



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**



**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην αύξηση της**  
***Listeria monocytogenes*»**

**Σωτήρης Καρατζογιάννης**

**ΒΟΛΟΣ 2020**

**«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνών στην αύξηση της *Listeria monocytogenes*»**

**Effect of liquid smoke suspensions on growth of *Listeria monocytogenes***



**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

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



*Στην οικογένειά μου,  
Αδαμαντία, Αργυρώ, Κώστα, Ηλία,  
που δεν σταμάτησαν να με στηρίζουν και να με συμβουλεύουν.*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία είναι αποτέλεσμα προσπάθειας, μόχθου και αναζήτησης. Δε θα έφτανε ποτέ όμως σε πέρας εάν δεν είχα την καθοδήγηση και την αγαστή 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 τη 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 μού 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 αυτής ανήκει στην κοινή μας προσπάθεια.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε διερεύνηση της επίδρασης και της αποτελεσματικότητας των υγρών εναιωρημάτων καπνών έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στελέχους Scott A. Με τη μέθοδο της απορροφητικότητας ή οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD) μελετήθηκαν έξι (6) συνολικά καπνοί (L9, G6, C3, D4, A1, και E5) οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων-παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων. Κάθε καπνός μελετήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις και έναντι 3 διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών της τάξεως των  $10^3$ ,  $10^5$  και  $10^7$  CFU/ml. Αφού έγινε πλήρωση των μικροπλακών υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκαν στο Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader για διάστημα σαράντα οκτώ (48) ωρών σε θερμοκρασία 37°C. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων έδειξαν ότι ο καπνός L9 σε συγκέντρωση 0,15 % είχε παρεμποδιστική δράση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού στον μικροβιακό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml, αφού δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο καπνός L9 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα ικανό εμπόδιο έναντι του παθογόνου αυτού βακτηρίου.

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1 Γενικές έννοιες για την μεταποίηση και συντήρηση αλιευμάτων .....	9
1.2 Στόχοι της βιομηχανίας τροφίμων.....	10
1.3 Κάπνιση.....	10
1.3.1 Ψυχρή κάπνιση .....	11
1.3.2 Θερμή κάπνιση .....	11
1.3.3 Υγρή κάπνιση.....	11
1.4 Ασφάλεια και ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων. ....	12
1.5 Σύσταση καπνού.....	12
1.6 Καπνιστά είδη .....	13
1.7 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων.....	14
1.8 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων .....	15
1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	17
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	18
2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	18
2.2 Απομόνωση μικροβιακών πληθυσμών .....	18
2.3 Χαρακτηρισμός συγκεντρώσεων.....	19
2.4 Πλήρωση των μικροπλακών .....	19
2.5 Λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας με Microplate Reader .....	20



<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	21
3.1 Αποτελέσματα πρώτης (1 <sup>ης</sup> ) μικροπλάκας.....	21
3.2 Αποτελέσματα δεύτερης (2 <sup>ης</sup> ) μικροπλάκας.....	24
3.3 Αποτελέσματα τρίτης (3 <sup>ης</sup> ) μικροπλάκας.....	28
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	31
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	34
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	35
<b>7. ABSTRACT</b> .....	39
<b>8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	40





## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές έννοιες για την επεξεργασία και συντήρηση αλιευμάτων.

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 επεξεργασμένων προϊόντων, μια από αυτές είναι τα καπνιστά ψάρια και άλλα προϊόντα αλιευμάτων. Τα παραπάνω προϊόντα χαρακτηρίζονται και ως ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα στη βιομηχανία τροφίμων, αφού δέχονται κατάλληλη επεξεργασία με την οποία μπορούν να διατηρηθούν για αρκετό χρονικό διάστημα σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των νωπών προϊόντων, ενώ παράλληλα φέρουν τα χαρακτηριστικά του «φρέσκου προϊόντος», όπως χρώμα, άρωμα και γεύση (Μπλούκας, 2004). Κάποιες μέθοδοι επεξεργασίας – συντήρησης στα αλιευτικά προϊόντα είναι η ψύξη, η κατάψυξη, η συσκευασία σε κενό αέρος (MAP), η θερμική επεξεργασία, η αλάτιση, το μαρινάρισμα και η κάπνιση (Μποζιάρης 2013). Για την αντιμετώπιση και αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και τη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων, για την κάθε μέθοδο συντήρησης πρέπει να ακολουθείται μια σειρά από πρωτόκολλα και διαδικασίες. Η κύρια μέθοδος συντήρησης η οποία μελετήθηκε στο εργαστήριο για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, είναι η κάπνιση με υγρούς καπνούς.



## 1.2 Στόχοι της βιομηχανίας τροφίμων.

Η βιομηχανία τροφίμων αποτελεί τον κλάδο εκείνο της βιομηχανίας ο οποίος ασχολείται με την επεξεργασία τροφίμων. Η βιομηχανία τροφίμων πέρα από το οικονομικό όφελος που επιδιώκει, έχει ως αποστολή να προσφέρει στον καταναλωτή ποικιλία τροφίμων τα οποία θα ικανοποιούν τις απαιτήσεις του ως προς την εμφάνιση, το χρώμα, την υφή, την οσμή, τη γεύση αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης, τρόφιμα που θα έχουν την απαιτούμενη θρεπτική αξία και θα καλύπτουν τις ανάγκες του καταναλωτή σε θρεπτικά στοιχεία, που θα είναι ασφαλή για την υγεία του και θα μπορούν να συντηρηθούν για χρονικό διάστημα το οποίο θα επιτρέπει τη διακίνηση, την εμπορία και τη διατήρηση τους μέχρι να καταναλωθούν (Μπλούκας, 2004).

## 1.3 Κάπνιση

Η κάπνιση αποτελεί μια μέθοδο συντήρησης αλιευτικών προϊόντων (ιχθύων για παράδειγμα) και συνήθως συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν μικροβιακά εμπόδια όπως είναι η αλάτιση (μετά την κάπνιση) και η αποξήρανση (πριν τη κάπνιση). Υπάρχουν τρία (3) είδη κάπνισης : η υγρή, η ψυχρή και η θερμή κάπνιση. Η πτώση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) όσο και η περιεκτικότητα σε οργανικές ουσίες (φαινολικές ουσίες) προσδίδουν αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Η σύσταση του καπνού διαμορφώνεται ανάλογα με το είδος του ξύλου, τον χρόνο καύσης, τη θερμοκρασία, τη ροή του αέρα, το ποσοστό οξυγόνου και την υγρασία. Τέλος, το κάπνισμα εκτός από τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες προσδίδει άρωμα, γεύση και χρωματική εμφάνιση στο προϊόν (Μποζιάρης 2012).



### 1.3.1 Ψυχρή κάπνιση

Στην περίπτωση της ψυχρής κάπνισης τα προϊόντα δεν υφίστανται ψήσιμο αλλά ξήρανση και ακολουθεί η συντήρησή τους στο ψυγείο. Έτσι, κατά την διαδικασία της ψυχρής κάπνισης η θερμοκρασία του θαλάμου φτάνει έως και τους +37°C, ενώ η διάρκεια μπορεί να είναι από μερικές ώρες μέχρι και εβδομάδες. Πριν την έναρξη της ψυχρής κάπνισης τα προϊόντα συνηθίζεται να δέχονται μια προεργασία με αλάτισμα (νιτρικά/νιτρώδη άλατα) όπου το επιτρέπει η Νομοθεσία και κατόπιν ξεκινά η κάπνιση (Μποζιάρης 2012). Τέλος, σύμφωνα με Gram (2001) παρόλο που το κρύο κάπνισμα φαίνεται να μειώνει τον αριθμό των βακτηρίων, είναι απίθανο να μπορεί να παρεμποδίσει το παθογόνο της *Listeria monocytogenes*.

### 1.3.2 Θερμή κάπνιση

Η διαδικασία της θερμής κάπνισης χωρίζεται σε δύο στάδια, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι η θερμοκρασία του θαλάμου φτάνει έως τους 120°C. Στο πρώτο στάδιο οι ιχθύες καθίστανται υπό αφυδάτωση σε θερμοκρασίες από +30°C έως +55°C. Στο δεύτερο στάδιο όπου γίνεται η κύρια κάπνιση, οι ιχθύες ψήνονται σε θερμοκρασίες από +80°C έως +120°C, ενώ η θερμοκρασία στο κέντρο του ιχθύος φτάνει από +70°C έως +80°C. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία το προϊόν ψύχεται και συσκευάζεται (Μποζιάρης 2012).

### 1.3.3 Υγρή κάπνιση

Η διαδικασία της υγρής κάπνισης πραγματοποιείται με ψεκάσμο ή με εμβάπτιση σε διάλυμα υγρού καπνού. Η παραγωγή του υγρού καπνού γίνεται μέσω συμπύκνωσης και κλασματικής απόσταξης του καπνού που προέρχεται από καύση ξύλων. Το μικρότερο κόστος καθώς και ο προσδιορισμός και ο έλεγχος των ποσοτήτων των



αρωματικών συστατικών που λαμβάνει το προϊόν, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα διαχωρισμού των βλαβερών ουσιών (όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες) είναι τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου (Μποζιάρης 2012).

#### **1.4 Ασφάλεια και ποιότητα καπνιστών αλιευμάτων.**

Οι κύριοι λόγοι που προσδίδουν στα καπνιστά τρόφιμα μεγάλη διάρκεια ζωής είναι η μειωμένη ενεργότητα νερού, η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ιδιότητα του καπνού όπως επίσης και η θερμική επεξεργασία. Μέσω της θερμικής επεξεργασίας δημιουργείται ένα πλαίσιο μεγαλύτερης ασφάλειας για το τρόφιμο. Χρησιμοποιώντας την κάπνιση επιδιώκεται η μείωση του βακτηριακού φορτίου των ιχθύων, η αδρανοποίηση των ενζύμων και σπορίων, ο εμπλουτισμός των ιστών με βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ιδιότητες οι οποίες προέρχονται από τον καπνό και ο περιορισμός της υγρασίας του αλιεύματος (Μποζιάρης 2012, Μποζιάρης 2013).

Παρ' όλα αυτά υπάρχει πιθανότητα ύπαρξης χημικών ουσιών στα καπνιστά αλιεύματα πέρα από αυτές που περιείχε 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 αυξάνεται αναλογικά κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης από τους 400°C έως τους 1000°C, γι' 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).

