



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην αύξηση του *Aeromonas*
hydrophila»**

Εμμανουήλ Α. Σκαρίμβας

ΒΟΛΟΣ 2020



«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην αύξηση του

***Aeromonas hydrophila*»**

«Effect of liquid smoke suspension on growth of

***Aeromonas hydrophila*»**

Στην οικογένειά μου,

Αριστοτέλη, Αναστασία, Κατερίνα,

που δεν σταμάτησαν να με στηρίζουν και να με συμβουλεύουν

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. **Ιωάννης Μποζιάρης.** Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,, **Επιβλέπων.**
2. **Γκολομάζου Ελένη,** Μέλος, Αναπλ. Καθηγήτρια Παν/μίου Θεσσαλίας
3. **Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη.** Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία είναι αποτέλεσμα προσπάθειας, μόχθου και αναζήτησης. Δεν θα έφτανε ποτέ όμως σε πέρας εάν δεν είχα την καθοδήγηση και την αगाστή συνεργασία με την εξαιρετική ομάδα του Εργαστηρίου Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων & Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου και επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη ο οποίος ήταν διαθέσιμος και υποστηρικτικός κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή η οποία με καθοδήγησε και μου συμπαραστάθηκε τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά από την αρχή μέχρι το τέλος. Ο ενθουσιασμός της και η αφοσίωσή της μου έδιναν δύναμη να συνεχίσω.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστώ στην υποψήφια διδάκτορα κα. Συροπούλου Φαίδρα για τη βοήθεια στο πειραματικό κομμάτι που ήταν άκρως σημαντική, άμεση, ανιδιοτελή, καταλυτική και πολύτιμη. Το αποτέλεσμα της εργασίας ανήκει στην κοινή μας προσπάθεια.

Περίληψη

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική εργασία έγινε διερεύνηση της επίδρασης και της αποτελεσματικότητας ελαιωρημάτων υγρών καπνών έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila* με την μέθοδο της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm χρησιμοποιώντας το Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader. Μελετήθηκαν έξι (6) καπνοί (L9, G6,C3, D4, A1 και E5) σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα στους 37°C για σαράντα οκτώ ώρες (48) και έναντι 3 διαφορετικών αρχικών μικροβιακών πληθυσμών της τάξεως των 10^3 , 10^5 και 10^7 CFU/ml., Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι ο καπνός L9 σε συγκέντρωση 0,9% v/v είχε τα καλύτερα αποτελέσματα στην μείωση του ρυθμού αύξησης, με την μέγιστη επίδραση έναντι του *Aeromonas hydrophila* στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό 10^3 CFU/ml. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ο καπνός L9 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο ελέγχου για την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου αυτού βακτηρίου.

Λέξεις-Κλειδιά: υγρή κάπνιση, *Aeromonas hydrophila*, οπτική πυκνότητα.

ΠΕΡΙΕΧΕΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1.	Γενικές έννοιες για την συντήρηση και την μεταποίηση αλιευμάτων.....	9
1.2.	Κάπνιση.....	10
1.2.1.	Ψυχρή κάπνιση.....	10
1.2.2.	Θερμή κάπνιση.....	11
1.2.3.	Υγρή κάπνιση.....	11
1.3.	Αλλοίωση και ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων	11
1.4.	Σύσταση καπνού.....	11
1.5.	Καπνιστά είδη.....	12
1.6.	Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων.....	12
1.7.	Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	15
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
2.1.	Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	15
2.2.	Θρεπτικό υπόστρωμα.....	15
2.3.	Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader.....	17
2.4.	Καπνοί.....	17
2.5.	Αναζωογόνηση στελέχους <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
2.6.	Πλήρωση των μικροπλακών.....	18
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
3.1.	Αποτελέσματα πρώτης (1 ^{ης}) μικροπλάκας.....	20
3.2.	Αποτελέσματα δεύτερης (2 ^{ης}) μικροπλάκας.....	24

3.3.	Αποτελέσματα τρίτης (3 ^{ης}) μικροπλάκας.....	28
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	33
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
7.	ABSTRACT.....	37
8.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	38

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές έννοιες για την ασφάλεια των αλιευτικών προϊόντων

Επεξεργασία τροφίμων ονομάζεται το σύνολο των διεργασιών μέσω των οποίων η πρωτογενής παραγωγή σε συνδυασμό ή όχι με άλλα συστατικά και με τη βοήθεια εργασίας, χρήσης κατάλληλου εξοπλισμού, επιστημονικής γνώσης και δαπάνη ενέργειας, μετατρέπεται σε νέα προϊόντα για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση, ή σε πρώτες ύλες για την παραγωγή άλλων προϊόντων. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες Βέβαια υπάρχει η πιθανότητα ύπαρξης χημικών ουσιών στα καπνιστά αλιεύματα πέρα από αυτές που περιέχει ο ιχθύς ως πρώτη ύλη. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) δημιουργούνται κατά την καύση των ξύλων σε θερμοκρασίες άνω των 400°C. Η συγκέντρωση των PAHs αυξάνονται αναλογικά κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης από τους 400°C έως τους 1000°C, για αυτό η θερμοκρασία παίζει καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό PAHs. Υπάρχουν διακόσια (200) είδη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων από τους οποίους ορισμένοι είναι καρκινογόνοι, όπως το βενζοαπυρένιο (Belichovska et al 2019). Σύμφωνα με τους Nithin (et al 2020) η χρήση του υγρού καπνού η οποία μελετήθηκε και από αυτούς παραδέχονται την σημαντικότητα της χρήσης των υγρών καπνών τόσο στα μειωμένα επίπεδα των κυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων(PAHs),όσο και στην διατήρηση της καλής ποιότητας, της γεύσης και της οσμής των καπνιστών προϊόντων.

1.2 Κάπνιση

Με τον όρο κάπνιση εννοείτε η συντήρηση προϊόντων μέσω της διαδικασίας αρχικά της ελαφριάς αλάτισης ή όχι και κατόπιν της κάπνισης. Με την κάπνιση τα προϊόντα αποκτούν ένα ιδιαίτερο άρωμα χρώμα και γεύση αλλά προσφέρει και σημαντικές αντιμικροβιακές δραστηριότητες. Η τεχνολογία της κάπνισης χωρίζεται σε ψυχρή, υγρή, θερμή (Μποζιάρης Ι 2021)

1.2.1 Ψυχρή κάπνιση

Το κρύο καπνιστό ψάρι έχει μοναδική γεύση και άρωμα και καταναλώνεται συχνά χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Παρασκευάζεται από φρέσκο, κατεψυγμένο ή παστό ψάρι. Τα κατεψυγμένα ψάρια ξεπαγώνουν στον αέρα, με βύθιση στο νερό ή με ψεκασμό νερού με χρήση ειδικού εξοπλισμού. Ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του ψαριού, παράγονται διάφορα τεμάχια ψαριών, αλλά τα μικρά ψάρια αφήνονται ολόκληρο. Μερικά μεγάλα ψάρια απλώς εκσπλαχνίζονται, ενώ άλλα εκσπλαχνίζονται, αποκεφαλίζονται και κόβονται, ανάλογα με τον σκοπό του τελικού προϊόντος (Быков, 1980). Πρόσφατα, παρατηρούνται τάσεις προς τη μέγιστη δυνατή κοπή όλων των ειδών ψαριών για την αύξηση της απόδοσης των βρώσιμων μερών, τη σύνθετη χρήση της πρώτης ύλης ψαριών, τη συντόμευση της διάρκειας των βασικών εργασιών (αλάτισμα, κάπνισμα) και την εφαρμογή μικρών συσκευασιών για αύξηση/βελτίωση των δυνατοτήτων εμπορίας. (Мезенова et al., 2001). Απαιτείται ελαφρύ στέγνωμα στον αέρα για να δημιουργηθεί ένα επιθυμητό χρώμα στην επιφάνεια του κρύου καπνιστού ψαριού. Το κρύο κάπνισμα διεξάγεται σε θερμοκρασία 18–24°C και υγρασία 40–60%.

1.2.2 Θερμή κάπνιση

Στην θερμή κάπνιση είναι μια διαδικασία παστερίωσης, η συντηρητική επίδραση της οποίας εξαρτάται από την σύνθεση και την προετοιμασία της πρώτης ύλης, τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία, την πυκνότητα και τη σύνθεση του καπνού καθώς και τον χρόνο καπνίσματος (Doe, 1998, Kolodziejska et al., 2002)

1.2.2 Υγρή κάπνιση

Ο υγρός καπνός ή η αιθάλη είναι ένα φυσικό προϊόν που αποτελείται από συμπύκνωμα καπνού που χρησιμοποιείται για να προσδώσει μια καπνιστή γεύση χωρίς να καταφύγει στην παραδοσιακή τεχνική καπνίσματος: είναι πρακτικό στη χρήση με μειωμένο χρόνο και κόστος, εύκολο στη δόση, μπορεί να ελέγχει την παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών (PAH) και, κυρίως, με μειωμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, σε αντίθεση με τα παραδοσιακά συστήματα καπνίσματος. Μπορεί να εφαρμοστεί στην επιφάνεια των προϊόντων με τρεις τρόπους: με εμβάπτιση, ψεκασμό και υδρονέφωση (Gómez-Estaca et al., 2011).

1.3 Αλλοίωση και ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων.

Αλλοίωση ενός τροφίμου εννοούμε τη μείωση της ποιότητας του όσον αφορά κυρίως τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή κτλ). Ένα τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο όταν έχουν πραγματοποιηθεί αλλαγές σε αυτό οι οποίες το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Η αλλοίωση μπορεί να προέλθει από μικροβιακή δράση, χημικές δράσεις, δράση ενδογενών ενζύμων, του τροφίμου, προσβολή από έντομα ή τρωκτικά, κ.α. (Huis in't Veld, 1996).

1.4 Σύσταση καπνού



Ο άνθρωπος από την λίθινη εποχή χρησιμοποιούσε το κάπνισμα ως τρόπο παρασκευής ψαριών και κρέατος (Adeyeye,2016). Στο αλατισμένο προϊόν το κάπνισμα αντιπροσωπεύει το σύνολο το διεργασιών είτε είναι χημικών, θερμικών, διαχυτικών και βιοχημικών. Εκτός αυτού ο καπνός εμπεριέχει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Η σύσταση του καπνού εξαρτάται από το είδος του ξύλου, τις φυσικές του ιδιότητες, τη χημική του σύνθεση και την θερμοκρασία καύσεως. Είδη ξύλου όπως η βελανιδιά, η οξεία, η καρυδιά μαζί με την προσθήκη κάποιων αρωματικών φυτών όπως δάφνη και το θυμάρι αποφέρουν καλύτερα αποτελέσματα στην κάπνιση. Όμως υπάρχουν είδη ξύλου όπως τα ρητινοφόρα δέντρα που περιέχουν ποσότητες ρητινών και προσδίνουν μια δυσάρεστη γεύση οσμή και ευθύνονται για το σκούρο χρώμα στα ψάρια (Belichovska et al 2019).

1.5 Καπνιστά είδη

Η τεχνική του καπνίσματος είναι μια διάσημη μέθοδος που χρησιμοποιείται ανά τον κόσμο από τα αρχαία χρόνια για την συντήρηση των τροφίμων τους. Οι κυριότερες οικογένειες αλιευμάτων που χρησιμοποιούνται είναι οι Σολομονίδες (Salomonidae), κλουπείδες (Clupeidae), οι Σκομβρίδες (Scombridae), οι μερλουκίδες (Merluccidae).

1.6 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Σύμφωνα με τον Huss (1997) στην λίστα των τροφίμων που προκαλούν διάφορες ασθένειες τα ψάρια και τα θαλασσινά βρίσκονται αρκετά ψηλά. Διάφορα βακτήρια και παθογόνοι μικροοργανισμοί συναντώνται σε ψάρια και θαλασσινά (Davies et

al.,2001,Hosseini et al.,2004). Παθογόνοι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται συνήθως στα καπνιστά αλιεύματα αναλύονται παρακάτω.

Listeria monocytogenes

Είναι αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος, μη σπορογόνο, θετικό Gram βακτήριο και είναι ευρέως γνωστό στην βιομηχανία των τροφίμων για την πρόκληση τροφοδηλητηρίασης. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες +1 έως +45 °C όμως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι +30 έως + 37 °C ενώ έχει την ικανότητα να επιβιώσει σε ακραίες συνθήκες όπως το χαμηλό pH ή την υψηλή αλατότητα (Economou et al 2013) . Ο *L.monocytogenes* στον τομέα της αλιείας προκαλεί έντονη ανησυχία γιατί έχουν εμφανιστεί πολλά κρούσματα λιστερίωσης στα θαλασσινά είδη (Ericsson et al. 1997).Ο *L.monocytogenes* εμφανίζεται σε επιφανειακά ύδατα και σε λίμνες (Dijkstra 1982) και στα παράκτια ύδατα (Colburn et al. 1990). Σύμφωνα με τον FDA θέτει ως προαπαιτούμενο την απουσία του *Listeria monocytogenes* στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, συνεπώς και οι περισσότερες χώρες και οργανισμοί απαιτούν την απουσία της στα 25 g δείγματος. Συνεπώς καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα αλιευτικά προϊόντα που είναι έτοιμα προς κατανάλωση είναι απαγορευτικό να έχουν *Listeria monocytogenes* ανά 25 g σε όλη την διάρκεια της ζωής τους Lin H. et al 2008). Τα καπνιστά αλιεύματα φέρουν ένα συγκεκριμένο ρίσκο λιστερίωσης, ειδικότερα τα καπνιστά προϊόντα κάπνισης υπό ψύξη (Ericsson et al 1997). Στα καπνισμένα ψάρια τα επίπεδα μόλυνσης από *Listeria monocytogenes* είναι αρκετά χαμηλά ($<10^2$ cfug⁻¹), αλλά μπορεί να περιέχουν βιώσιμο αριθμό βακτηρίων που κυμαίνονται από 10^4 έως 10^6 cfug⁻¹ (Gombas et al 2003).

