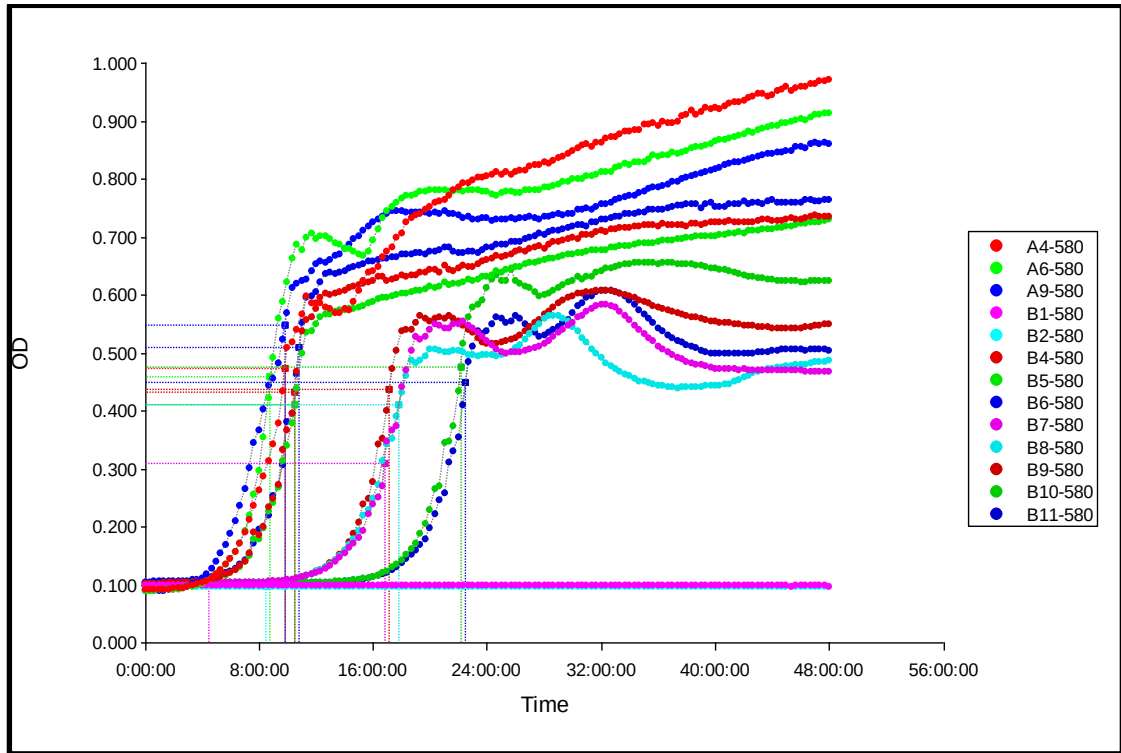
1^oPLATE

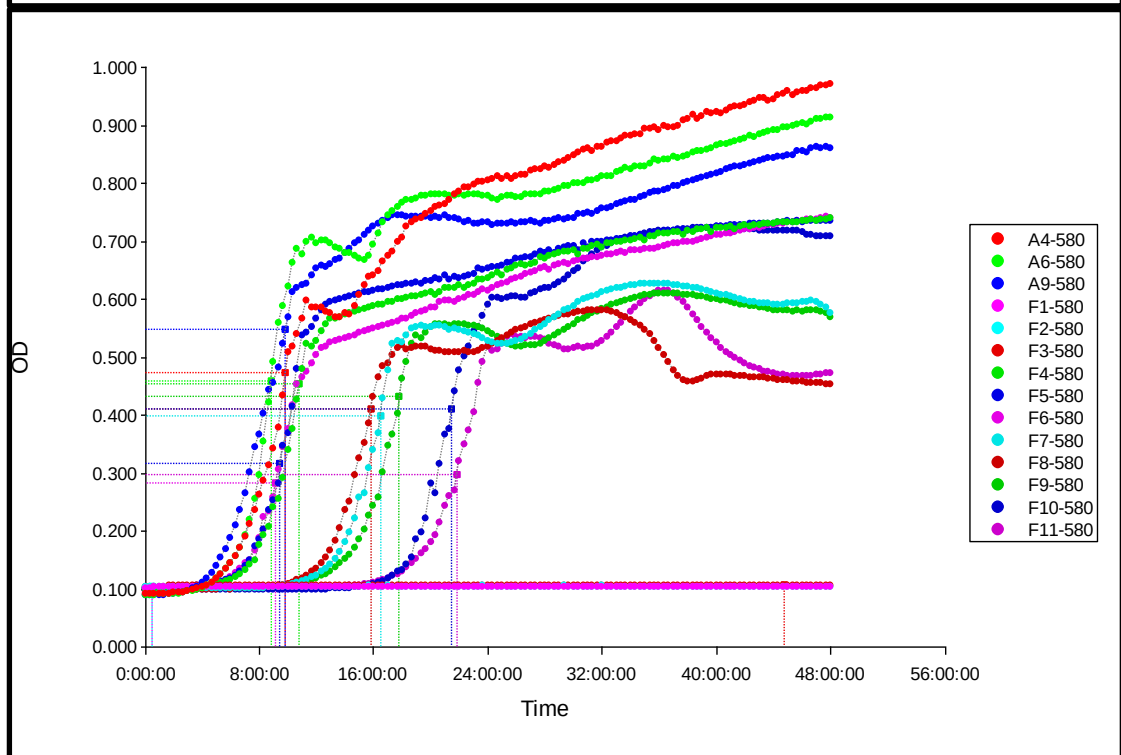
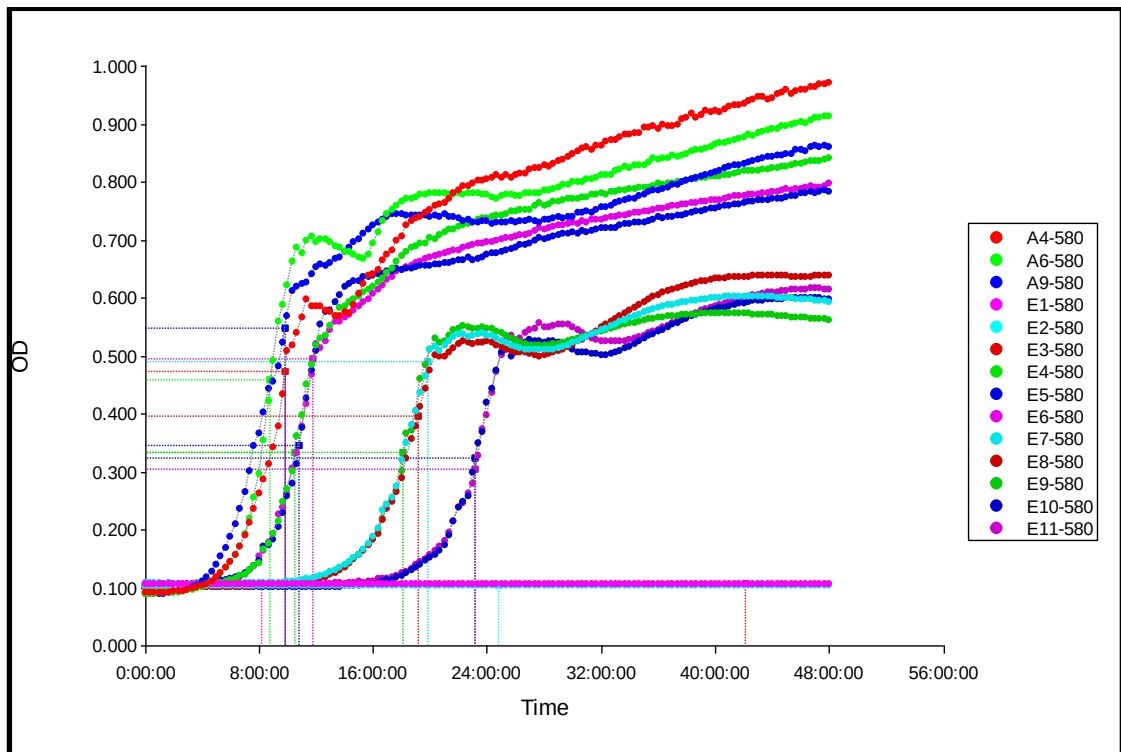