#### **1.5 Σύσταση του καπνού**

Ο καπνός παράγεται από πυρόλυση ξύλου σε αυξημένες θερμοκρασίες και μειωμένο οξυγόνο. Υπάρχουν πάνω από τετρακόσιες (400) ενώσεις που προέρχονται από το

ξύλο. Μέχρι στιγμής σαράντα (40) έχουν ταυτοποιηθεί με οξέα, είκοσι δύο (22) αλκοόλες, εκατόν τριανταένα (131) καρβονύλια, είκοσι δύο (22) εστέρες, σαράντα έξι (46) φουράνια, δεκαέξι (16) λακτόνες και εβδομήντα πέντε (75) φαινόλες. Αυτές οι ενώσεις έχουν σημαντικό ρόλο καθώς εισχωρούν στη μυϊκή μάζα, ενώ παράλληλα επικάθονται στην επιφάνεια του προϊόντος. Μεταξύ των λειτουργικών συστατικών του καπνού οι φαινόλες και τα οξέα έχουν δείξει την πιο αντιμικροβιακή δραστηριότητα, αν και υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα καρβονύλια και τα οξέα μπορούν να έχουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δραστηριότητας, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα φαινολών. Το χρώμα που αναπτύσσεται μέσω της αντίδρασης που παράγεται κατά τη θέρμανση των προϊόντων οφείλεται κυρίως στα οξέα και τις καρβονυλικές ενώσεις (Toledo 2008). Η σύσταση του καπνού εξαρτάται από το είδος του ξύλου, τη χημική του σύνθεση, από τη θερμοκρασία καύσεως αλλά και την ποσότητα του διαθέσιμου αέρα κατά την καύση. Η οξιά, η μηλιά, η κερασιά, η βελανιδιά και η καρυδιά είναι είδη ξύλου που σε συνδυασμό με τη προσθήκη αρωματικών φυτών όπως η δάφνη, το δενδρολίβανο και το θυμάρι αποδίδουν καλύτερα στην κάπνιση. Παράλληλα υπάρχουν είδη ξύλου όπως αυτά των ρητινοφόρων δέντρων (πεύκο, έλατο, κέδρο) τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες ρητινών οι οποίες επιφέρουν μια δυσάρεστη πικρή γεύση και οσμή ενώ προσδίδουν σκούρο χρώμα στα ψάρια (Belichovska et al 2019).

### **1.6 Καπνιστά προϊόντα ιχθύων**

Στο μακρινό παρελθόν πριν από την άφιξη των Ευρωπαίων στην Αμερική, υπάρχουν αναφορές πως οι ιθαγενείς Αμερικάνοι κάπνιζαν ψάρια για να τα διατηρήσουν προς κατανάλωση είτε για μεγάλα ταξίδια είτε για αργότερα μέσα στη χρονιά όταν αυτά τα ψάρια δεν θα ήταν διαθέσιμα στο περιβάλλον (Toledo 2008). Οι κυριότερες

οικογένειες αλιευμάτων οι οποίες χρησιμοποιούνται στην κάπνιση είναι οι κυπριανίδες (Cyprinidae), οι σολομονίδες (Salmonidae), οι σκομβρίδες (Scombridae), οι κλουπείδες (Clupeidae), οι μερλουκίδες (Merluccidae) και ορισμένα δίθυρα όπως τα στρείδια και τα χτένια. Στην Ελλάδα η πέστροφα, ο σολομός και το χέλι είναι τρία είδη που έχουν μεγάλη δυνατότητα ανάπτυξης σε συνδυασμό με τη μεταποιητική μέθοδο της κάπνισης (Καλλίγερος 2004).

### 1.7 Αλλοίωση αλιευμάτων

Γενικότερα αλλοίωση ενός τροφίμου εννοούμε τη μείωση της ποιότητας του όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Αλλοιωμένο θεωρείται ένα προϊόν όταν έχει υποστεί κάποιες αλλαγές, οι οποίες το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση (Μπλούκας 2004). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής χάνεται εξαιτίας μικροβιακής αλλοίωσης. Στις ανεπτυγμένες χώρες η μικροβιακή αλλοίωση οφείλεται κυρίως σε ψυχρότροφα βακτήρια και μύκητες (Huis int Velt et al 1996). Η αλλοίωση των αλιευμάτων μπορεί να προκληθεί από ένζυμα, αφυδάτωση, οξείδωση, μόλυνση και φυσική βλάβη (Harbell 1988). Κύριες αδυναμίες των θαλάσσιων προϊόντων που οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας τους φαίνεται να είναι οι ευαίσθητες πρωτεΐνες και τα λίπη που περιέχουν. Έτσι, αμέσως μετά το θάνατο των ψαριών οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στη σάρκα με αποτέλεσμα τον μεταβολισμό μεγάλων μορίων όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα λίπη τα οποία περιέχει (Liston 1980). Τα ποσοστά της μικροβιακής και αυτολυτικής υποβάθμισης φαίνεται ότι ποικίλουν ανάλογα με τη μέθοδο σύλληψης, το είδος του αλιεύματος και κυρίως από την επεξεργασία και τη θερμοκρασία αποθήκευσης του προϊόντος. Υπάρχουν έρευνες οι οποίες τονίζουν ότι η αιτία αλλοίωσης των αλιευμάτων δεν εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό των

μικροοργανισμών σε αυτά, αλλά από ένα μικρό τμήμα της μικροβιακής τους χλωρίδας, τους «Ειδικούς Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς» (Dalgaard 2003, Dalgaard 1995).

### 1.8 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Σύμφωνα με τους Moon Dutta et al. (2018) οι σπουδαιότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που συναντώνται συνήθως στα καπνιστά αλιευτικά προϊόντα είναι οι *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* Type E και *Salmonella* spp. για τα οποία γίνεται ειδική αναφορά παρακάτω.

#### *Listeria monocytogenes*.

Αν και το βακτηριακό γένος *Listeria* περιλαμβάνει επί του παρόντος δέκα (10) είδη, τα ανθρώπινα κρούσματα λιστερίωσης προκαλούνται σχεδόν αποκλειστικά από το είδος *Listeria monocytogenes* (European Food Safety Authority 2013). Ο *Listeria monocytogenes* είναι αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, που σημαίνει ότι αναπτύσσεται τόσο με παρουσία όσο και με απουσία οξυγόνου (Jorgensen & Huss 1998). Είναι ένα Gram θετικό βακτήριο το οποίο μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες +1 έως +45°C, ενώ στους +30 έως +37°C έχει παρατηρηθεί ότι είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του. Επίσης, έχει την ικανότητα να επιβιώσει και σε ακραίες συνθήκες όπως το χαμηλό pH ή η μεγάλη αλατότητα (Economou et al 2013). Παρόλο που δε θεωρείται θαλάσσιος μικροοργανισμός μπορεί να απομονωθεί από το θαλασσινό νερό πιθανότατα λόγω απορροής από τη γη (Ben Embarek 1994). Επομένως, είναι πολύ πιθανό να εντοπίζεται και στους χώρους επεξεργασίας αλιευτικών προϊόντων (Gram 2001). Τα καπνιστά αλιεύματα φέρουν ένα συγκεκριμένο ρίσκο λιστερίωσης, ειδικότερα τα

καπνιστά προϊόντα κάπνισης υπό ψύξη (Ericsson et al 1997). Τα επίπεδα μόλυνσης στα καπνισμένα ψάρια από *Listeria monocytogenes* είναι χαμηλά ( $<10^2$  cfug<sup>-1</sup>), αλλά μπορεί περιστασιακά να περιέχουν βιώσιμο αριθμό βακτηρίων που κυμαίνονται από  $10^4$  έως  $10^6$  cfug<sup>-1</sup> (Gombas et al 2003). Ο FDA προβάλλει ως προαπαιτούμενο την απουσία του *Listeria monocytogenes* στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, οπότε οι περισσότερες χώρες και οργανισμοί απαιτούν την απουσία της στα 25g δείγματος. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει το όριο κάτω των  $100$  cfug<sup>-1</sup> για επιλεγμένα τρόφιμα τα οποία προορίζονται για βρέφη, ειδικά ιατρικούς σκοπούς και μηδενική ανοχή για άλλα τρόφιμα τα οποία ευνοούν την αύξηση της *Listeria monocytogenes* (EC 2005). Έτσι είναι εύκολο να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι τα έτοιμα προς κατανάλωση αλιευτικά προϊόντα είναι απαγορευτικό να έχουν *Listeria monocytogenes* ανά 25g καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους (Lin H. et al 2008).

#### *Clostridium botulinum*.

Το *Clostridium botulinum* είναι ένα αναερόβιο θετικό κατά Gram βακτήριο το οποίο παράγει σπόρια που σχηματίζουν ράβδο και βρίσκονται συνήθως σε φυτά, στο έδαφος, το νερό και τις εντερικές οδούς των ζώων (Nigam and Nigam 2010). Πιο συγκεκριμένα, στο θαλάσσιο περιβάλλον συναντάται σε αφθονία σε μέρη του σώματος των ψαριών (σπλάχνα, βράγχια) και στα ιζήματα. Η ανάπτυξη του *Clostridium botulinum* επηρεάζεται κυρίως μέσω της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης NaCl, τα νιτρώδη άλατα, το pH, τη σύνθεση και μικροχλωρίδα των τροφίμων καθώς και την ενεργότητα νερού. Το παθογόνο αυτό βακτήριο παράγει οκτώ (8) αντιγονικά διακριτές εξωτοξίνες (A, B, C1, C2, D, E, F, και 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). Οι Southcott και Razzel (1973) επισημαίνουν στην ερευνά τους ότι τα καπνιστά αλιεύματα θερμικής επεξεργασίας έχουν υψηλότερο ρίσκο για ανάπτυξη *Clostridium botulinum* τύπου E συγκριτικά με τη χρήση κάπνισης ψυχρής επεξεργασίας, καθώς η θερμή επεξεργασία πυροδοτεί την ενεργοποίηση των σπορίων.

### *Salmonella* spp.

Η *Salmonella* spp. είναι ένα αρνητικό Gram βακτήριο που φέρει περιφερειακά μαστίγια και αποτελεί μικροβιακή πηγή κινδύνου στα προϊόντα καπνιστού ψαριού και οστρακοειδών (Maxine et al 1998, Ogwang et al 2004). Οι Maxine et al (1998) ανέφεραν ότι σε 156 δείγματα καπνιστών ψαριών τα 47 είχαν επίπτωση από *Salmonella*. Η εμφάνιση της στα θαλασσινά είναι υψηλότερη σε χώρες του κεντρικού Ειρηνικού, της Αφρικής και της βόρειας Αμερικής (Maxine et al., 2000). Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η *Salmonella* αναγνωρίστηκε ως η πιο συχνή αιτία για τροφοληθτηριάσεις που σχετίζονται με την κατανάλωση θαλασσινών στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1998 έως το 2004, αν και ο μικροοργανισμός δεν βρίσκεται φυσικά στο θαλάσσιο περιβάλλον (Yunle Huang et al 2012).

### **1.9 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας**

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης έξι διαφορετικών καπνών, που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων και στην βιομηχανία παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκαν 6 υγροί καπνοί σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση τους στην ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* Scott A. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε μηχανήμα μέτρησης οπτικής πυκνότητας, στο οποίο οι μεταβολές στις τιμές της οπτικής πυκνότητας έδωσαν την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού για κάθε συγκέντρωση καπνού.