Clostridium botulinum

Το *Clostridium botulinum* είναι αυστηρά αναερόβιο βακτήριο, θετικό κατά Gram και σχηματίζουν σπόρια σε σχήμα ράβδου.(Stackebrandt and Rainey, 1997). Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του *Clostridium botulinum* είναι κυρίως η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση σε NaCl, τα νιτρώδη άλατα, η σύνθεση και μικροχλωρίδα των τροφίμων και την ενεργότητα του νερού. Συναντάται στο θαλάσσιο περιβάλλον σε πολλά μέρη του σώματος των ψαριών και σε ιζήματα. Το παθογόνο αυτό βακτήριο παράγει οκτώ (8) αντιγονικά διακριτές εξωτοξίνες (A, B, C1, C2, D, E, F,G). Ο τύπος A είναι η πιο ισχυρή τοξίνη, ακολουθώντας ο τύπος B και F. Οι τύποι A, B και E συσχετίζονται συνήθως με αλλαντίαση στον άνθρωπο με τον τύπο E να είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος σε θαλάσσια οικοσυστήματα και ψάρια, στα οποία βρίσκεται γενικά σε χαμηλά επίπεδα (Nigam and Nigam 2010, Huss 1980, Hielm et al 1998).

Aeromonas hydrophila

Το *Aeromonas hydrophila* στο περιβάλλον είναι διαδεδομένο ως ένα αναδυόμενο υδρόβιο παθογόνο. Το *Aeromonas hydrophila* ανήκει στο γένος *Aeromonas* της οικογένειας Aeromonadaceae και αποτελεί ένα από τα 14 διαφορετικά είδη σύμφωνα με τους Joseph και Carnahan (2000). Έχει προσελκύσει την προσοχή λόγω της ικανότητας του να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Θεωρήθηκε για πρώτη φορά ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες της ανθρώπινης γαστρεντερίτιδας πριν από περισσότερα από 30 χρόνια (Lautrop, 1961). Είναι προαιρετικά αναερόβιο, αρνητικό κατά Gram και δεν σχηματίζει σπόρια σε σχήμα ράβδου.(Roberts, Baird-Parker, Tompkin, 1996). Σύμφωνα με τον Palumbo(1996) το *Aeromonas hydrophila* έχει απομονωθεί μέσα από διάφορες τροφές φυτικές και ζωικές όπως το κόκκινο ωμό κρέας, διάφορα θαλασσινά, γαλακτοκομικά και των λαχανικών.

1.7 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης έξι διαφορετικών καπνών, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων στις κινητικές παραμέτρους του παθογόνου μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκαν 6 καπνοί σε 3 διαφορετικές 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml συγκεντρώσεις ο καθένας, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του στελέχους *Aeromonas hydrophila*. Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν μηχανήματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας, στο οποίο οι μεταβολές στις τιμές της οπτικής πυκνότητας έδωσαν την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού για κάθε συγκέντρωση καπνού.

2.2 Θρεπτικό υπόστρωμα

Tryptone Soy Broth (TSB)

Το TSB είναι ένα υγρό θρεπτικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των καλλιεργήσιμων σε εργαστηριακά υλικά μικροοργανισμών. Επίσης είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων μικροοργανισμών. Περιέχει πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας που παρέχουν άζωτο, καθώς βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το NaCl χρησιμεύει ως ρυθμιστής ωσμωτικής πίεσης.

Διαδικασία παρασκευής: Σε μια φιάλη ζυγίσθηκαν και προστέθηκαν 37gr θρεπτικού TSB και συγκεντρώσεις καπνού και στην συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000ml απιονισμένου νερού. Με την βοήθεια ειδικού διανομέα προστέθηκαν 10ml σε σωληνάκια και αποστειρώθηκαν στους 121°C/15min

Maximum Recovery Diluent (MRD).

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

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίσθηκαν και προστεθήκαν 8,5g NaCl + 1g peptone και στην συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Με τη βοήθεια ειδικού διανομέα

προστέθηκαν 9 ml MRD σε σωληνάκια (δοκιμαστικούς σωλήνες) και αποστειρώθηκαν στους 121°C /15min

2.3 Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader

Η συσκευή Reader είναι ένας αυτοματοποιημένος μετρητής οπτικής πυκνότητας. Η λήψη μετρήσεων απορρόφησης γινόταν στα 580 nm, για 20 λεπτά, στους 37°C κάθε 48 ώρες. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Gen5 Data Analysis Software.

2.4 Καπνοί

Όπως αναφερθήκαμε και παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν 6 καπνοί σε 3 διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση τους στην ανάπτυξη του *Aeromonas hydrophila* σε TSB. Οι τελικές συγκεντρώσεις τους στο TSB παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 1) :

Πίνακας 1. Τελικές συγκεντρώσεις υγρών καπνών που χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση τους στην ανάπτυξη του *Aeromonas hydrophila* σε TSB με την μέθοδο της οπτικής πυκνότητας.

ΚΑΠΝΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (% v/v)		
L9	0,05%	0,1%	0,15%
G6	0,1%	0,2%	0,35%
C3	0,9%	0,75%	1%
D4	0,5%	0,75%	1%

A1	0,6%	0,8%	1%
E5	0,6%	0,9%	1,2%

2.5 Αναζωογόνηση στελέχους *Aeromonas hydrophila*.

Για την διεξαγωγή του πειράματος έγινε αναζωογόνηση του στελέχους *Aeromonas hydrophila* από τους -80°C που φυλασσόταν σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης. Αφού έγινε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 5000 rpm για διάρκεια 12 λεπτών, προκειμένου να ληφθεί βακτηριακό ίζημα. Έπειτα λήφθηκε ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10 ml MRD και από εκεί έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 ml MRD. Χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε στο TSB οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν, 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml ανάλογα την περίπτωση.

2.6 Πλήρωση των μικροπλάκων.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) microplates 96 θέσεων στο καθένα εντός θάλαμο νηματικής ροής, σε κάθε σειρά βοθρίων της μικροπλάκας γινόταν προσθήκη 180 µl υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB που περιείχε και τον καπνό στην επιθυμητή κάθε φορά συγκέντρωση ώστε στον τελικό όγκο των 200 µl να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον Πίνακα 1. Κατόπιν προστέθηκαν με 20 µl από την κατάλληλη αραιώση ώστε ο τελικός βακτηριακός πληθυσμός να είναι 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml ανάλογα την περίπτωση. Σε μια σειρά της μικροπλάκας προστέθηκαν 180 µl TSB χωρίς καπνό και 20 µl των διαφορετικών πληθυσμών του μικροοργανισμού, τα

οποία αποτέλεσαν και τους μάρτυρες. Στην συνέχεια οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν στο Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader. Από την ανάλυση των καμπυλών αύξησης υπολογίσθηκε ο μέγιστος ρυθμός αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού, αλλά και η διάρκεια της φάσης προσαρμογής.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έδειξε την επίδραση του καπνού στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila*. Ο κάθε καπνός είχε την δική του επίδραση και η δράση διέφερε ανάλογα με τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό.

Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακες (Πιν 3.1., 3.2. και 3.3.) οι επιδράσεις των καπνών στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ($\mu_{\max}$) και στον χρόνο προσαρμογής (Lagtime) για κάθε microplate καθώς επίσης και τα διαγράμματα για τους καπνούς και τις συγκεντρώσεις των καπνών : α) L9 0,1%, β) G6 0,1%, γ) C3 0,75% , δ) D4 1% , ε) A1 1% , ζ) E5 1,2%.

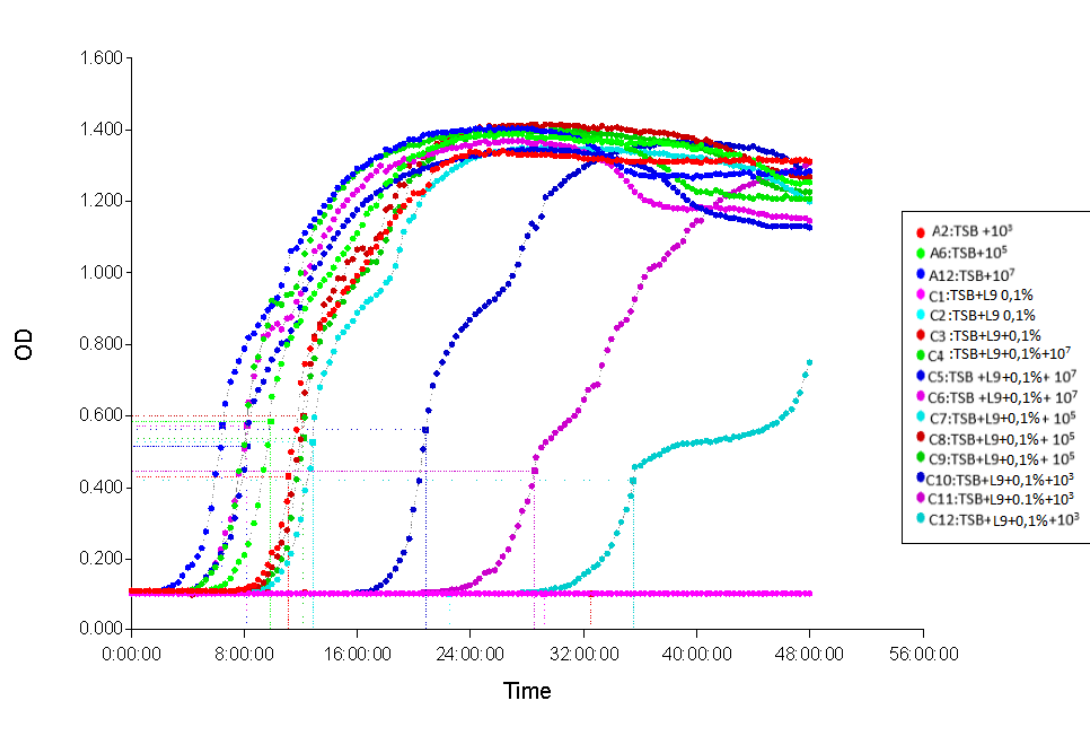
3.1 Αποτελέσματα πρώτης (1ης) μικροπλάκας

Όλες οι μετρήσεις της πρώτης μικροπλάκας συνοψίζονται στο 3.1 πίνακα. Παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι μετρήσεις και τα διαγράμματα κάθε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο L9 και ο G6 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Στα διαγράμματα που επιλέχθηκαν L9 0,1% και G6 0,1% γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

Πίνακας 3.1 : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής **Lagtime (h)** του *Aeromonas hydrophila* σε TSB σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών. Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

καπνός	συγκέντρωση (% v/v)	αρχικός μικροβιακός πληθυσμός CFU/ml	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	LAGTIME (h)
0.0% v/v (μάρτυρες)		10^7	6,88	8,23
		10^5	6,78	6,40
		10^3	6,31	3,16
L9	0,05	10^7	6,30	25,3

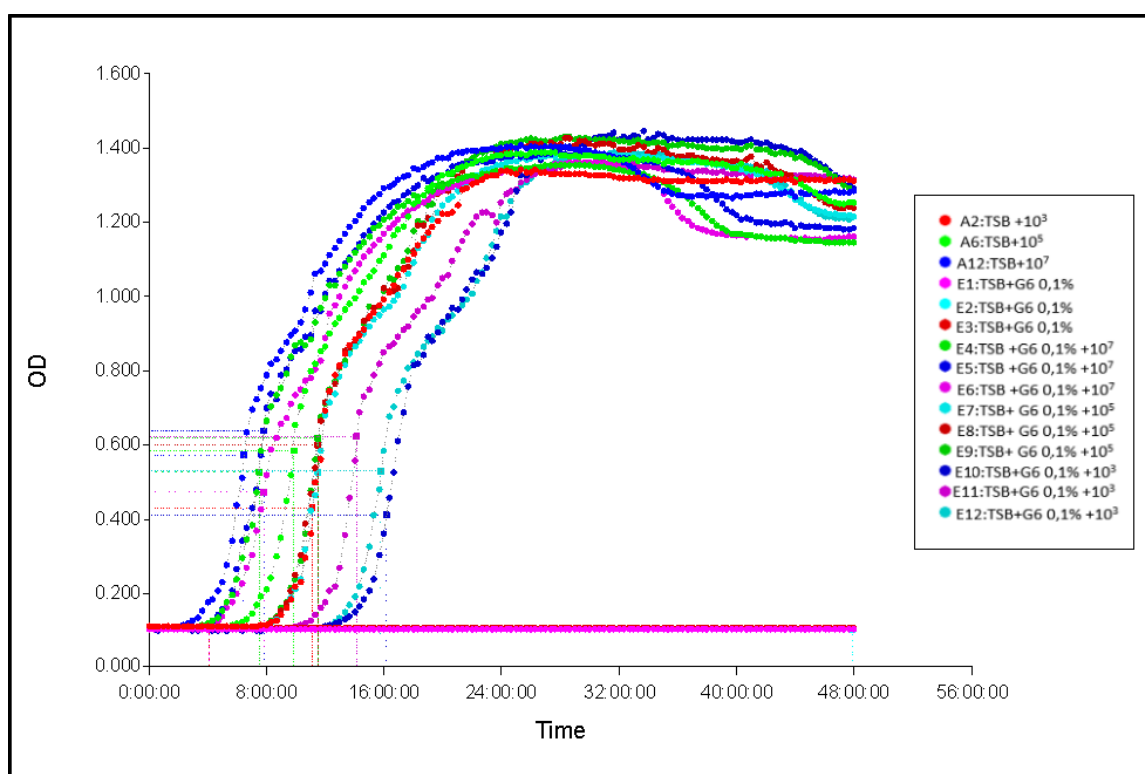
		10^5	5,15	16,5
		10^3	5,90	23,7
	0,10	10^7	6,29	4,97
		10^5	6,54	10,01
		10^3	4,60	23,6
	0,15	10^7	5,40	105,5
		10^5	6,70	8,52
		10^3	5,24	11,4
	G6	0,10	10^7	5,53
			10^5	6,07
			10^3	5,49
		0,20	10^7	7,07
			10^5	4,43
			10^3	4,70
		0,35	10^7	4,80
			10^5	5,80
			10^3	5,60



Σχήμα 3.1.1 : Επίδραση του καπνού L9 συγκέντρωσης 0,1% έναντι του *Aeromonas hydrophila* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 30 °C.