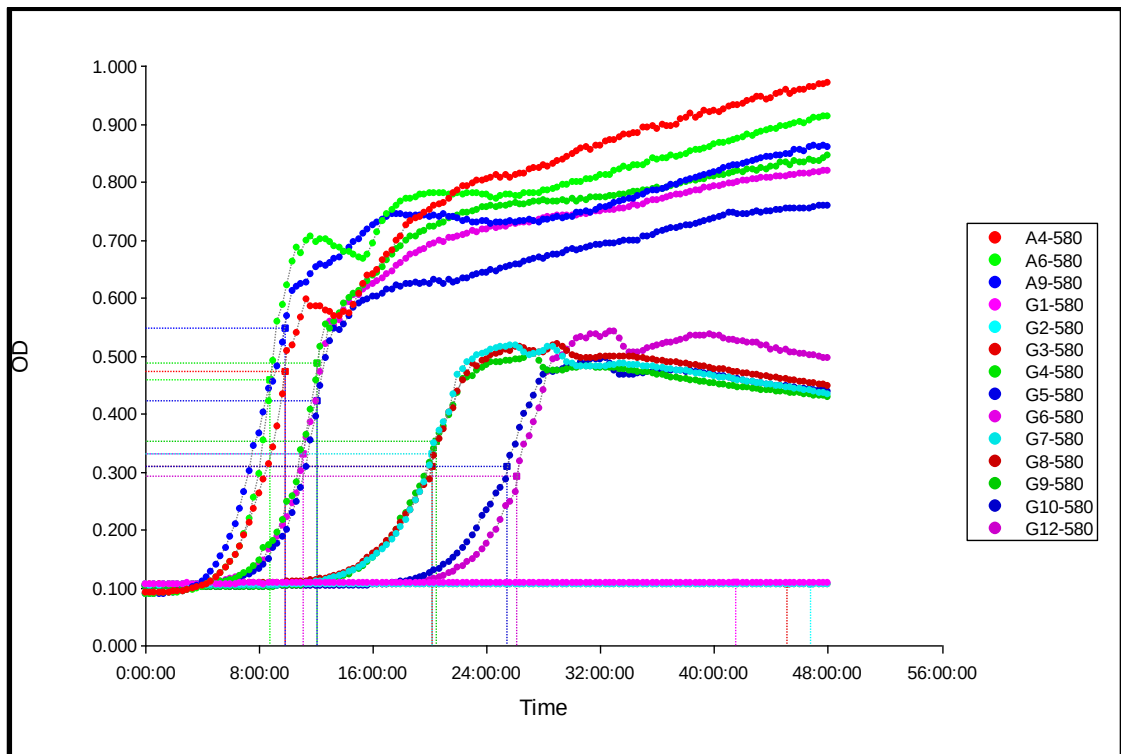




2o PLATE







3o PLATE