### 2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.

#### Tryptone Soy Broth (TSB)

Το TSB είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης, το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων, όσο και αναερόβιων μικροοργανισμών. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας περιέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Διαδικασία παρασκευής :

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

#### Maximum Recovery Diluent (MRD).

Το MRD (0,85% W/V + 1% peptone) είναι ισοτονικό ωσμωρυθμιστικό διάλυμα, παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων για τη μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων. Διαδικασία παρασκευής :

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

### 2.3 Καπνοί.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν 6 καπνοί σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση τους στην ανάπτυξη του στελέχους *Listeria monocytogenes* Scott A. Η προετοιμασία τους γινόταν με προσθήκη των επιθυμητών ποσοτήτων κάθε καπνού σε 10 ml TSB. Οι συγκεντρώσεις τους ήταν οι εξής :

ΚΑΠΝΟΙ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (% v/v)		
L9	0,05%	0,1%	0,15%
G6	0,1%	0,2%	0,35%
C3	0,5%	0,75%	1%
D4	0,5%	0,75%	1%
A1	0,6%	0,8%	1%
E5	0,6%	0,9%	1,2%

### 2.4 Αναζωογόνηση στελέχους *Listeria monocytogenes* Scott A.

Για τη σωστή διεξαγωγή του πειράματος, ήταν αναγκαία η αναζωογόνηση του στελέχους *Listeria monocytogenes* Scott A. από τους -80°C όπου φυλασσόταν υπό συνθήκες βαθιάς κατάψυξης. Αφού έγινε επώαση στους 37°C για 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 5000 rpm για διάρκεια 12 λεπτών, προκειμένου να ληφθεί βακτηριακό ίζημα. Έπειτα, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10 ml MRD και από εκεί έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες που

περιείχαν 9 ml MRD. Από αυτές χρησιμοποιηθήκαν οι αραιώσεις που αντιστοιχούσαν σε μικροβιακούς πληθυσμούς  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  cfu/ml

## 2.5 Πλήρωση μικροπλακών.

Η πλήρωση της κάθε μικροπλάκας 96 θέσεων (βοθρίων με επίπεδο πυθμένα)) γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 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, μαζί με 20 μl από τον κάθε βακτηριακό πληθυσμό ( $10^7, 10^5, 10^3$  cfu/ml). Επίσης, σε μία σειρά της μικροπλάκας προστέθηκαν 180 μl TSB χωρίς καπνό και 20 μl των διαφορετικών πληθυσμών του μικροοργανισμού, τα οποία αποτέλεσαν και τους μάρτυρες. Αφού έγιναν όλες οι παραπάνω ενέργειες, το plate τοποθετήθηκε στο Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader.

## 2.6 Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader.

Το μηχάνημα Reader είναι ένας αυτοματοποιημένος μετρητής οπτικής πυκνότητας. Η λήψη των μετρήσεων απορρόφησης γινόταν στα 580 nm κάθε 20 λεπτά, αφού προηγούνταν η ανακίνηση του plate για 10 δευτερόλεπτα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν για διάστημα 48 ωρών στους 30°C, ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Gen5 Data Analysis Software.

Τα αποτελέσματα αυτά ήταν το V max (ρυθμός αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού), καθώς και διαγράμματα με τις καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έδειξε επίδραση του καπνού στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στελέχους Scott A. Στις πυκνότητες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο υγρός καπνός παρατηρήθηκε αναστολή στην ταχεία αύξηση του μικροοργανισμού. Παρόλα αυτά ο κάθε καπνός είχε την δική του επίδραση και η δράση του διέφερε ανάλογα με τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό. Παρακάτω παρουσιάζονται τρεις (3) πίνακες με τις επιδράσεις των καπνών στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και τον χρόνο προσαρμογής (Lagtime) συνοπτικά για κάθε microplate καθώς επίσης και τα διαγράμματα των καπνών και τις συγκεντρώσεις καπνών: α) L9 0,1%, β) G6 0.35%, γ) C3 1%, δ) D4 0,75%, ε) A1 1% ζ) E5 0,9%.

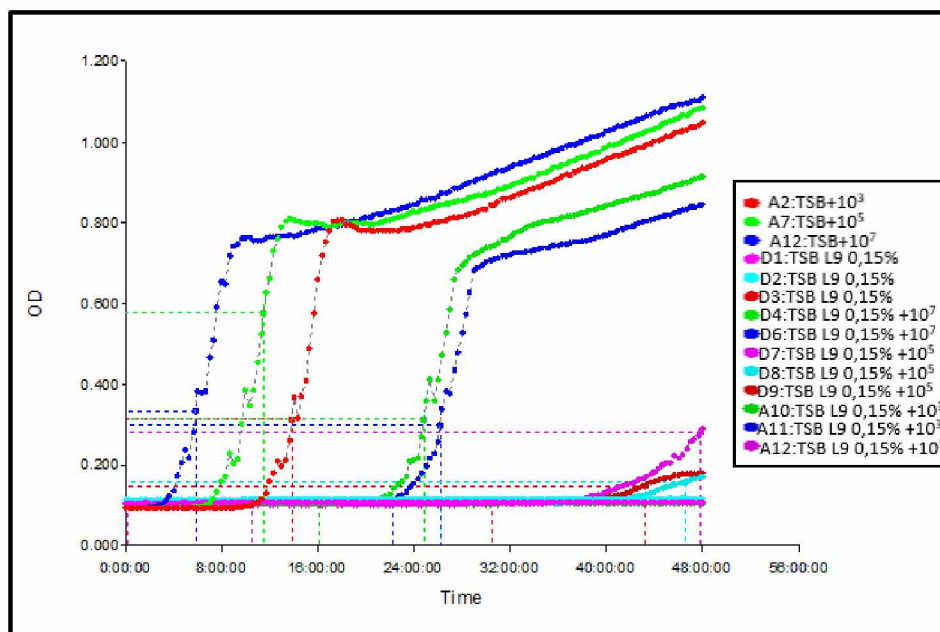
#### 3.1 Αποτελέσματα πρώτης ( $1^{ης}$ ) μικροπλάκας.

Όλες οι μετρήσεις της πρώτης ( $1^{ης}$ ) μικροπλάκας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν.3.1). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι L9 και G6 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των διαγραμμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

**Πίνακας 3.1 :** Σύνοψη 1<sup>ης</sup> μικροπλάκας : 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 .

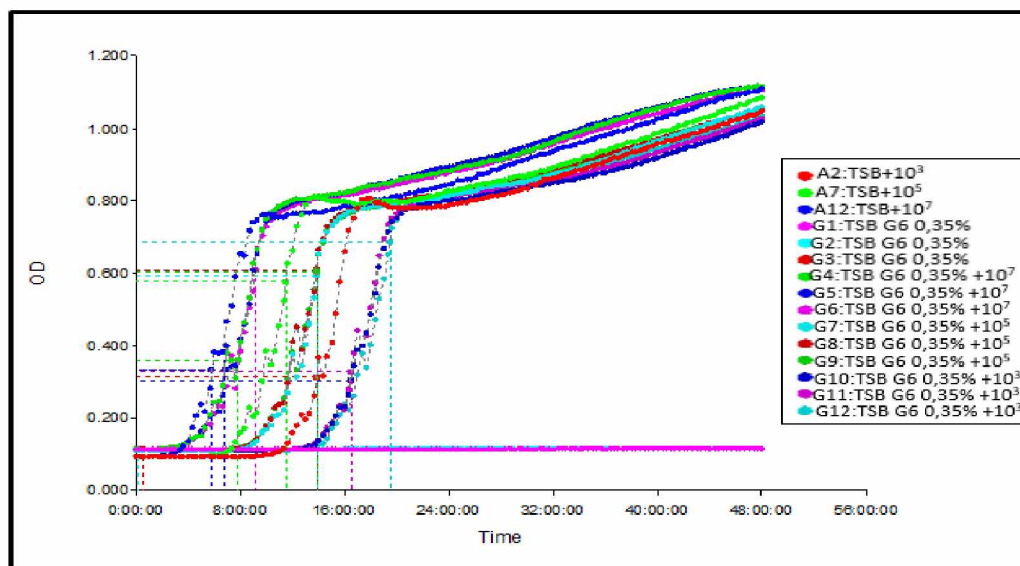
**Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.**

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	$10^3$	5,26	11,14
	$10^5$	5,28	6,98
	$10^7$	4,98	3,03
L9 0,05 %	$10^3$	5,36	14,17
	$10^5$	4,57	9,77
	$10^7$	5,08	4,02
L9 0,1 %	$10^3$	4,11	17,22
	$10^5$	4,11	10,50
	$10^7$	4,21	6,02
L9 0,15 %	$10^3$	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη	
	$10^5$	0,44	41,60
	$10^7$	4,28	23,08
G6 0,1 %	$10^3$	5,07	3,00
	$10^5$	5,42	6,74
	$10^7$	5,13	10,96
G6 0,2 %	$10^3$	4,22	2,85
	$10^5$	5,35	6,93
	$10^7$	5,02	11,06
G6 0,35 %	$10^3$	5,58	4,21
	$10^5$	5,85	9,05
	$10^7$	4,01	14,36



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

Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 23,08 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $4,28 \text{ h}^{-1}$ . Για τον αρχικό πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν κάτι λιγότερο από διπλάσιος (41,60 ώρες), σε σχέση με το αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του ήταν αισθητά μικρότερος ( $0,44 \text{ h}^{-1}$ ). Στην περίπτωση του αρχικού πληθυσμού  $10^3$  cfu/ml, η συγκέντρωση 0,15% του καπνού L9, είχε ανασταλτική δράση καθώς δεν καταγράφηκε η ανάπτυξή του. Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού.



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

Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 4,21 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $5,58 \text{ h}^{-1}$ . Για αρχικό τον πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν αυξημένος (9,05 ώρες), παρόλο που ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν του πληθυσμού  $10^7$  cfu/ml. Στον αρχικό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml η παρουσία του καπνού ήταν καθοριστική, αφού ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος (14,36  $\text{h}^{-1}$ ) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μικρότερος σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς ( $10^7, 10^5$  cfu/ml). Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, λόγω της ύπαρξης του καπνού.