Αρχικά παρατηρούμε ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός *Aeromonas hydrophila* μετά από την επίδραση του καπνού L9 0,1% με αρχικό πληθυσμό 10^7 CFU/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,97 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $6,29 \text{ h}^{-1}$. Στην ίδια συγκέντρωση 10^7 CFU/ml ο μάρτυρας χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 8,23 ώρες σχεδόν διπλάσιος από αυτόν ύστερα από την επίδραση του καπνού L9 0,1% της ίδιας συγκέντρωσης, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν παρόμοιος $6,88 \text{ h}^{-1}$. Για τον αρχικό πληθυσμό 10^5 CFU/ml ύστερα από την επίδραση του καπνού L9 0,1% ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν 10,01 ώρες και ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τον μάρτυρα της ίδιας συγκέντρωσης 10^5 CFU/ml ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν σχετικά

παρόμοιος $6,54 \text{ h}^{-1}$ με αυτόν του μάρτυρα $6,78 \text{ h}^{-1}$. Στον αρχικό πληθυσμό 10^3 CFU/ml ύστερα από την επίδραση του καπνού L9 0,1% ο μέσος χρόνος προσαρμογής είναι πολύ μεγαλύτερος 23,6 ώρες σε σχέση με τον μάρτυρα (3,16) της ίδιας συγκέντρωσης ενώ ο μέγιστος ειδικός αριθμός είναι αισθητά μικρότερος $4,6 \text{ h}^{-1}$ σε σχέση με τον μάρτυρα $6,31 \text{ h}^{-1}$.



Σχήμα 3.1.2 : Επίδραση του καπνού G6 συγκέντρωσης 0,1% έναντι του *Aeromonas hydrophila* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 30°C

Αρχικά στον αρχικό πληθυσμό 10^7 CFU/ml για τον καπνό G6 0,1% χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,40 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $5,53 \text{ h}^{-1}$. Στην ίδια συγκέντρωση 10^7 Cfu/ml ο μάρτυρας χρειάστηκε μέσο χρόνο

προσαρμογής 8,23 ώρες διπλάσιος από αυτόν ύστερα από την επίδραση του καπνού G6 0,1% ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ήταν σχεδόν παρόμοιος 6,88 h⁻¹. Για τον αρχικό πληθυσμό 10⁵ CFU/ml παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν (8,18 ώρες) , ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν (6,07 h⁻¹). Στην συγκέντρωση 10⁵ CFU/ml ο μάρτυρας χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 10,1 ώρες σχεδόν παρόμοιος με αυτόν ύστερα από την επίδραση του καπνού G6 0,1% ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης 6,78 h⁻¹. Στον αρχικό πληθυσμό 10³ CFU/ml η παρουσία του καπνού ήταν καθοριστική καθώς ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν μεγαλύτερος (11,8 ώρες) ύστερα από την επίδραση του καπνού σε σχέση με τον μάρτυρα 3,16 ώρες στην ίδια συγκέντρωση ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ήταν μικρότερος 5,49 h⁻¹, σε σχέση με τον μάρτυρα 6,31 h⁻¹.

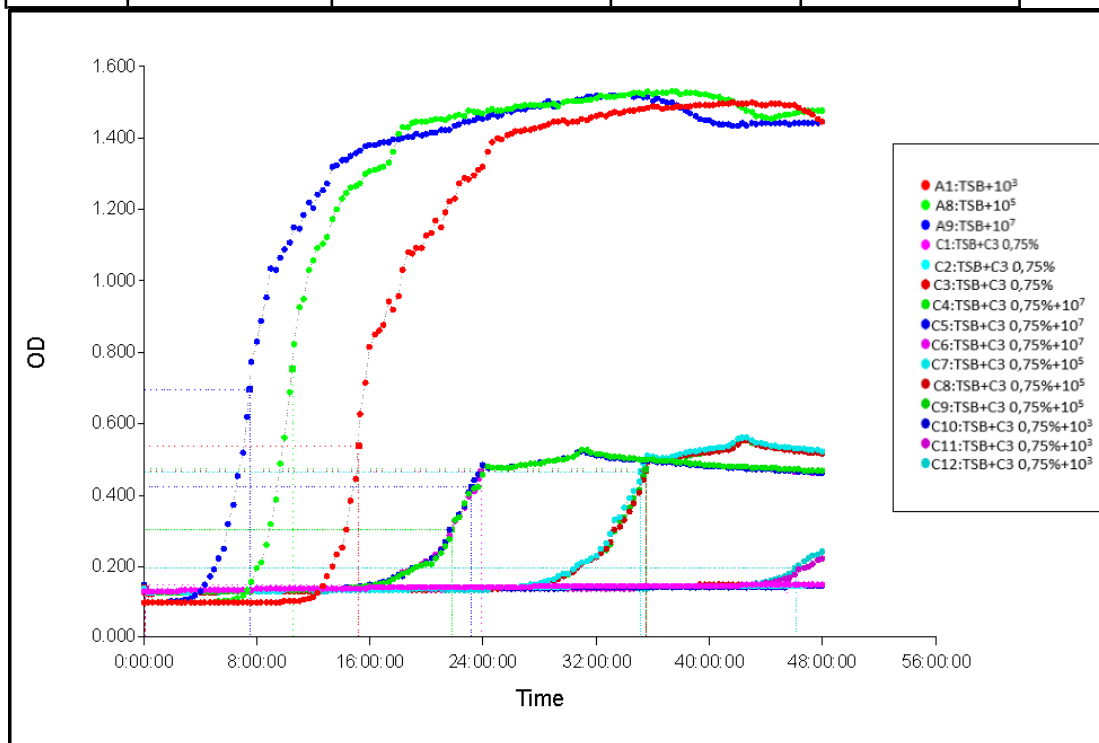
3.2 Αποτελέσματα δεύτερης (2ης) μικροπλάκας.

Αρχικά όλες οι μετρήσεις συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι μετρήσεις και τα διαγράμματα κάθε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο C3 και ο D4 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Στα διαγράμματα που επιλέχθηκαν C3 0,75% και D4 1% γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

Πίνακας 3.2: Σύνοψη 2ης μικροπλάκας : Ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $\mu_{max}(h^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής **Lagtime (h)** του *Aeromonas hydrophila* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών. Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

καπνός	συγκέντρωση (% v/v)	αρχικός μικροβιακός πληθυσμός CFU/ml	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	LAGTIME (h)
0.0% v/v (μάρτυρες)		10 ⁷	9,05	12,21
		10 ⁵	6,75	6,53
		10 ³	7,73	4,12
C3	0,9	10 ⁷	2,12	15,55
		10 ⁵	2,50	25,36
		10 ³	4,80	38,71
	0,75	10 ⁷	2,14	17,70
		10 ⁵	2,40	29,04
		10 ³	0,70	45,1
	1	10 ⁷	5,74	9,94
		10 ⁵	1,55	29,2
		10 ³	0,30	48,01
D4	0,5	10 ⁷	4,85	2,86
		10 ⁵	4,79	3,81
		10 ³	3,87	4,44
	0,75	10 ⁷	4,07	5,74
		10 ⁵	4,80	15,62
		10 ³	2,80	25,51

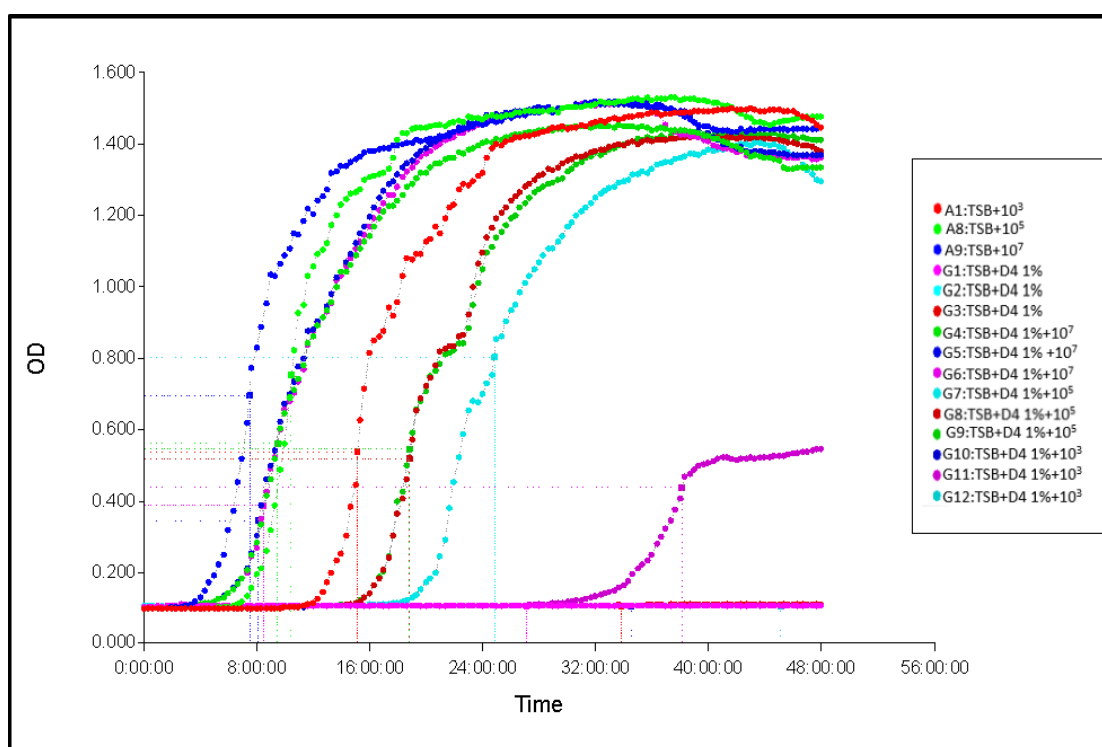
	1	10^7	4,16	4,42
		10^5	5,16	16,48
		10^3	2,95	30,28



Σχήμα 3.2.1 : Επίδραση του καπνού C3 0,75% έναντι του *Aeromonas hydrophila* μετά από ενοφθαλμισμό σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 3 °C.

Αρχικά παρατηρούμε για τον καπνό C3 0,75% ότι στον αρχικό πληθυσμό 10^7 CFU/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 17,7 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $2,14 \text{ h}^{-1}$. Στην συγκέντρωση 10^7 CFU/ml ο μάρτυρας χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 12,21 ώρες ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν πολύ μεγαλύτερος $9,05 \text{ h}^{-1}$ από αυτόν ύστερα από την επίδραση του καπνού. Για τον αρχικό πληθυσμό 10^5 CFU/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής είναι μεγαλύτερος (29,04 ώρες) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν σχεδόν παρόμοιος $2,40 \text{ h}^{-1}$. Στην ίδια συγκέντρωση ο μάρτυρας είχε μέσο χρόνο προσαρμογής 12,21 ώρες και ήταν πολύ

μικρότερος από αυτόμ ύστερα από την επίδραση του καπνού ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης $9,05 \text{ h}^{-1}$ ήταν πολύ μεγαλύτερος. Τέλος η επίδραση του καπνού ήταν καθοριστική στον αρχικό πληθυσμό 10^3 CFU/ml καθώς ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν μεγαλύτερος (45,1 ώρες), ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν αρκετά μικρότερος $0,7 \text{ h}^{-1}$ σε σχέση με τον μάρτυρα στην ίδια συγκέντρωση καθώς ο μέγιστος ειδικός αριθμός ήταν $9,05 \text{ h}^{-1}$ και ο μέσος χρόνος προσαρμογής 12,21.



Σχήμα 3.2.2: Επίδραση του καπνού D4 1% έναντι του *Aeromonas hydrophila* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 30°C .