### 3.2 Αποτελέσματα δεύτερης ( $2^{16}$ ) μικροπλάκας

Όλες οι μετρήσεις της δεύτερης ( $2^{16}$ ) μικροπλάκας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν.3.2). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα

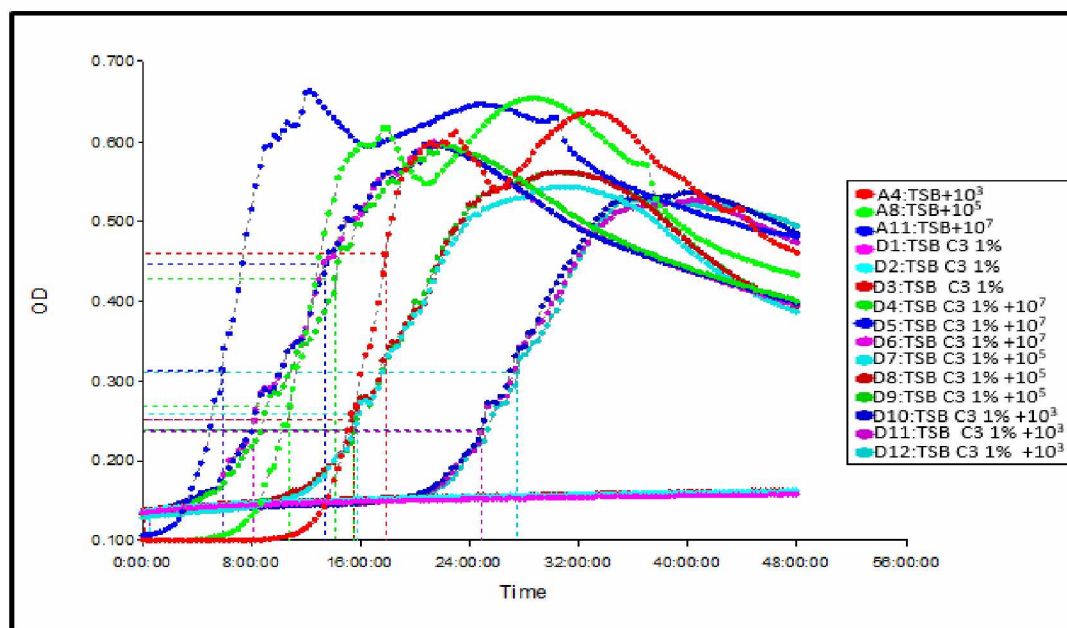


διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι C3 και D4 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των διαγραμμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

**Πίνακας 3.2:** Σύνοψη 2<sup>ης</sup> μικροπλάκας : 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 .

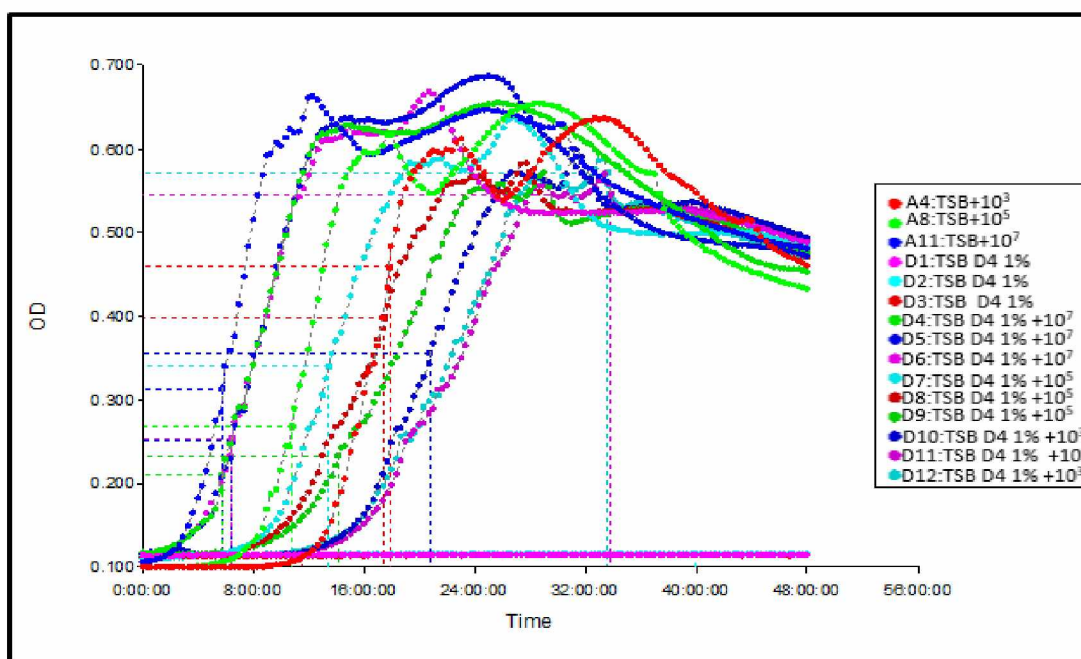
Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	10 <sup>3</sup>	2,76	11,09
	10 <sup>5</sup>	2,27	5,47
	10 <sup>7</sup>	2,47	1,41
C3 0,5 %	10 <sup>3</sup>	1,97	3,90
	10 <sup>5</sup>	1,82	9,88
	10 <sup>7</sup>	1,71	16,40
C3 0,75 %	10 <sup>3</sup>	1,40	3,12
	10 <sup>5</sup>	1,76	11,05
	10 <sup>7</sup>	1,61	18,86
C3 1 %	10 <sup>3</sup>	1,57	4,04
	10 <sup>5</sup>	1,38	11,94
	10 <sup>7</sup>	1,45	21,82
D4 0,5 %	10 <sup>3</sup>	2,33	1,23
	10 <sup>5</sup>	1,75	5,16
	10 <sup>7</sup>	1,39	13,13
D4 0,75 %	10 <sup>3</sup>	1,97	2,05
	10 <sup>5</sup>	1,85	5,15
	10 <sup>7</sup>	1,45	12,32
D4 1 %	10 <sup>3</sup>	1,96	2,15
	10 <sup>5</sup>	1,28	7,77
	10 <sup>7</sup>	1,30	12,36



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

Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml ήταν 4,04 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $1,57 \text{ h}^{-1}$ . Για αρχικό τον πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml, ο καπνός φαίνεται ότι έχει επιδράσει στο χρόνο προσαρμογής αφού είναι 11,94 ώρες ( $\text{M.O.}(t) 10^5 > \text{M.O.}(t) 10^5$  του μάρτυρα), ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξής του ήταν  $1,38 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{M.O.}(\mu_{\max}) 10^5 < \text{M.O.}(\mu_{\max}) 10^5$  του μάρτυρα). Στον αρχικό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml η διαφορά στο χρόνο προσαρμογής του μικροοργανισμού σε σύγκριση με τους προηγούμενους πληθυσμούς ( $10^7$ ,  $10^5$  cfu/ml) είναι φανερή (21,82 ώρες), παρόλο που ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι λίγο μεγαλύτερος ( $1,45 \text{ h}^{-1}$ ). Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι η διάρκεια του χρόνου προσαρμογής και των τριών πληθυσμών ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού.



**Σχήμα 3.2.2:** 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.

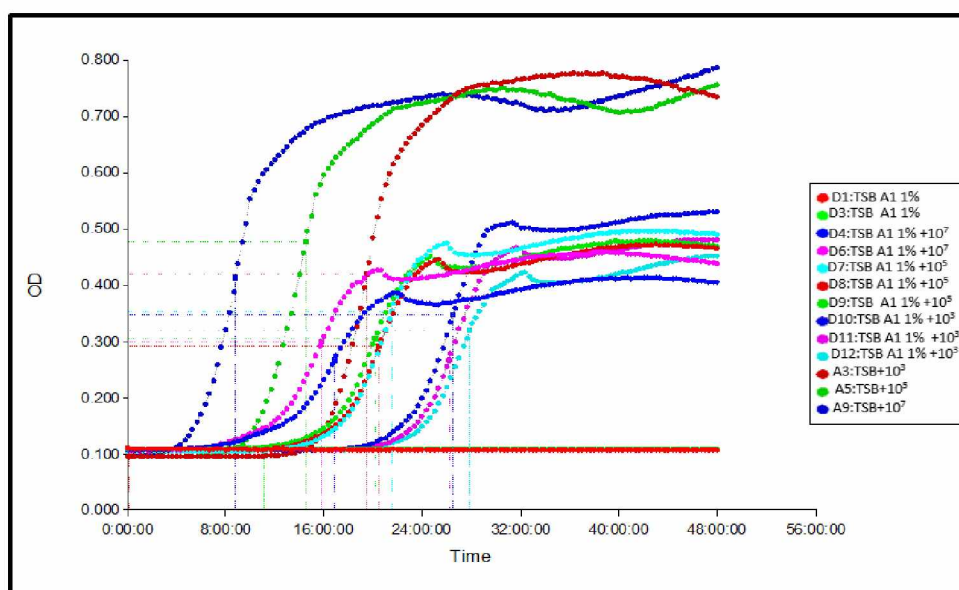
Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml είχε μέσο χρόνο προσαρμογής 2,15 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $1,96 \text{ h}^{-1}$ . Για τον αρχικό πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml ο μέσος χρόνος προσαρμογής του μικροοργανισμού ήταν μεγαλύτερος (7,77 ώρες), ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που καταγράφηκε ήταν μικρότερος ( $1,28 \text{ h}^{-1}$ ). Στον αρχικό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml είναι φανερό ότι ο καπνός έχει επιδράσει σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις ( $10^7, 10^5$  cfu/ml), αφού ο μέσος χρόνος προσαρμογής ήταν 12,36 ώρες ( $\text{M.O.}(t) 10^3 > \text{M.O.}(t) 10^5 > \text{M.O.}(t) 10^7$ ) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του στα ίδια επίπεδα με αυτόν του πληθυσμού  $10^5$  cfu/ml ( $1,30 \text{ h}^{-1}$ ). Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι όλες οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού.

### 3.3 Αποτελέσματα τρίτης (3<sup>ης</sup>) μικροπλάκας

Όλες οι μετρήσεις της τρίτης (3<sup>ης</sup>) μικροπλάκας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν.3.3). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι A1 και E5 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των διαγραμμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

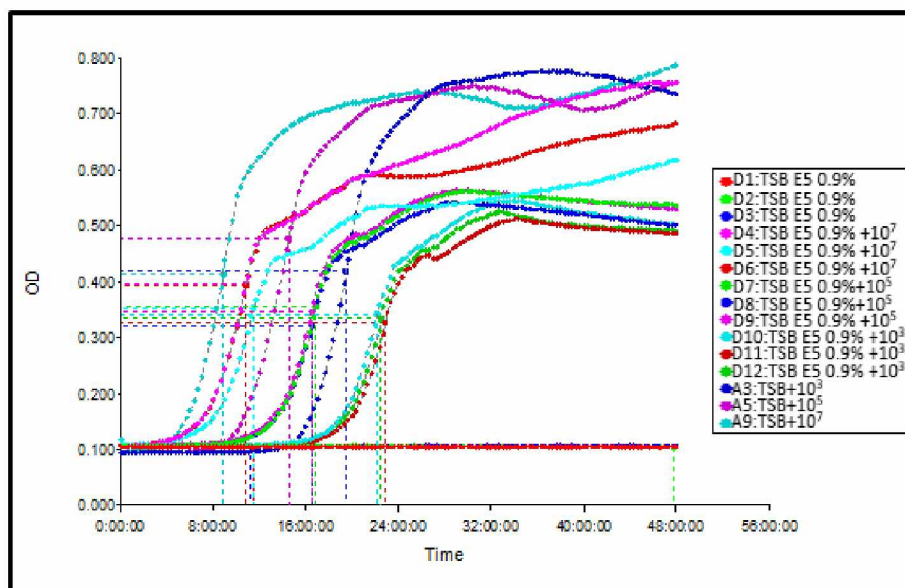
**Πίνακας 3.3:** Σύνοψη 3<sup>ης</sup> μικροπλάκας : Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης  $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$  και διάρκεια χρόνου προσαρμογής **Lagtime (h)** της *Listeria monocytogenes* σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων υγρών καπνών στους 30 °C . **Η κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων.**

Συγκεντρώσεις καπνών	Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (cfu/ml)	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lagtime (h)
0.0 % v/v (μάρτυρες)	$10^3$	2,25	16,11
	$10^5$	1,96	9,25
	$10^7$	2,55	5,76
A1 0,6 %	$10^3$	1,10	5,22
	$10^5$	1,18	16,51
	$10^7$	1,37	22,74
A1 0,8 %	$10^3$	1,22	7,30
	$10^5$	1,11	17,30
	$10^7$	1,25	21,61
A1 1 %	$10^3$	0,82	10,40
	$10^5$	1,11	16,57
	$10^7$	1,25	22,17
E5 0,6 %	$10^3$	2,29	5,39
	$10^5$	2,09	9,62
	$10^7$	2,34	14,57
E5 0,9 %	$10^3$	1,57	6,71
	$10^5$	1,74	11,41
	$10^7$	1,99	18,33
E5 1,2 %	$10^3$	1,95	5,86
	$10^5$	1,93	12,42
	$10^7$	1,60	18,61



**Σχήμα 3.3.1 :** Επίδραση του καπνού A1 συγκέντρωσης 1% v/v έναντι του *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε τρεις συγκεντρώσεις πληθυσμού ( $10^3$ ,  $10^5$  και  $10^7$  CFU/ml) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB στους 30 °C.

Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 10,40 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $0,82 \text{ h}^{-1}$ . Για τον αρχικό πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml, ο καπνός φαίνεται ότι έχει επιδράσει στο χρόνο προσαρμογής αφού είναι 16,57 ώρες ( $M.O.(t) 10^5 > M.O.(t) 10^5$  του μάρτυρα), παρόλο που ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν αυξημένος ( $1,11 \text{ h}^{-1}$ ) σε σχέση με τον προηγούμενο πληθυσμό. Στον αρχικό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml ο χρόνο προσαρμογής ήταν 22,17 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $1,25 \text{ h}^{-1}$ . Παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής μειώνεται καθώς ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξάνεται ( $M.O.(t) 10^3 > M.O.(t) 10^5 > M.O.(t) 10^7$ ). Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι όλες οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού.



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

Αρχικά, παρατηρούμε ότι η *Listeria monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό  $10^7$  cfu/ml χρειάστηκε μέσο χρόνο προσαρμογής 6,71 ώρες, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $1,57 \text{ h}^{-1}$ . Για τον αρχικό πληθυσμό  $10^5$  cfu/ml, ο μέσος χρόνο προσαρμογής είναι 11,41 ώρες ( $\text{M.O.}(t) 10^5 > \text{M.O.}(t) 10^7$ ) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $1,74 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{M.O.}(u) 10^5 > \text{M.O.}(u) 10^7$ ). Στον αρχικό πληθυσμό  $10^3$  cfu/ml ο μέσος χρόνο προσαρμογής έφτασε τις 18,33 ώρες και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ήταν  $1,99 \text{ h}^{-1}$ . Παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος προσαρμογής μειώνεται καθώς ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξάνεται ( $\text{M.O.}(t) 10^3 > \text{M.O.}(t) 10^5 > \text{M.O.}(t) 10^7$ ). Τέλος, γενικά παρατηρούμε ότι όλες οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες λόγω της ύπαρξης του καπνού.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη προπτυχιακή εργασία έγινε διερεύνηση της δυνατότητας επίδρασης έξι διαφορετικών καπνών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων – παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, ως προς την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στελέχους Scott A., ο οποίος ευθύνεται σε υψηλό βαθμό για τροφικές δηλητηριάσεις από την κατανάλωση κυρίως προϊόντων κρέατος (βοδινό), πουλερικών και θαλασσινών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μέσω της χρήσης της μεθόδου οπτικής πυκνότητας, ο καπνός πράγματι βρέθηκε να επιδρά στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στελέχους Scott A. Ωστόσο, η επίδραση του κάθε καπνού ήταν διαφορετική έναντι του *Listeria* ανάλογα με το είδος του καπνού και τον πληθυσμό του παθογόνου. Οι διαφορές αυτές πιθανόν προκύπτουν λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης σε καρβονύλια και τις φαινολικές ουσίες στους καπνούς αυτούς. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι το όργανο μέτρησης της οπτικής πυκνότητας δίνει σήμα - ένδειξη OD από τη στιγμή που οι πληθυσμοί φτάσουν το επίπεδο των  $10^6$  cfu/ml. Αυτό σημαίνει ότι για τους πληθυσμούς  $10^3$  και  $10^5$  cfu/ml η φάση προσαρμογής είναι η πραγματική, δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται ο πληθυσμός να αρχίσει να αυξάνεται συν ο χρόνος που χρειάζεται να φτάσει το επίπεδο  $10^6$  cfu/ml.

Οι Messina et al (1987), αναφέρουν τον τρόπο με τον οποίο ο καπνός επιδρά στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* Scott A, ο οποίος μελετήθηκε και στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση ενός καπνού καθορίζεται από την περιεκτικότητά του σε πολική φαινόλη, καθώς είναι μια ουσία που αυξάνει την αντιμικροβιακή του ιδιότητα. Στο πείραμα των Faith et

al(1992) εξετάστηκαν 11 φαινόλες του εμπορίου (συστατικά του υγρού καπνού), όπου μόνο η ισοεγενόλη ξεχώρισε για την ανασταλτική της δράση έναντι της *Listeria monocytogenes* στελέχους Scott A, ενώ τονίζουν ότι υπάρχουν και άλλες φαινόλες οι οποίες δε συμπεριλαμβάνονται στην εργασία τους, που μπορούν να ξεχωρίσουν για την αντιμικροβιακή τους δράση. Στην παρούσα μελέτη η αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στελέχους Scott A έγινε περισσότερο αντιληπτή από τον καπνό L9 0,15% στο μικροβιακό πληθυσμό  $10^3$  όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του οργανισμού αλλά και στον πληθυσμό  $10^5$  όπου και εκεί έγινε αντιληπτή η αναστολή της ανάπτυξης του. Οι καπνοί G6 0,35% , C3 1% , D4 1% , A1 1% και E9 0,9% δεν εμφάνισαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση. Στα πειράματα των Gutierrez et al(2009) και Chorianoopoulos et al (2006) όπου τον ρόλο του καπνού είχαν τα αιθέρια έλαια και το μικροβιακό στέλεχος ήταν το *L. monocytogenes*, τονίστηκε ότι οι συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών ουσιών πρέπει να είναι μικρές, καθώς σε πραγματική χρήση σε ένα προϊόν δεν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν μεγάλες συγκεντρώσεις αυτών λόγω της αλλοίωσης της οσμής και της όψης των τροφίμων.

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* υπάρχει παντού στο περιβάλλον, έτσι είναι εύκολο να εντοπιστεί τόσο σε αλιευτικά προϊόντα όσο και σε γαλακτοκομικά, κρεατικά και γενικά προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, ενώ είναι ευρέως γνωστό ότι η διασπορά του στα τρόφιμα γίνεται πιο συχνά κατά τη διάρκεια επεξεργασίας, συσκευασίας και διανομής των προϊόντων (Johnson et al 1989). Ασθένειες που προκαλούνται λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων από παθογόνα όπως ο *L. monocytogenes* προκαλούν μεγάλες επιπτώσεις στην οικονομία και στη δημόσια υγεία παγκοσμίως όπως αναφέρουν οι Gandhi et al (2007).



Βάσει όλων των παραπάνω, προκύπτει η ανάγκη εξασφάλισης της υγείας του καταναλωτή και η υγειονομική θωράκιση των προϊόντων. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, ο καπνός L9 σε συγκέντρωση 0,15% φαίνεται ότι έχει εκείνα τα χαρακτηριστικά που χρειάζονται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο πιο δραστικός καπνός ως προς τη *Listeria monocytogenes* στελέχους Scott A ήταν ο L9 σε συγκέντρωση 0,15% , όπου στον πληθυσμό  $10^3$  και  $10^5$  διαπιστώνεται αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, αφού στον πρώτο δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ενώ στον δεύτερο υπήρξε αισθητή μείωση της ανάπτυξης του.

Οι πληθυσμοί  $10^5$  και  $10^7$  είναι αποδεκτοί μόνο για την διεξαγωγή του πειράματος καθώς είναι αρκετά υψηλοί σε σύγκριση με τον πληθυσμό  $10^3$  που ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες.

Οι υπόλοιποι καπνοί δεν επέδρασαν ιδιαίτερα στην αύξηση του *L. monocytogenes* στελέχους Scott A. με αποτέλεσμα η επίδρασή τους να μην είναι αντιληπτή.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία.

Ben Embarek PK. (1994), Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafood's: a review. Intl J Food Microbiol.

Dalgaard P. (1995), Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. International Journal of Food Microbiology.

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.

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. International Journal of Hygiene and Environmental Health, Pages 435-444.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2013), The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA Journal 2013 11(4);3129:1–250 Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129.htm>.

EC (2005), Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of the European Parliament and the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

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.

Gandhi, Michael L., Chikindas (2007), *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology, Pages 1-15.

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.



Gram, L. (2001), Potential hazards in cold-smoked fish: *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection.

Harbell S., (1988), Controlling seafood spoilage.

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 Int Veit, J.H.J. (1996), Microbial and biochemical spoilage of foods. International Journal of Food Microbiology.

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.

J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke (2009), Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology, Pages 142-150.

Jorgensen LV, Huss HH. (1998), Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. International Journal of Food Microbiology.

Katerina Belichovska, Daniela Belichovska, Zlatko Pejkovski (2019), Smoke and smoked fish production. Scientific Journal "Meat Technology" , 60(1), 37-43.

Lin H., Jiang J., Li D. (2008), Potential Hazards in Smoke-Flavored Fish. Journal of Ocean University of China.

Liston, J. (1980), Microbiology in fishery science. Food and agriculture organization of the united nations.

Mansoor Jami, Mahdi Ghanbari, Marija Zunabovic, Konrad J. Domig, and Wolfgang Kneifel (2014), *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.

Maxine L. Heinitz and Janelle M. Johnson (1998), The Incidence of *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, and *Clostridium botulinum* in Smoked Fish and Shellfish. Journal of Food Protection.

Maxine L. Heinitz Ramona D. Ruble Dean E. Wagner Sita R. Tatini (2000), Incidence of *Salmonella* in Fish and Seafood. Journal of Food Protection.

Moon Dutta , Priyanka Rani Majumdar, Md. Rakeb-Ul-Islam and Debasish Saha (2018), Bacterial and Fungal Population Assessment in Smoked Fish during Storage Period. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*.

Maria C. Messina, Hamdi A. Ahmad, John A. Marchello, Charles P. Gerba and Michael W. Paquette (1987), the effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*.

Nancy G. Faith, Ahmed E. Yousefi and John B. Luchansky (1992), inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. *Journal of Food Safety*, Pages 303-314.

N.G. Chorianopoulos, R.J.W. Lambert, P.N. Skandamis, E.T. Evergetis, S.A. Haroutounian and G.-J.E. Nychas (2006), A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *Journal of applied microbiology*, Pages 778-786.

Ogwan'g Vincent Odhiambo, Mucai Muchiri, and Patel Thakor (2004), Investigation of bacteriological quality of smoked fish. EAC Information Repository.

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

Romeo T. Toledo (2008), Wood smoke components and functional properties. *International Smoked Seafood Conference Proceedings 55 Alaska Sea Grant College Program*.

Southcott B. A., Razzell W. E. (1973), *Clostridium botulinum* control in cold-smoked salmon: a review. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*.

Yunle Huang, Vinayak Ghate, Leslie Phua, Hyun-Gyun Yuk (2012), Prevalence of *Salmonella* and *Vibrio* spp. in seafood products sold in Singapore. *Journal of Food Protection*.

Ελληνική Βιβλιογραφία.

Αικατερίνη Ι. Κορδιλιά (2009), Αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*) κατά την αποθήκευση της σε διάφορες θερμοκρασίες. Διπλωματική Εργασία για το Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών.

Μπλούκας Ιωάννη Γ. (2004) Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη ΑΕ Αθίνα 2004.

Καλλίγαρος Παναγιώτης (2004), Η ιστορία της Ελληνικής αλιείας κατά την τελευταία δεκαετία του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Διπλωματική Εργασία για το Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών.

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

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

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



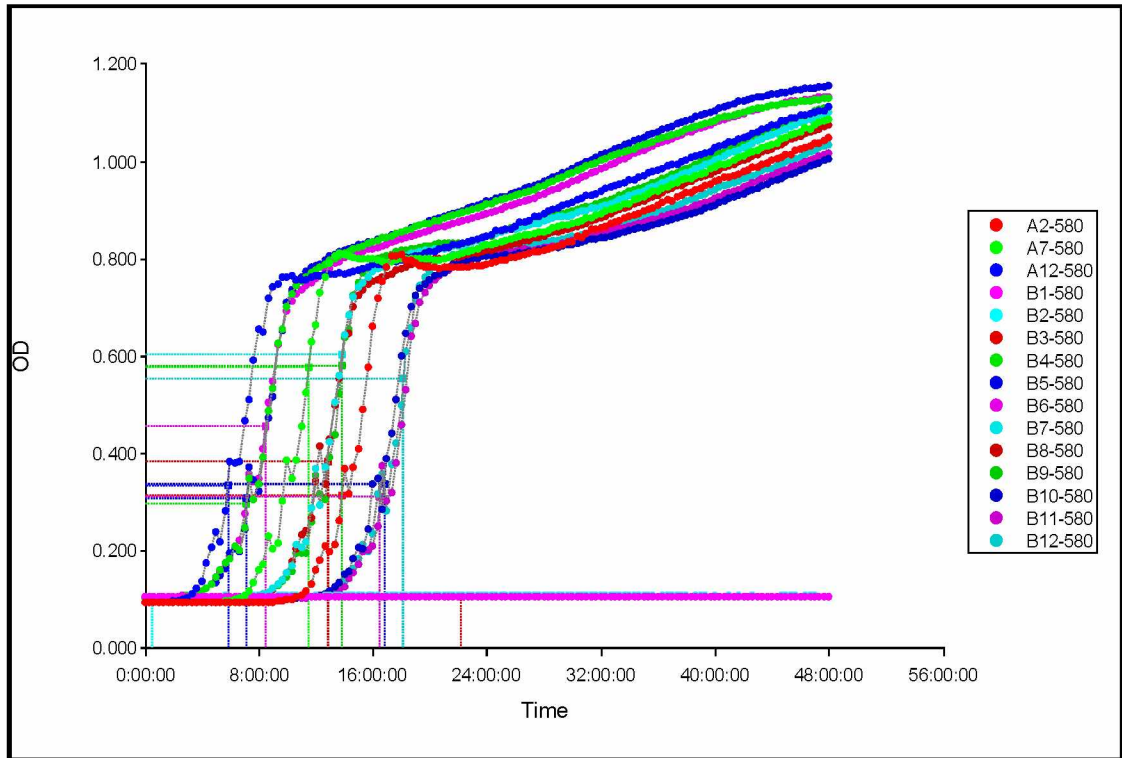
## ABSTRACT

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

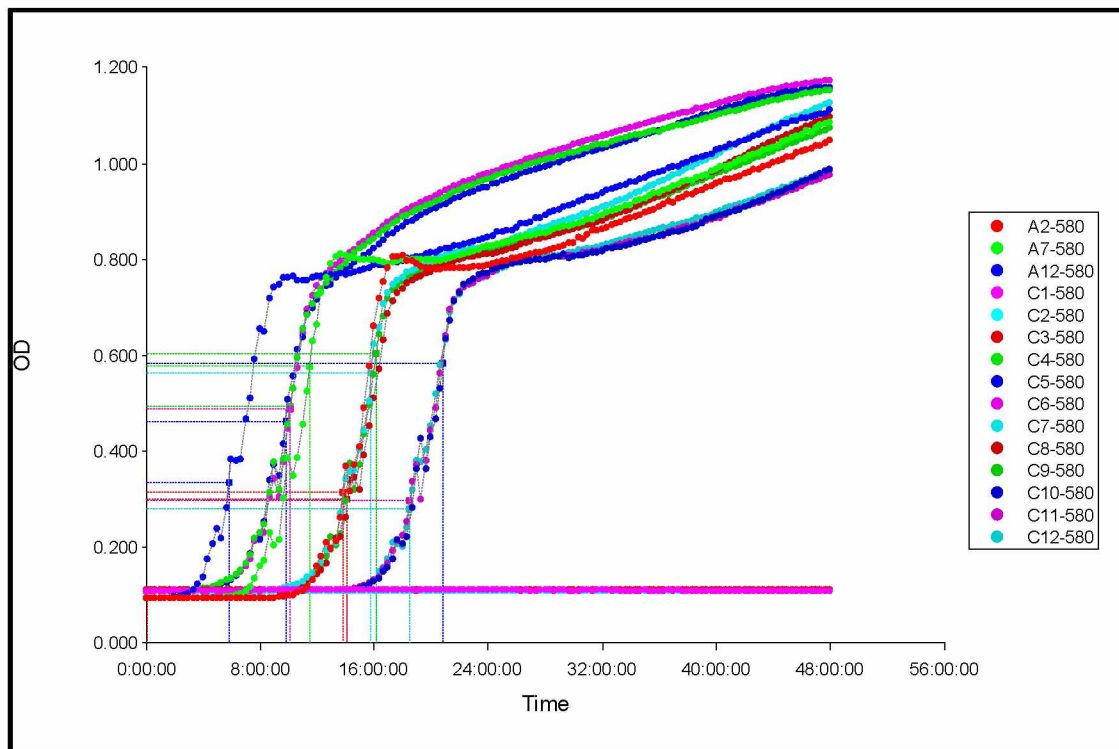
**Keywords:** smoke, liquid smoke, *Listeria monocytogenes*, optical density.