Αρχικά για τον καπνό D4 1% στον πληθυσμό 10^7 CFU/ml παρατηρούμε ότι χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,42 ώρες μικρότερο σε σχέση με τον μάρτυρα 12,21 ώρες

στην ίδια συγκέντρωση, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν $4,16 \text{ h}^{-1}$ επίσης μικρότερο από αυτόν του μάρτυρα $9,05 \text{ h}^{-1}$. Στον αρχικό πληθυσμό 10^5 CFU/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής μεγαλύτερος ($16,48$ ώρες) σε σχέση με τον μάρτυρα μας στην συγκέντρωση αυτή $6,53$ ώρες αλλά ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν ελάχιστα μικρότερος $5,16 \text{ h}^{-1}$ από αυτόν του μάρτυρα $6,75 \text{ h}^{-1}$. Στον αρχικό πληθυσμό 10^3 CFU/ml ήταν αισθητή η επίδραση του καπνού καθώς ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν πολύ μεγαλύτερος $30,28$ ώρες, σε σχέση με τον μάρτυρα $4,12$ ώρες ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος $2,95 \text{ h}^{-1}$ σε σχέση με του μάρτυρα $7,73 \text{ h}^{-1}$.

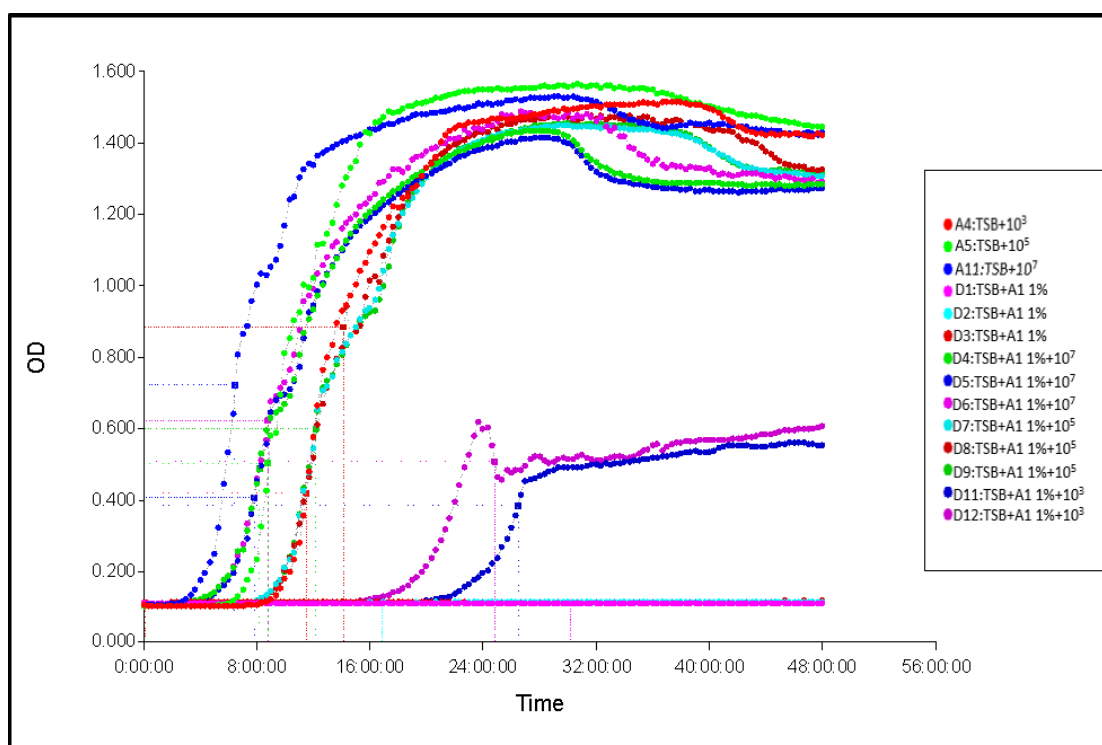
3.3 Αποτελέσματα τρίτης (3ης) μικροπλάκας.

Όλες οι μετρήσεις συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι μετρήσεις και τα διαγράμματα κάθε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι A1 και E5 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Στα διαγράμματα που επιλέχθηκαν A1 1% και E5 1,2% γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

Πίνακας 3.3: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ και διάρκεια χρόνου προσαρμογής $\text{Lagtime}(\text{h})$ του *Aeromonas hydrophila* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών. Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

καπνός	συγκέντρωση (% v/v)	αρχικός μικροβιακός πληθυσμός CFU/ml	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	LAGTIME (h)
0.0% v/v (μάρτυρες)		10 ⁷	6,13	8,39
		10 ⁵	7,88	5,59
		10 ³	8,24	3,15
A1	0,6	10 ⁷	7,50	4,65
		10 ⁵	5,30	8,09
		10 ³	5,72	13,87
	0,8	10 ⁷	5,79	4,57
		10 ⁵	4,84	8,23
		10 ³	4,92	14,2
	1	10 ⁷	4,79	4,91
		10 ⁵	5,41	8,71
		10 ³	2,81	18,60
E5	0,6	10 ⁷	5,45	4,95
		10 ⁵	5,53	9,36
		10 ³	2,99	21,9
	0,9	10 ⁷	5,51	3,53

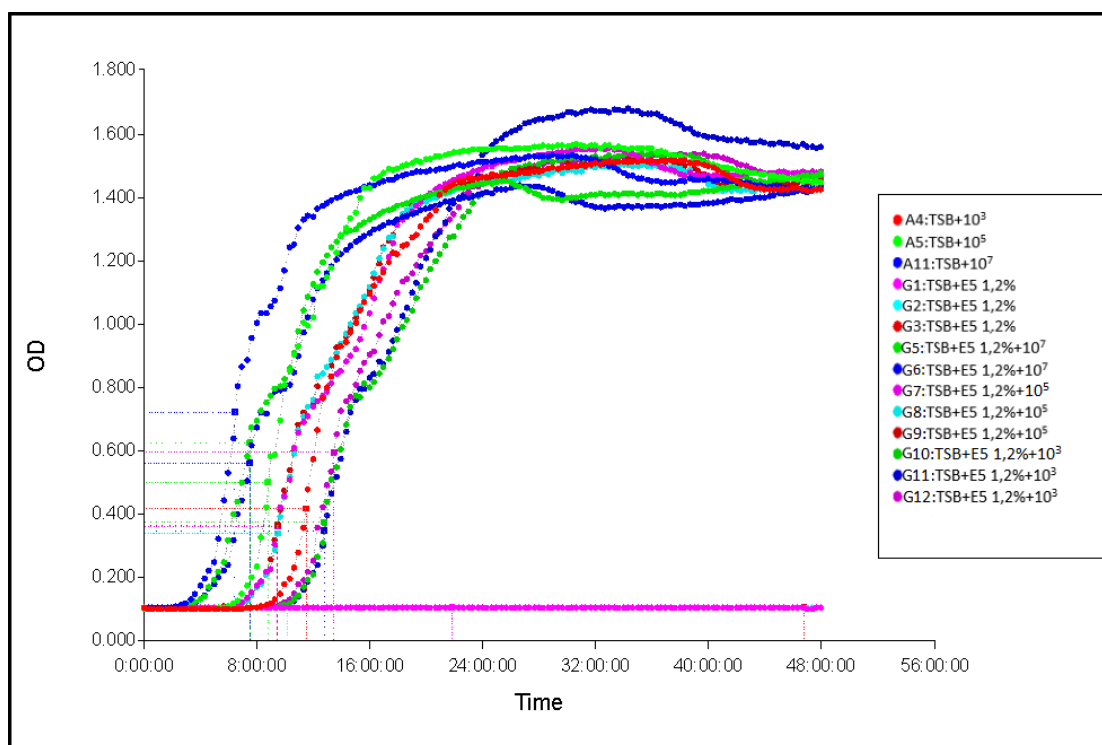
		10^5	4,96	5,43
		10^3	6,57	8.62
	1,2	10^7	5,04	4,08
		10^5	5,27	6,71
		10^3	6,06	10,01



Σχήμα 3.3.1: Επίδραση του καπνού A1 1% έναντι του *Aeromonas hydrophila* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 30 °C.

Αρχικά για τον καπνό A1 1% στον πληθυσμό 10^7 CFU/ml παρατηρούμε ότι χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,91 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν

4,79 h⁻¹. Οι μάρτυρες στην συγκέντρωση αυτή 10⁷ CFU/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 8,39 ώρες σχεδόν διπλάσιο από αυτόν μετά την επίδραση του καπνού A1 1% ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ήταν ελάχιστα μεγαλύτερος 6,13 h⁻¹. Στον αρχικό πληθυσμό 10⁵ CFU/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν μεγαλύτερος (8,71 ώρες) σε σχέση με τον μάρτυρα σε αυτή την συγκέντρωση 5,59 ώρες, όπως και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος 5,41 h⁻¹ σε σχέση με τον μάρτυρα 7,88 h⁻¹. Τέλος στον αρχικό πληθυσμό 10³ CFU/ml η επίδραση του καπνού ήταν καθοριστική, καθώς ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν πολύ μεγαλύτερος (18,6 ώρες) σε σχέση με τον μάρτυρα 3,15 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος 2,81 σε σχέση με τον μάρτυρα αυτής της συγκέντρωσης 8,24 h⁻¹.



Σχήμα 3.2.2: Επίδραση του καπνού E5 1,2 % έναντι του *Aeromonas hydrophila* σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10³, 10⁵, 10⁷, CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα στους 30 °C.

Αρχικά για τον καπνό E5 1,2 % στον πληθυσμό 10^7 παρατηρούμε ότι χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,08 ώρες μικρότερος σε σχέση με τον μάρτυρα αυτής της συγκέντρωσης 8,39 ώρες, ενώ ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ήταν $5,04 \text{ h}^{-1}$ μικρότερος σε σχέση με τον μάρτυρα $6,13 \text{ h}^{-1}$. Στον αρχικό πληθυσμό 10^5 CFU/ml παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής (6,71 ώρες) ήταν λίγο μεγαλύτερος από τον μάρτυρα 5,59 ώρες, ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ήταν επίσης μικρότερος $5,27 \text{ h}^{-1}$ σε σχέση με τον μάρτυρα $7,88 \text{ h}^{-1}$. Τέλος στον αρχικό πληθυσμό 10^3 CFU/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής (10,1 ώρες) ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τον μάρτυρα 3,15 ώρες, όμως και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ($6,06 \text{ h}^{-1}$) ήταν μικρότερος από αυτόν του μάρτυρα $8,24 \text{ h}^{-1}$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος και της χρήσης της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας της παρούσας εργασίας αποδείχθηκε ότι ο καπνός επιδρά στην ανάπτυξη του *Aeromonas hydrophila* με διαφορές ωστόσο στα διάφορα είδη καπνών. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να προκύπτουν λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης σε καρβονύλια και φαινολικές ουσίες στους καπνούς αυτούς, σύμφωνα με τη σύσταση που διατίθεται από την εταιρεία παρασκευής τους στην Ολλανδία. Οι Sikorski et al. (1995) αναφέρουν ότι οι καρβονυλικές ενώσεις ή καρβονύλια, όπως η φορμαλδεΰδη και η μεθυλογλυοξάλη, δρουν βακτηριοκτόνα. Ειδικότερα η φορμαλδεΰδη έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της βακτηριοστατικής ή βακτηριοκτόνου ιδιότητας της σαφώς, με γνώμονα τη διασφάλιση της υγιεινής μέσω της χρήσης της. Η συγκέντρωση εξαρτάται

από τη θερμοκρασία καύσης και το είδος του ξύλου. Στην παρούσα μελέτη η αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Aeromonas hydrophila* έγινε αντιληπτή από τον καπνό C3 0,75 % και στην βακτηριακή συγκέντρωση 10^3 cfu/ml. Οι καπνοί L9 0,1% G6 0,1%, D4 1%, A1 1%, E5 1,2% δεν επέδρασαν στην αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Πολλά συστατικά καπνού οξέα, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και συγκεκριμένες φαινόλες, έχουν βακτηριοστατικές επιδράσεις σε ορισμένους τύπους βακτηρίων (Doe et al., 1998), (Leroi Guillen and Errecalde, 2002). Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, ο καπνός C3 0,75% φαίνεται να έχει εκείνα τα χαρακτηριστικά που χρειάζονται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου και μπορεί να χαρακτηριστεί ένα πολλά υποσχόμενο «όπλου» έναντι του παθογόνου αυτού.

5 Συμπέρασμα

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της αποτελεσματικότητας των υγρών καπνών στην αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Ο παθογόνος

μικροοργανισμός ήταν ο *Aeromonas hydrophila*, συνολικά στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 6 καπνοί όπου μελετήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το πείραμα μας έδειξαν ότι ο αποτελεσματικός καπνός απέναντι στο *Aeromonas hydrophila* είναι ο C3 0,75% στην συγκέντρωση 10^3 οι άλλες δύο συγκεντρώσεις 10^3 και 10^5 δεν ήταν το ίδιο αποτελεσματικές.