## Παραρτήματα.

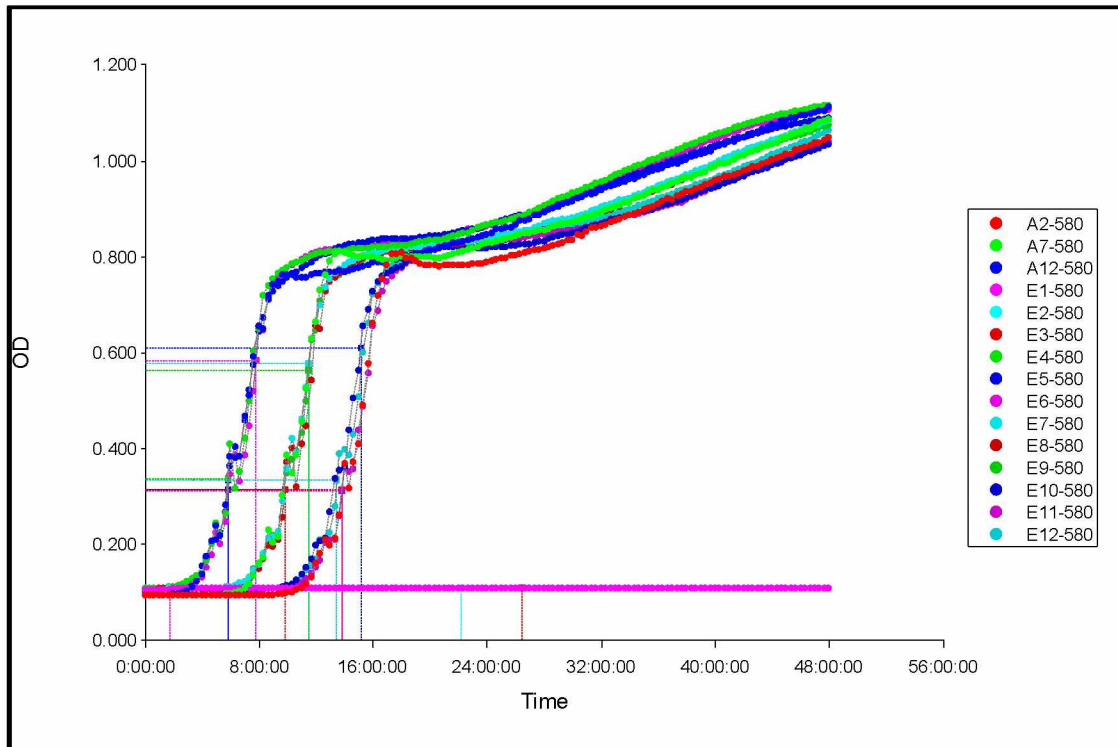


Εικόνα : L9 0,05%

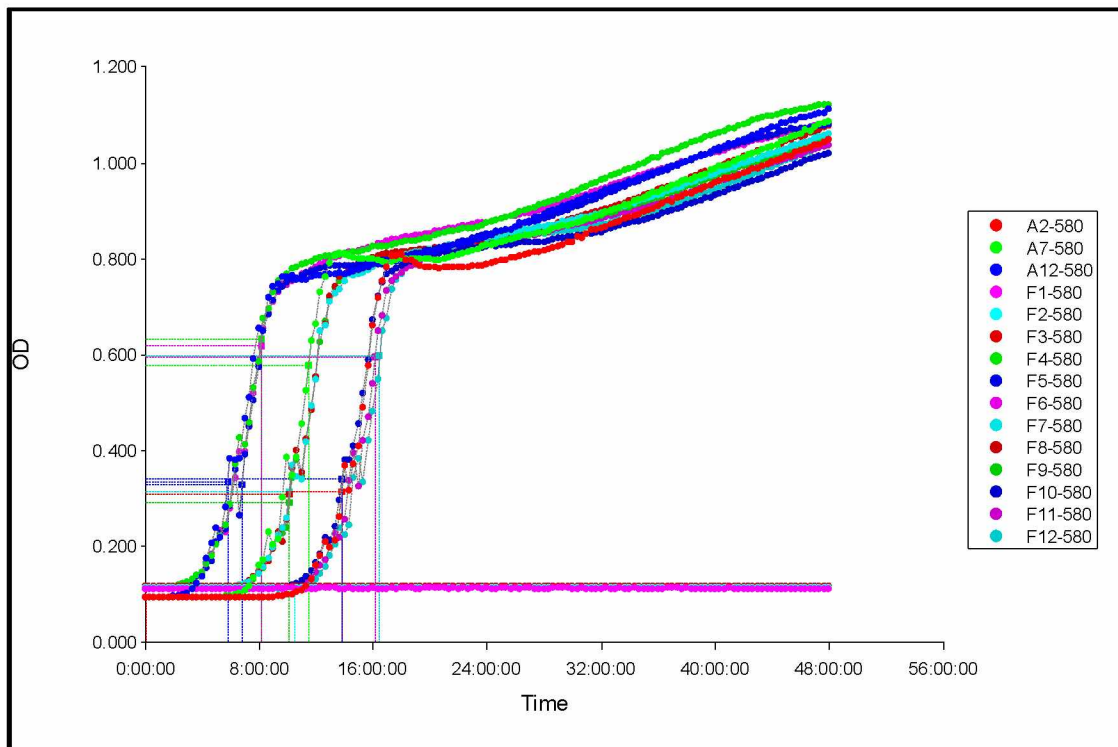




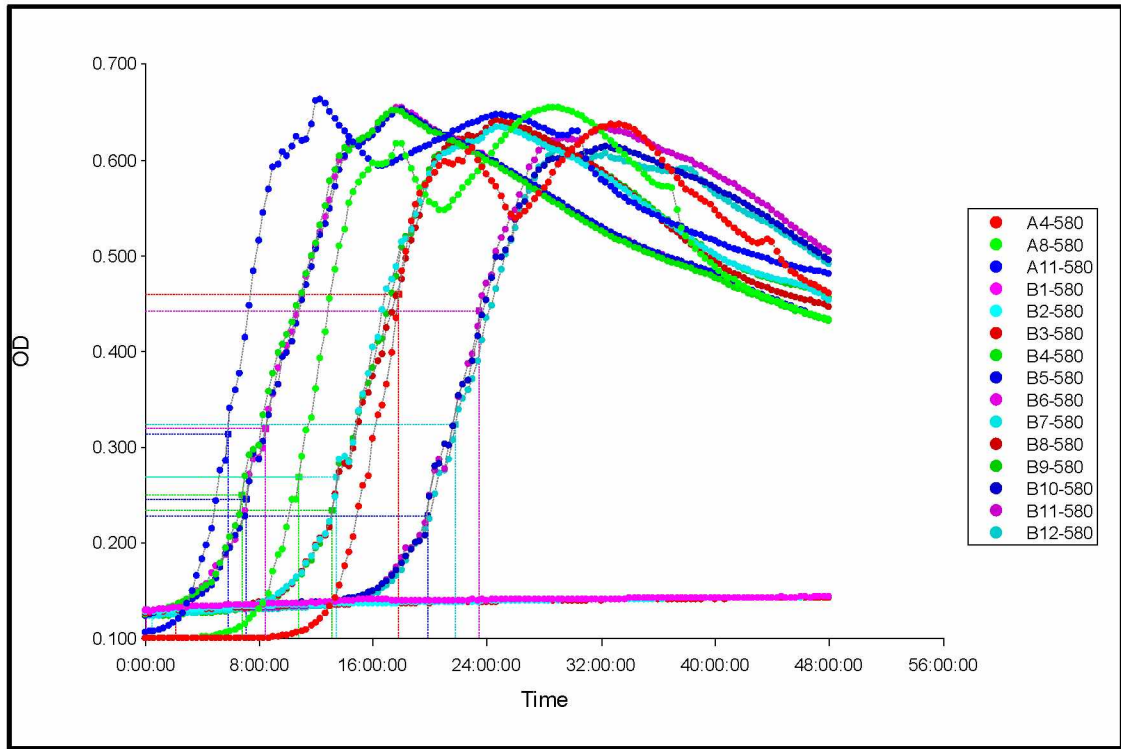
Εικόνα : L9 0,1%



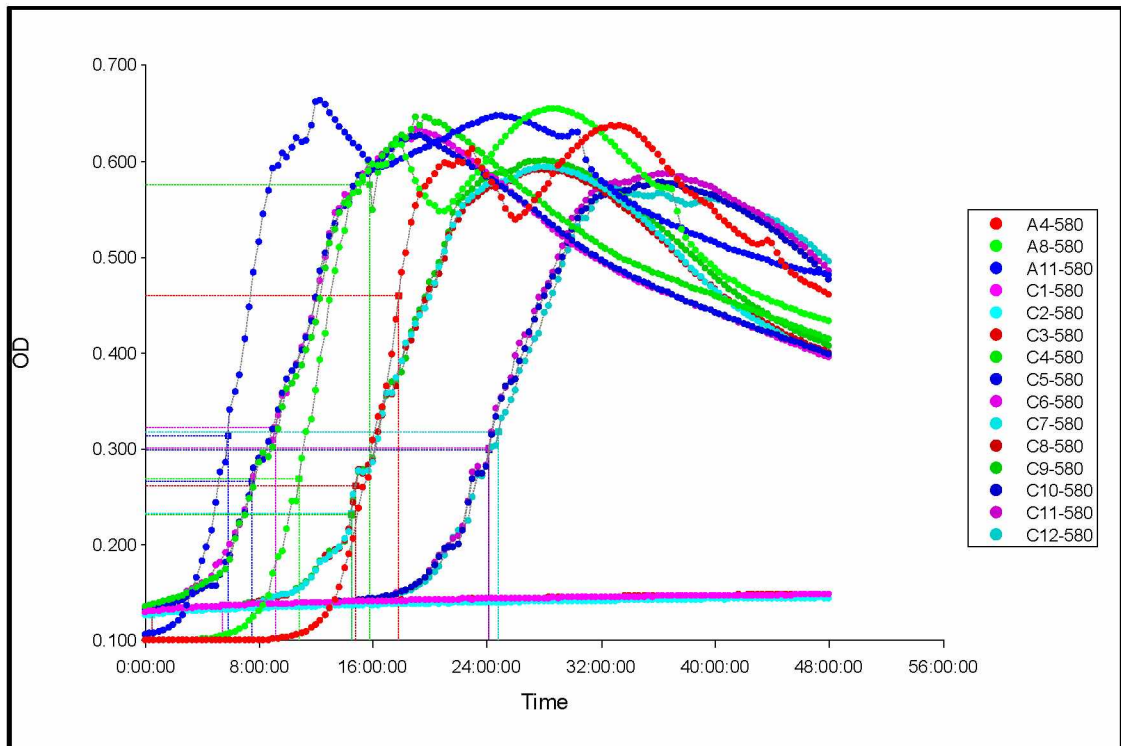
Εικόνα : G6 0,1%



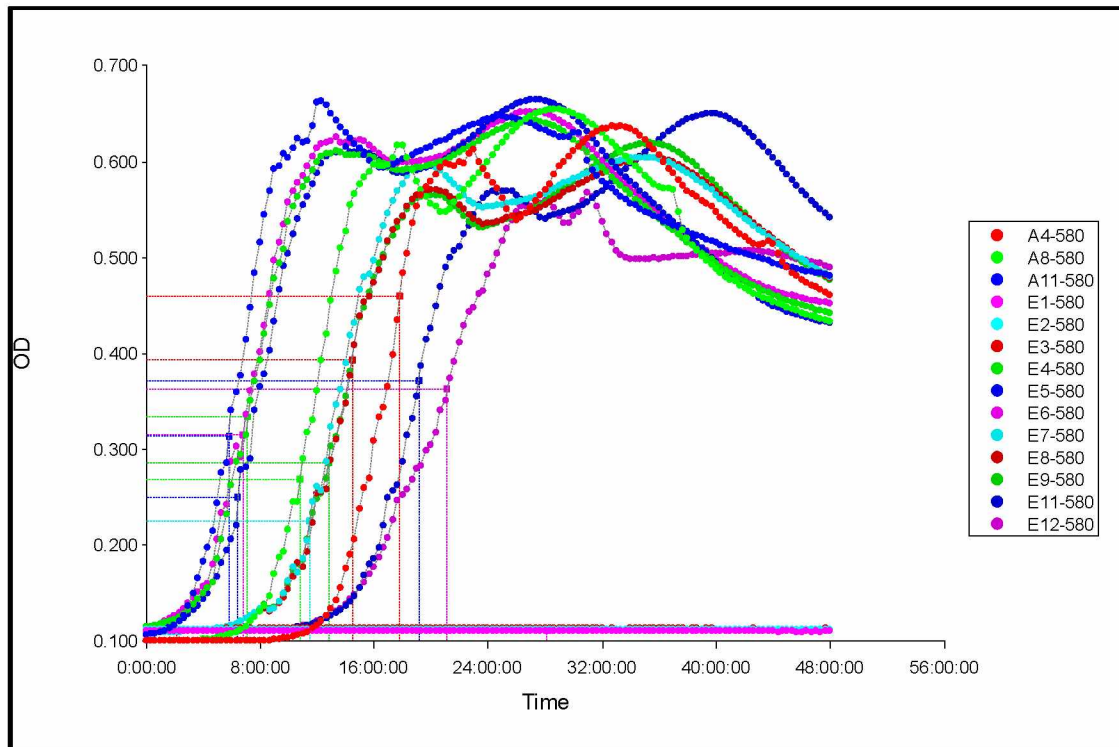
Εικόνα : G6 0,2%



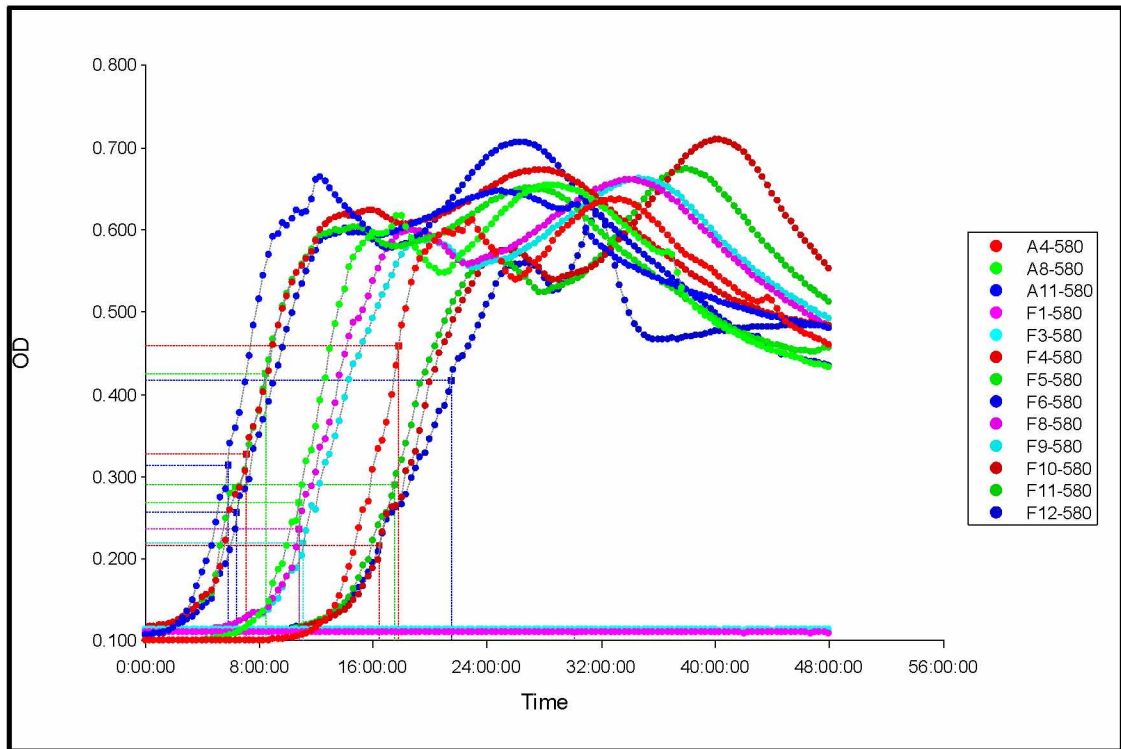