Οι παρακάτω καπνοί στις ακόλουθες συγκεντρώσεις L9 0,1% G6 0,1%, D4 1%, A1 1%, E5 1,2% δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Adeyeye, S. A. O. (2016). Effect of smoking methods on the quality and safety of traditional smoked fish (PhD Thesis). Department of Food Science and Technology, Federal University of Agriculture, Abeokuta, Nigeria, 188. [\[Google Scholar\]](#)

- Baird-Parker. T.C. (2000) The production of microbiologically safe and stable foods
- Belichovska K., Belichovska D., Pejkovski Z. (2019) Smoke and Smoked Fish Production, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Meat Technology 60 (1), 37–43.
- Colburn K.G.(1990) *Listeria* species in a California coast estuarine environment
- Dalgaard P., Jørgensen L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. International Journal of Food Microbiology, 40: 105-115.
- Dalgaard P, Jørgensen, L.V. (2003) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. International Journal of Food Microbiology.
- Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., Kirby R.M (2001) Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control, 12: 67-71.
- Dijkstra R.G.(1982) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of sewage plants
- Doe, P. E. (1998). *Fish Drying and Smoking Production and Quality* (pp. 89–115). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., Inc.
- Economou V, Gousia P, Kansouzidou A, Sakkas H, Karanis P, Papadopoulou C. (2013) Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters 89 within an agricultural landscape. Int J Hyg Environ Health 216(4), 435-444.
- Elisa L Elliot Ph.D., John E Kvenberg Ph.D.(2000). Risk assessment used to evaluate the US position on *Listeria monocytogenes* in seafood
- Ericsson I.L., Eklow A., Danielsson-Tham M.L., Loncarevic S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. Journal of Clinical Microbiology, 35: 2904-2907.
- Gombas DE, Chen YH, Clavero RS, Scott VN. (2003), Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Journal of Food Protection.
- Gram L. (1992) Evaluation of the bacteriological quality of seafood. International Journal of Food Microbiology, 16:25-39.
- Harbell S., (1988) Controlling seafood spoilage. In: Seafood Retailing Series, Washington Sea Grant, Seattle, pp. 1–7
- Hielm, S., E. Hyytiä, A. Andersin, H. Korkeala (1998), A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. J. Appl. Microbiol.
- Huis in't Veld, J.H.J (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview

Huss H.H, Lasse Vigel Jørgensen, Birte Fonnesbech Vogel (2000) Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods.

Huss H.H (1997). Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood.

Huss H.H. (1980), Distribution of *Clostridium botulinum*. American society for microbiology journals.

Jennifer L. Johnson, Michael P. Doyle and Robert G. Cassens (1989), *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. Journal of Food Protection, Pages 81–91.

Lautrop. H. *Aeromonas hydrophila* isolated from human faeces and its possible pathological significance

Leroi F, Joffraud J.J, Chevalier. F, Cardinal. M. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C Int J Food Microbiol, 39 (1998), pp. 111-

Lin H., Jiang J., Li D. (2008) Potential Hazards in Smoke-Flavored Fish, Journal of Ocean University of China, Vol.7, No.3, pp.294-298.

Nigam P.K and Nigam. A (2010), Botulinum toxin. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Indian Journal of Dermatology.

Nithin C.T., Joshy C.G., Chatterjee Niladri Sekhar, Panda Satyen Kumar, Yathavamoorthi R., Ananthanarayanan T.R., Mathew Suseela, Bindu J., Gopal T.K.S. (2020) Liquid smoking - A safe and convenient alternative for traditional fish smoked products. Food Control, Elsevier Ltd.

Palumbo. S(1996) The *Aeromonas hydrophila* Group in Food

Peck Michael W.(2009). Biology and Genomic Analysis of *Clostridium botulinum*

Sikorski Z. E., Gilberg A., Ruiter A. (1995) Fish Products. In A. Ruiter (Ed.), Fish and fishery products, Composition, nutritive properties and stability. CAB International, Wallingford, UK

Stackebrandt. E, Rainey. F.A (1997) Phylogenetic relationships

S.W. Joseph, A.M. Carnahan(2000) Update on the genus *Aeromonas*

T.A Roberts, A.C. Baird-Parker, R.B. Tompkin(1996) *Aeromonas* Microorganisms in Foods, Characteristics of Microbial Pathogens. ICMSF, vol. 5, Blakie Academic and Professional, London (1996), pp. 5-19

Ελληνική βιβλιογραφία

Μποζιάρης Ι. (2012) Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, 2η Έκδοση

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



Παρλαπάνη Φ. (2013) Ειδικοί Αλλοιωγόνι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Διδακτορική Διατριβή.

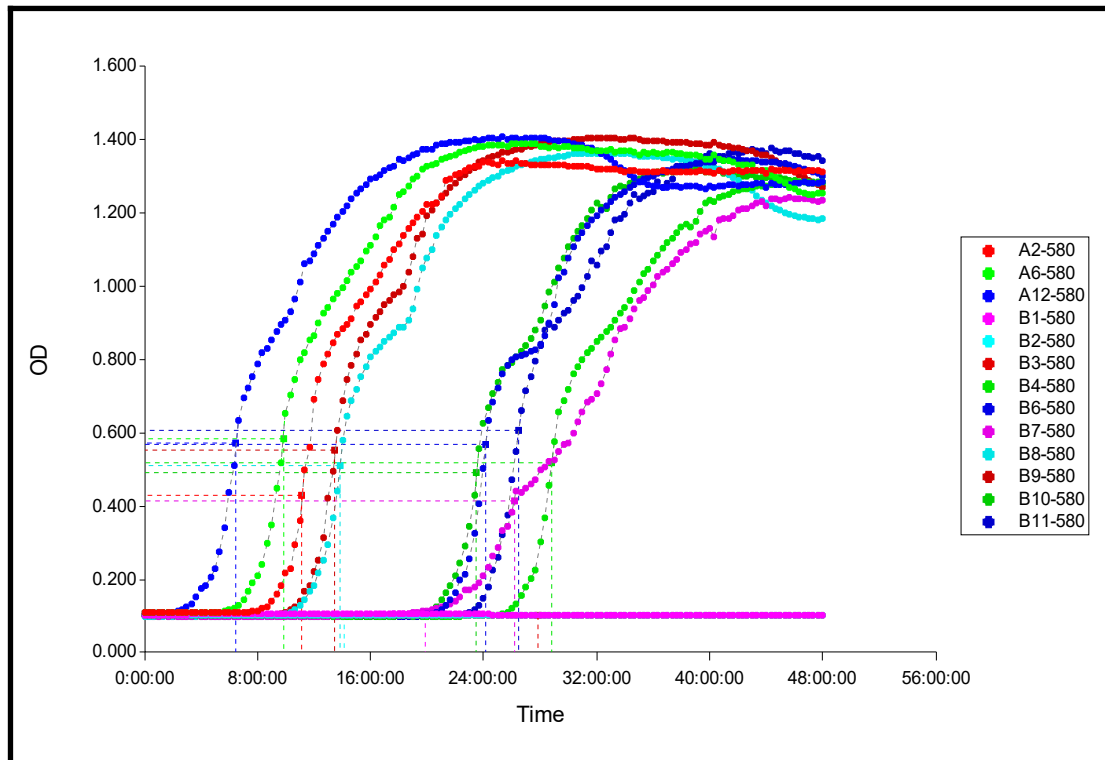
ABSTRACT

In this final year undergraduate thesis the effect of liquid smoke suspensions against the pathogenic microorganism *Aeromonas hydrophila* was investigated, using the

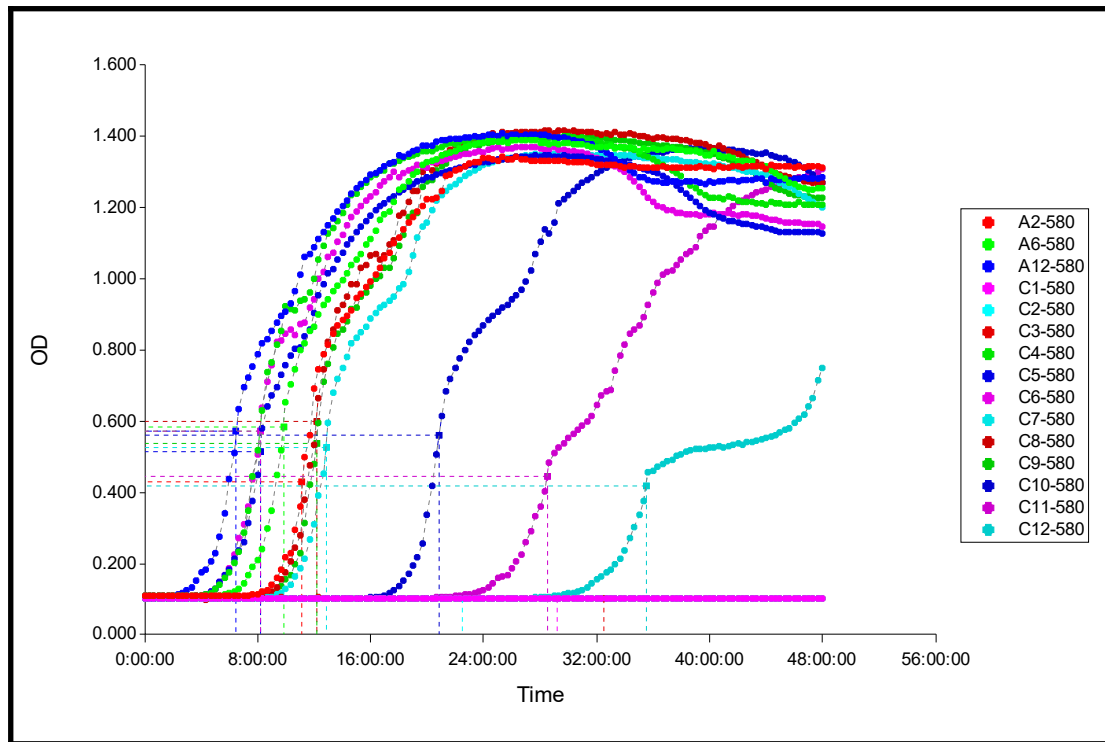
Absorbance or Optical Density method. Six (6) types of smoke (L9, G6, C3, D4, A1 and E5) were studied against the pathogenic microorganism *Aeromonas hydrophila*. Each type of smoke was studied in liquid nutrient substrate in three (3) different concentrations in the order of magnitude of 10^3 , 10^5 and 10^7 CFU/ml. The microplates were first filled under aseptic conditions, and then placed in a Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader for forty-eight (48) hours at 37° C. The results showed us that the type of smoke L9 at a concentration of 0,9% v/v had better result and acted against the pathogenic microorganism in the microbial population of 10^7 cfu/ml. According to the result of the present work, the type of smoke L9 could be used against this pathogen bacterium.

Keywords: liquid smoke, *Aeromonas hydrophila*, optical density

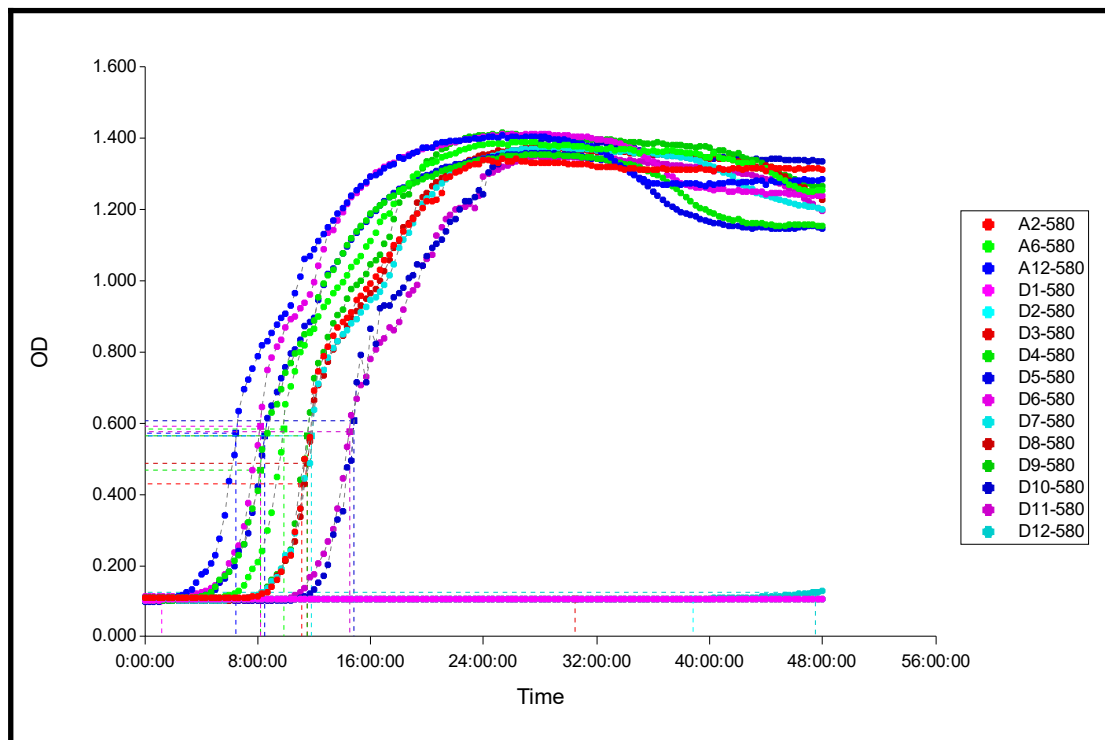
Παράρτημα



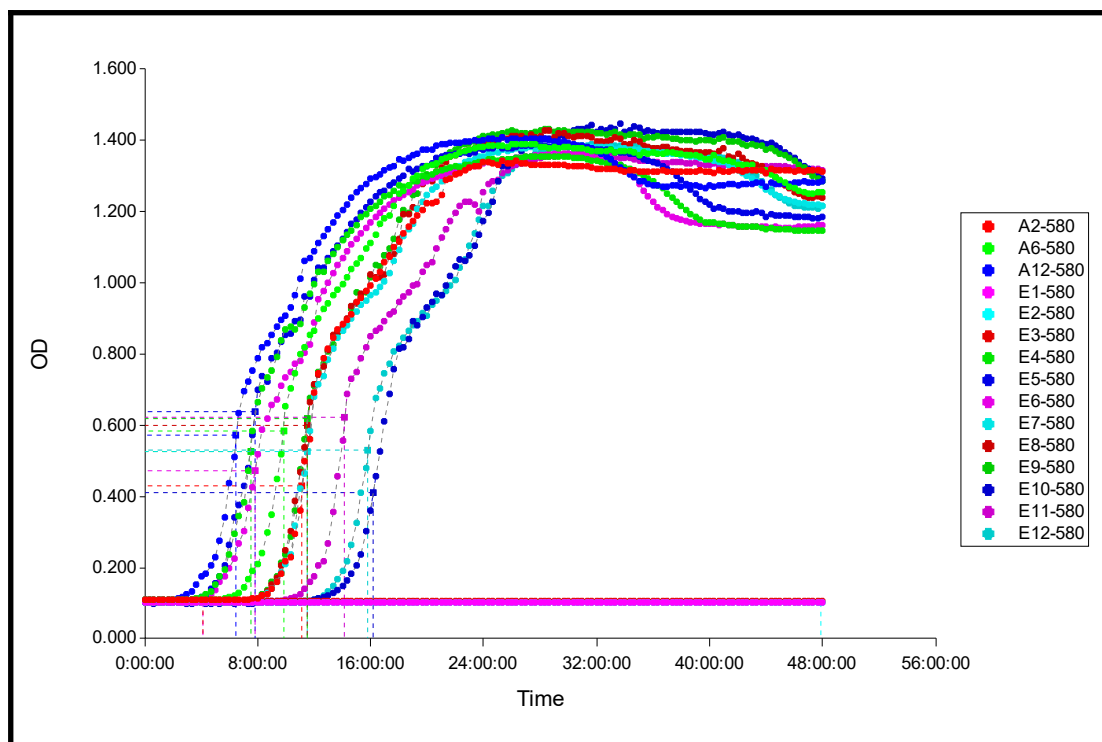
Εικόνα 8.1 :Καπνός L9 0,05%



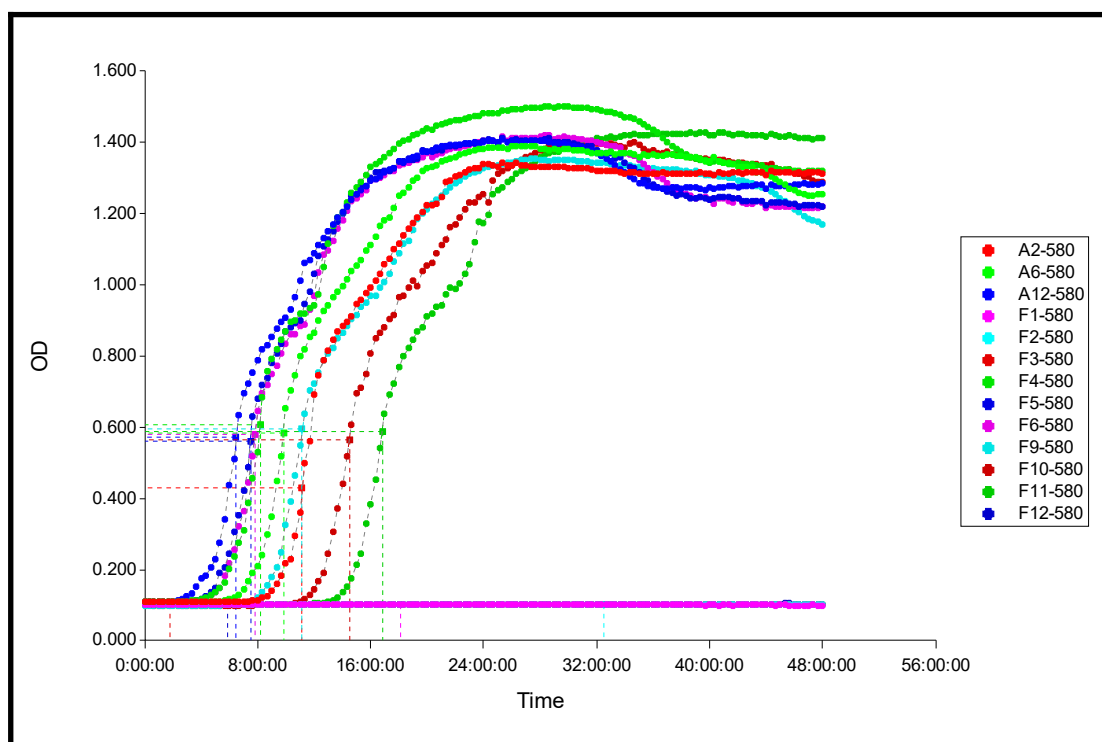
Εικόνα 8.2 :Καπνός L9 0,1%



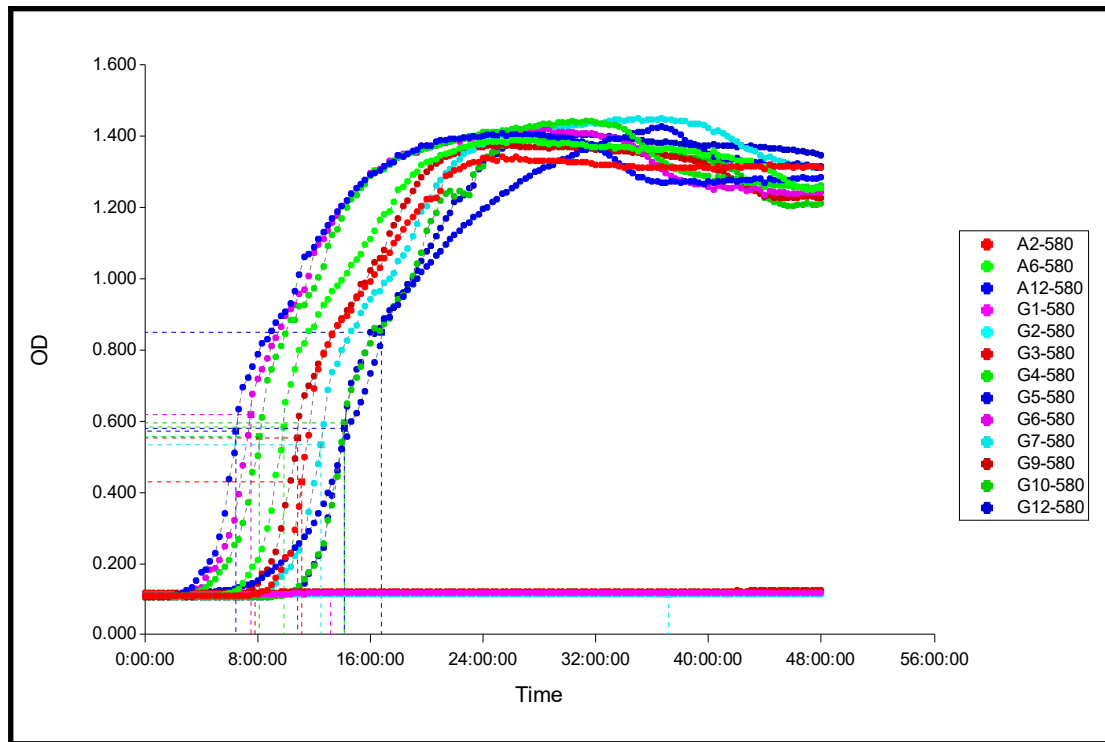
Εικόνα 8.3 :Καπνός L9 0,15%



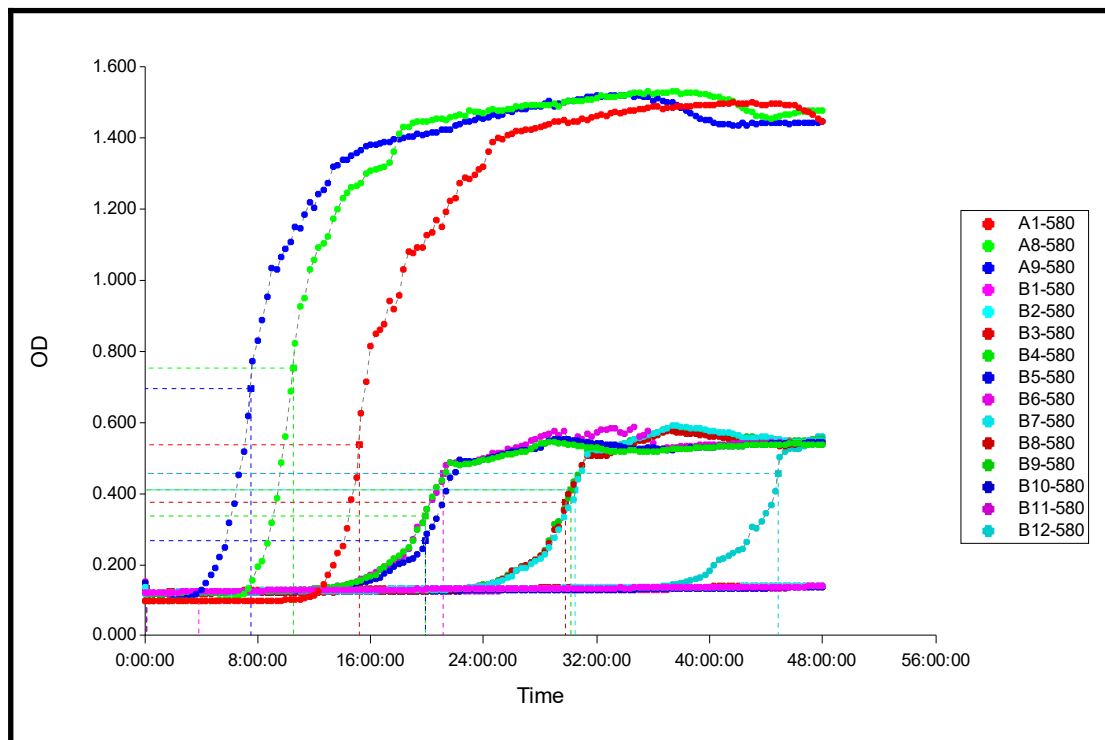
Εικόνα 8.4 : Καπνός G6 0,1%



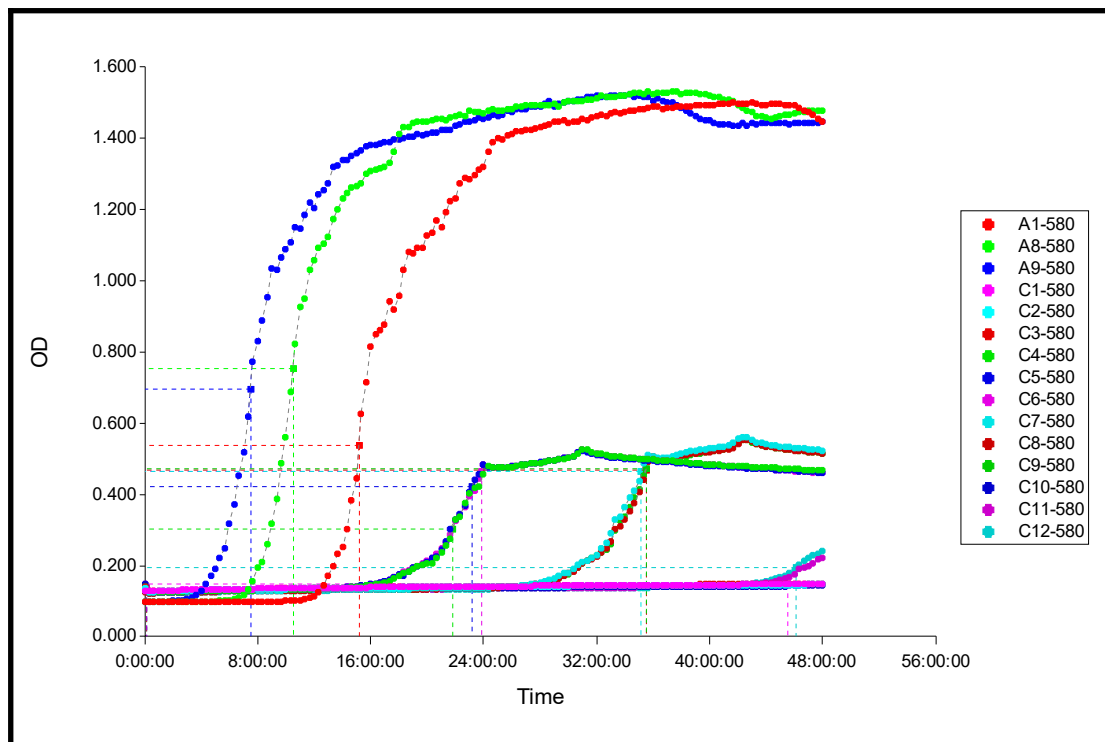
Εικόνα 8.5 : Καπνός G6 0,2%



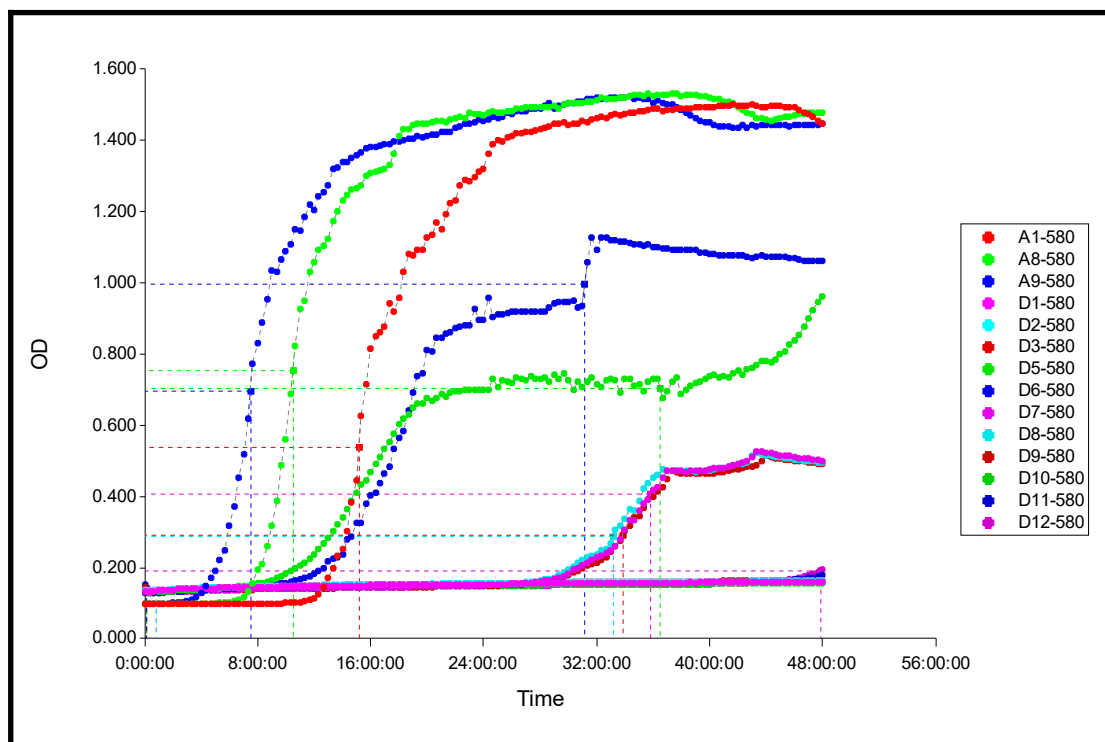
Εικόνα 8.6 : Καπνός G6 0,35%



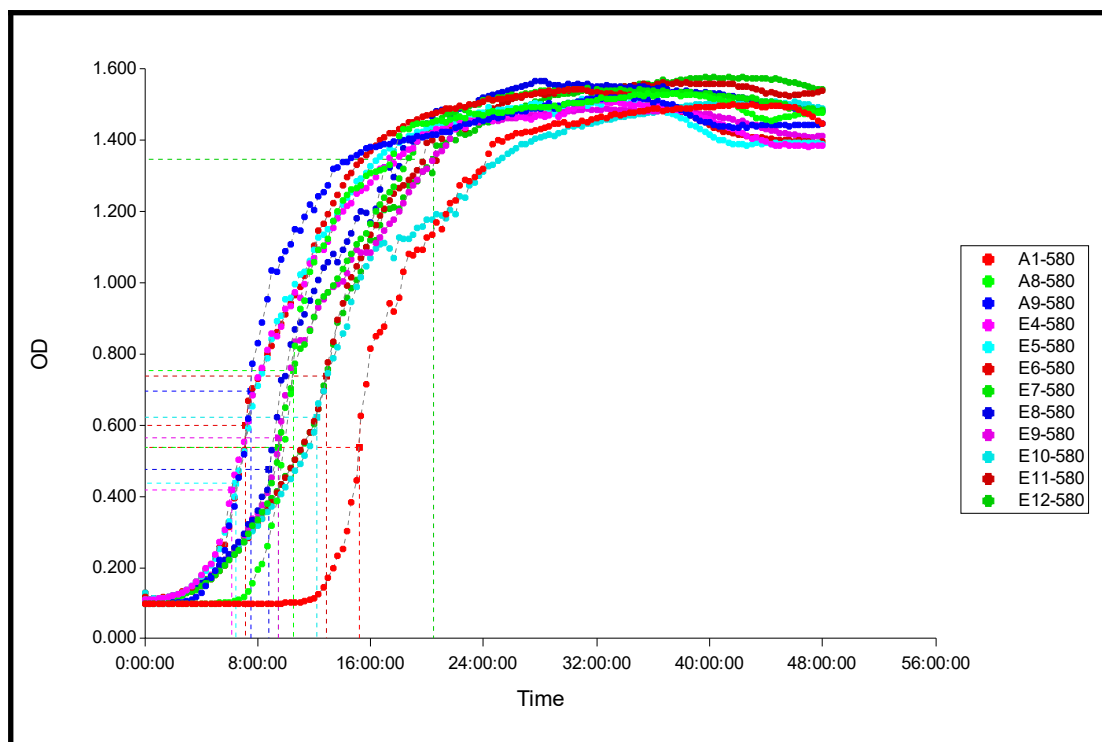
Εικόνα 8.7 : Καπνός C3 0,9%



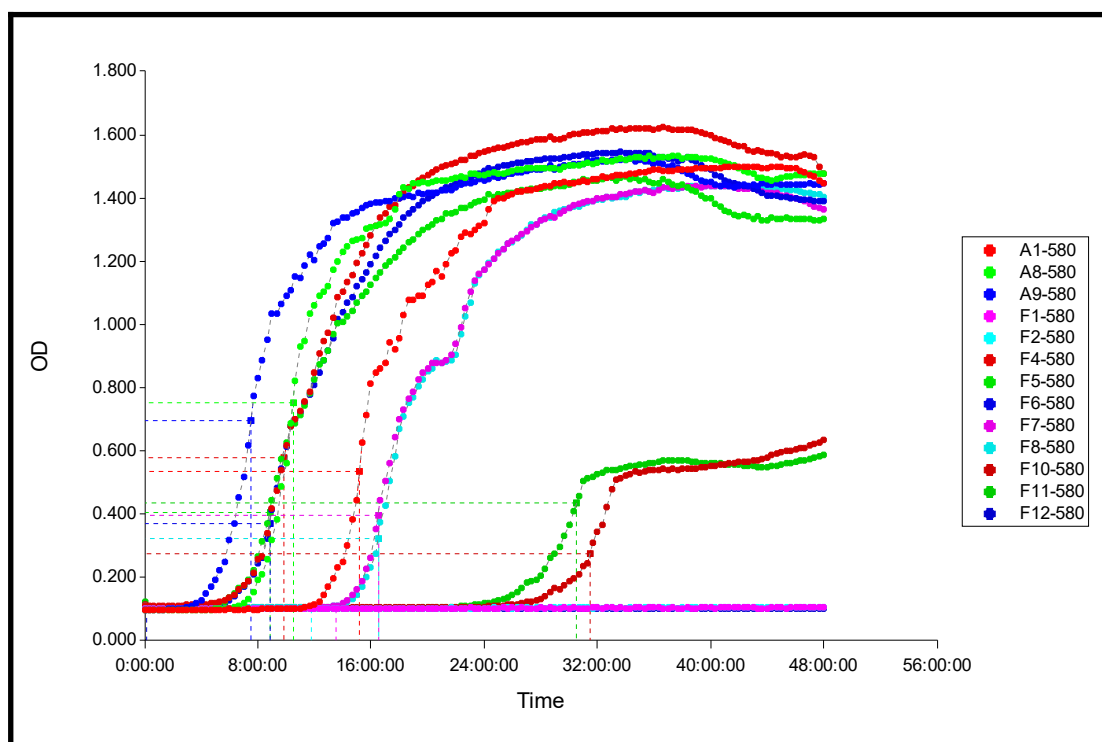
Εικόνα 8.8: Καπνός C3 0,75 %



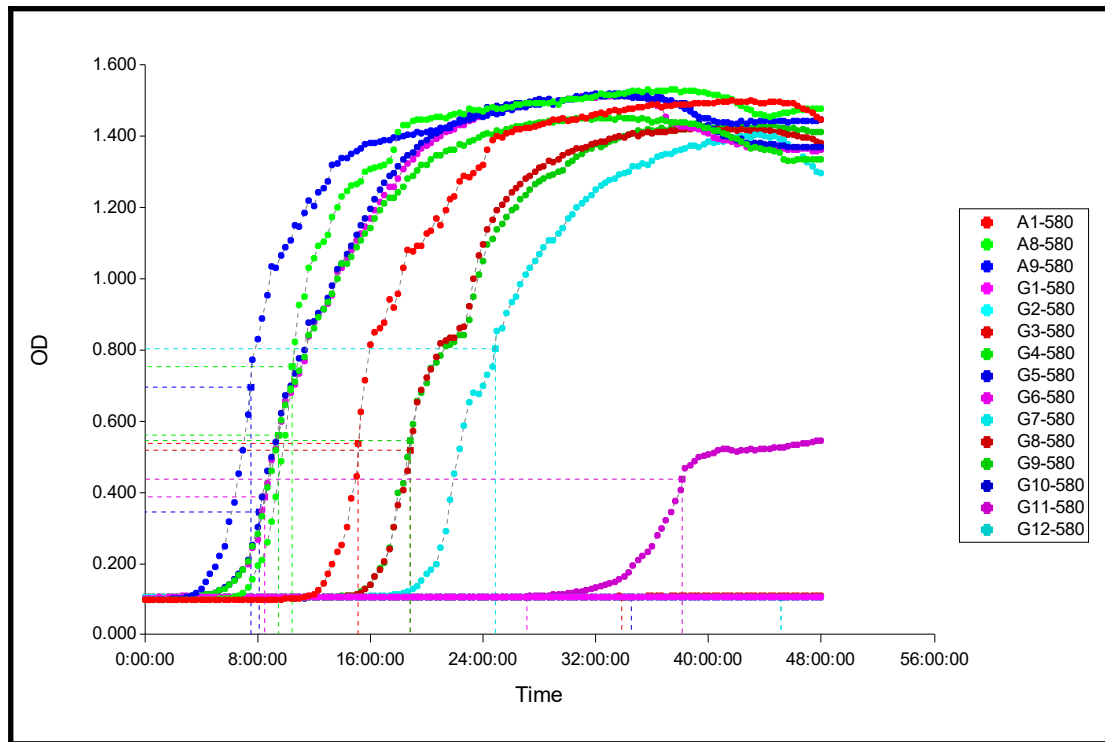
Εικόνα 8.9 : Καπνός C3 1 %



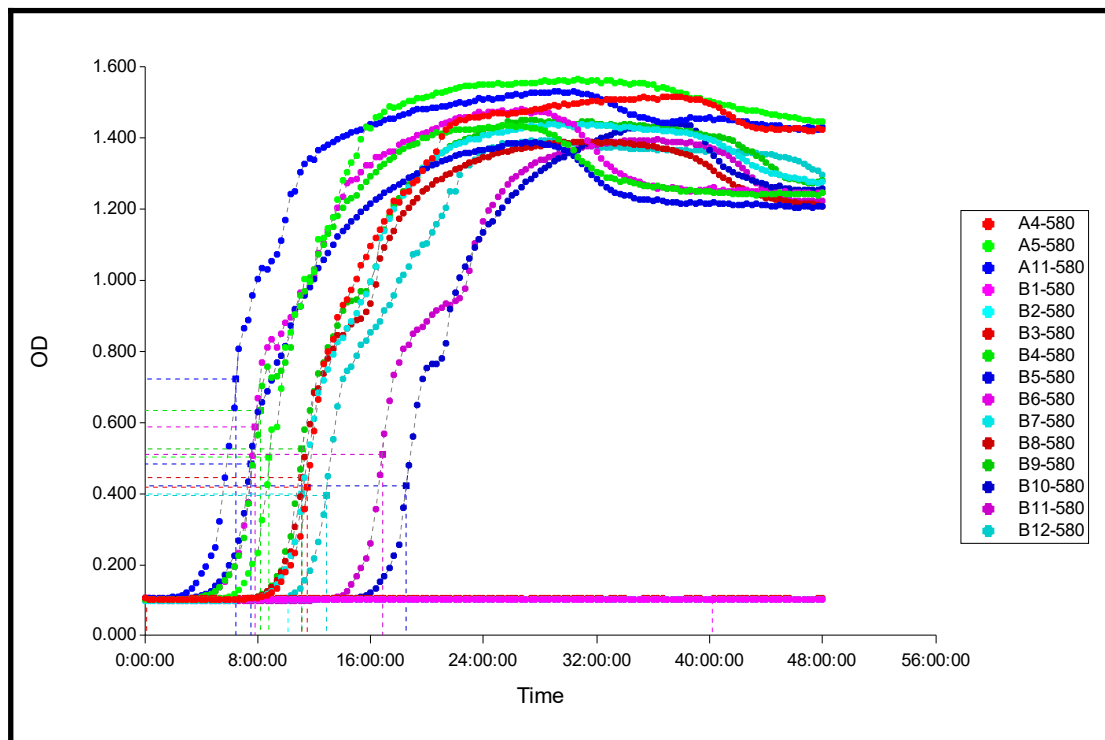
Εικόνα 8.10 :Καπνός D4 0,5%



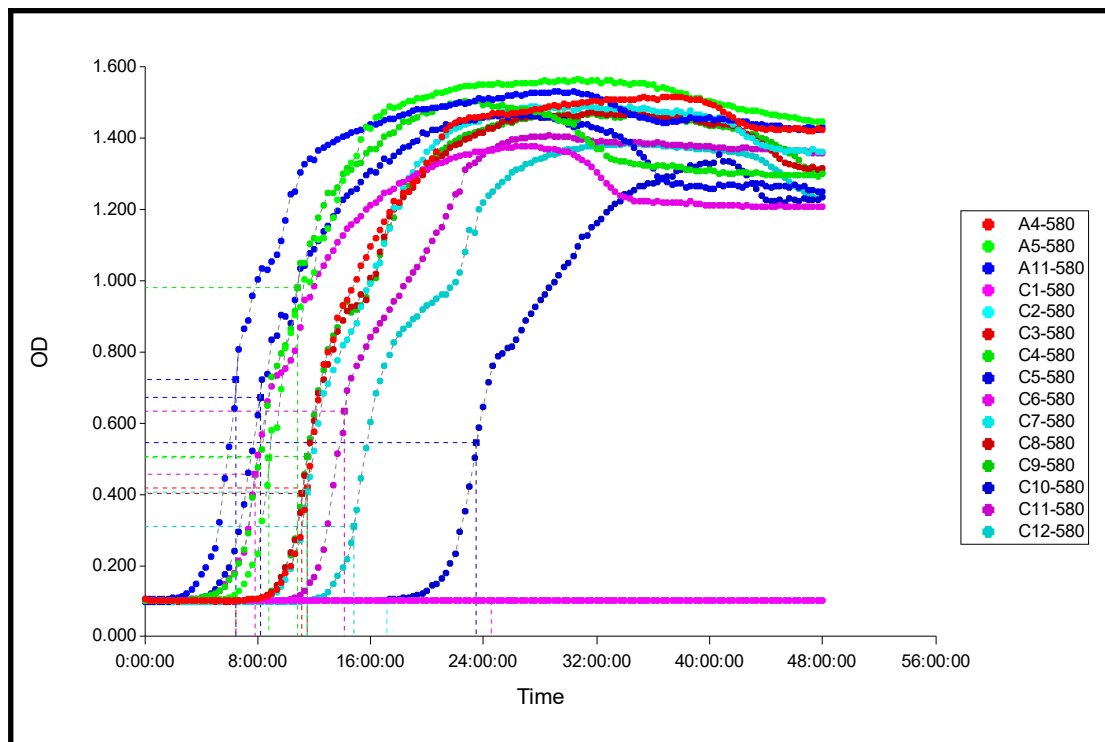
Εικόνα 8.11 :Καπνός D4 0,75%



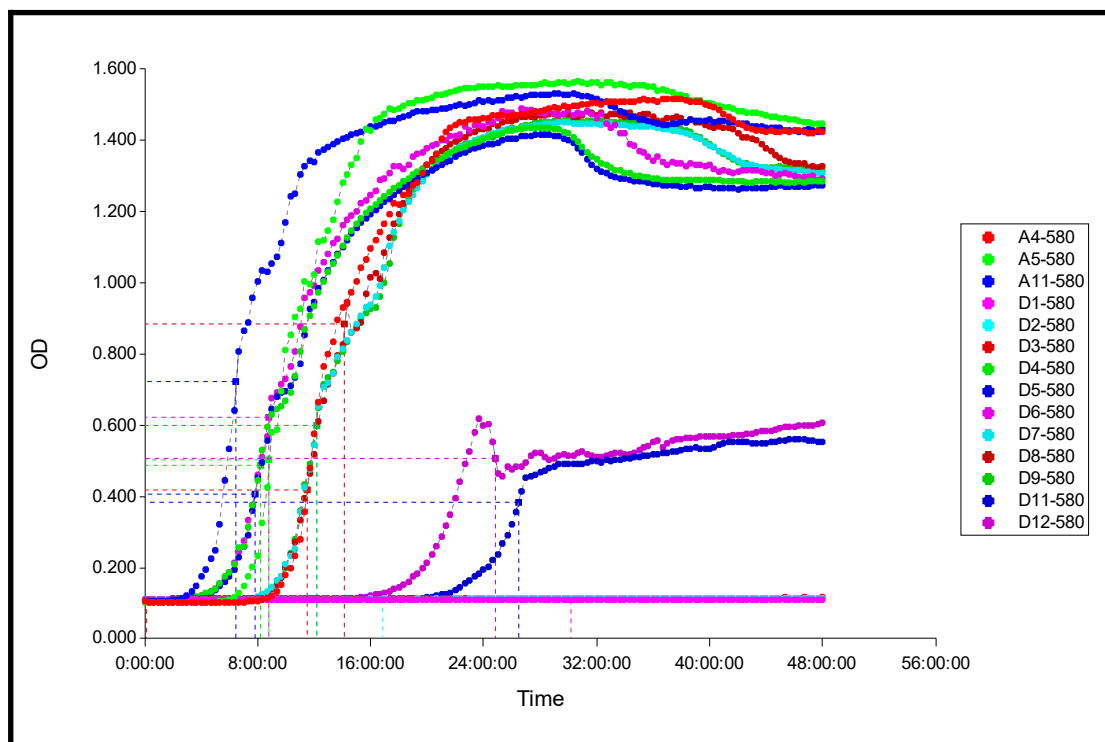
Εικόνα 8.12 :Καπνός D4 1%



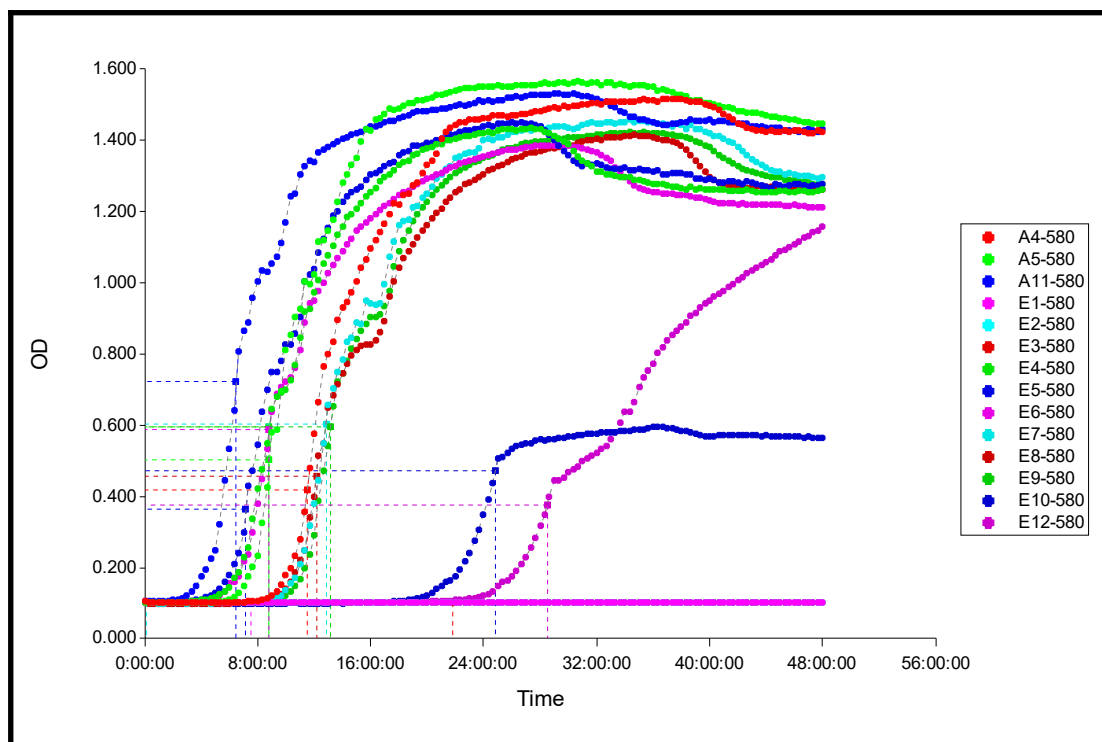
Εικόνα 8.13 :Καπνός A1 0,6%



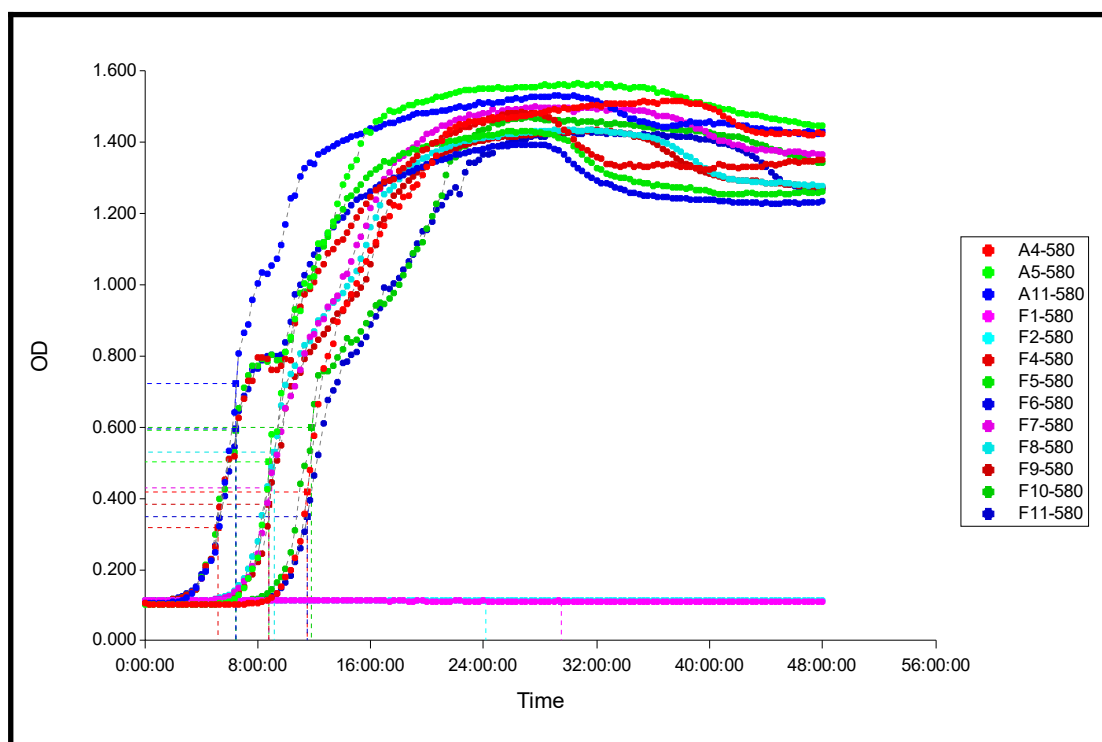
Εικόνα 8.14 :Καπνός A1 0,8%



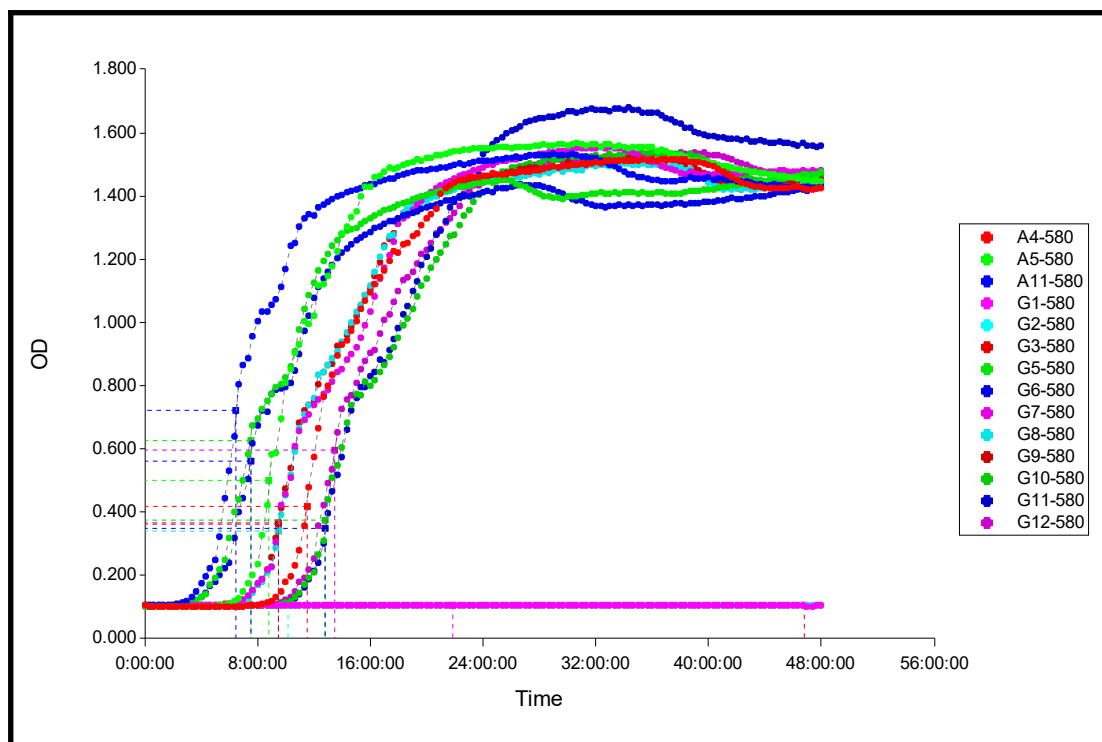
Εικόνα 8.15 :Καπνός A1 1%



Εικόνα 8.16: Καπνός E5 0,6%



Εικόνα 8.17 : Καπνός E5 0,9%



Εικόνα 8.18 :Καπνός E5 1,2%

-