Εικόνα : C3 0,5%



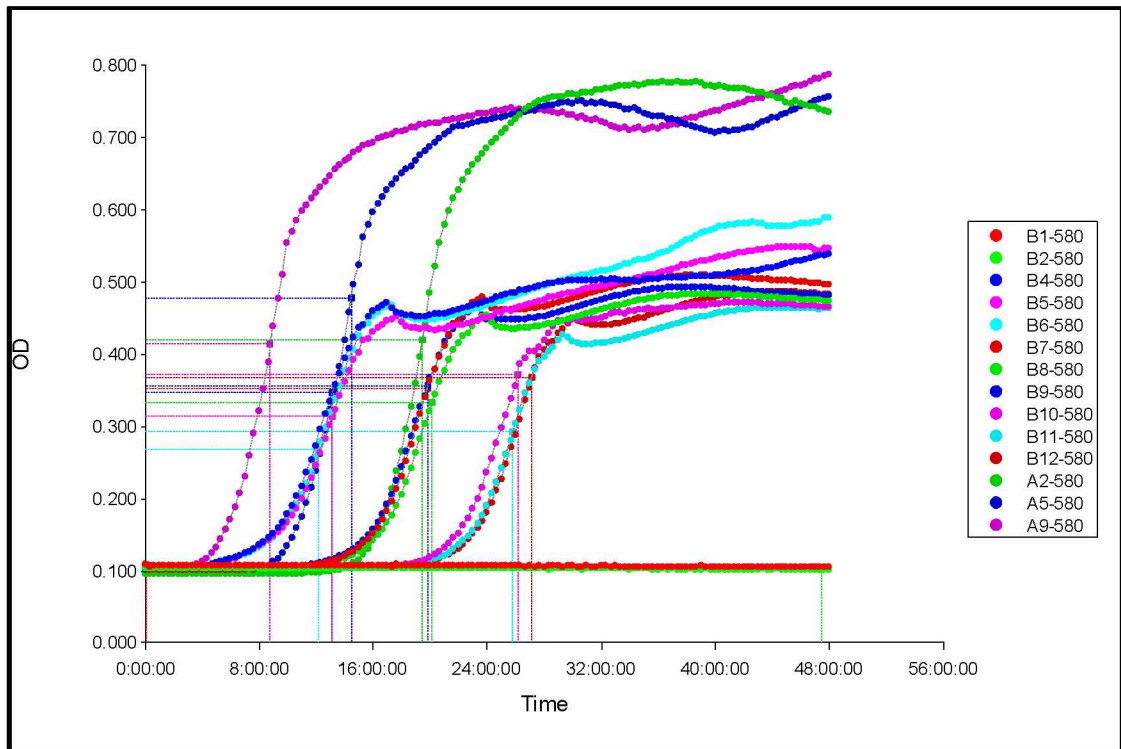
Εικόνα : C3 0,75%



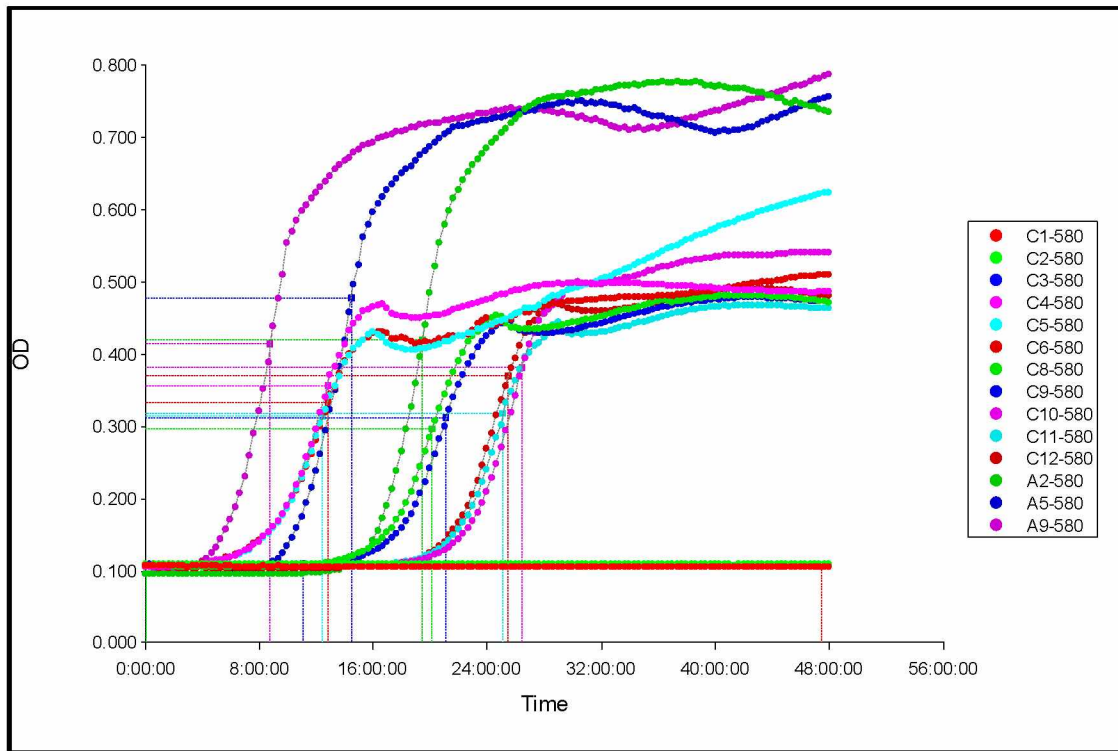
Εικόνα : D4 0,5%



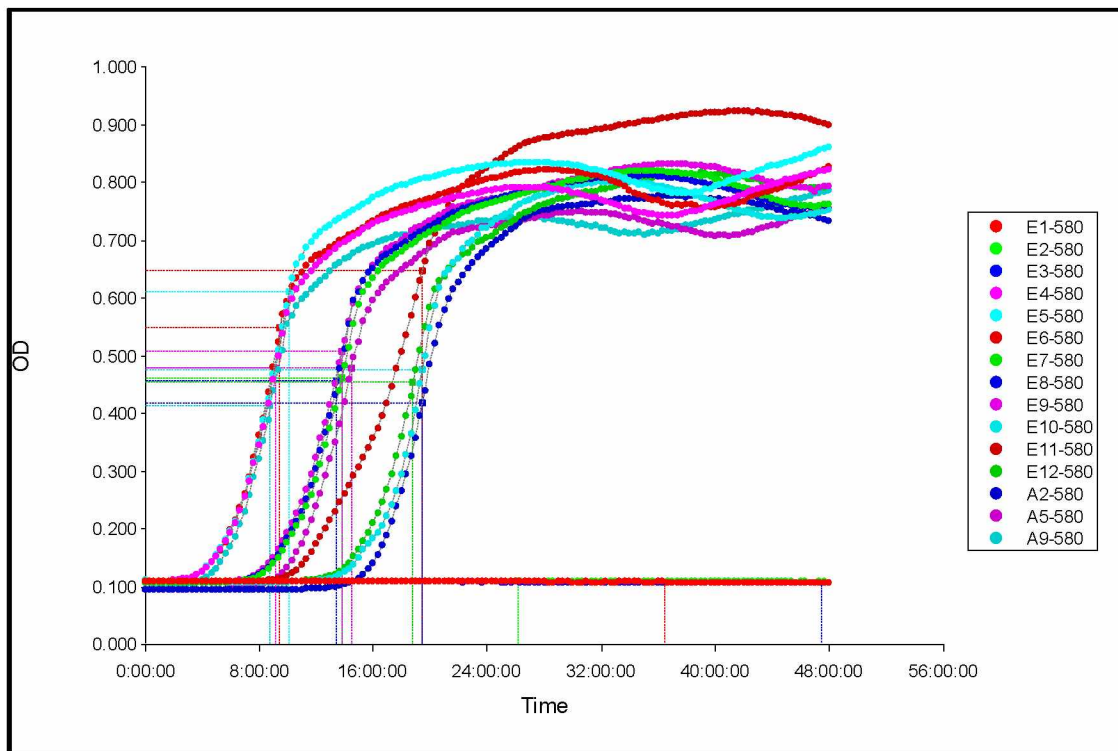
Εικόνα : D4 0,75%



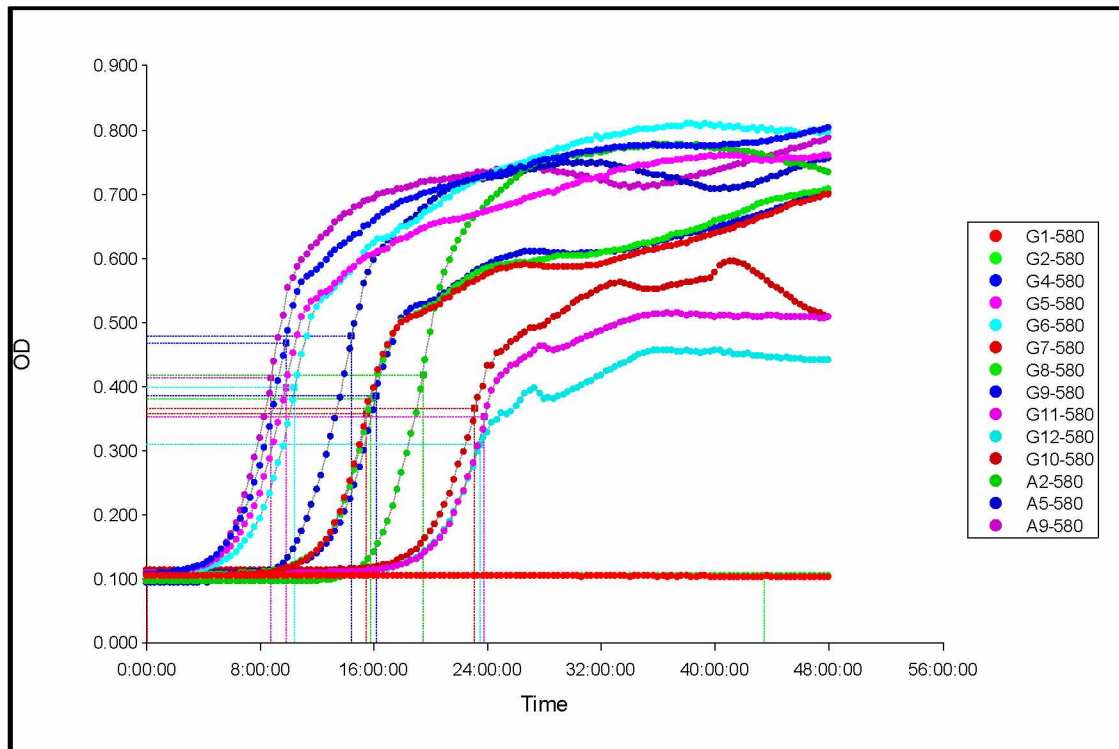
Εικόνα : A1 0,6%



Εικόνα : A1 0,8%



Εικόνα : E5 0,6%



Εικόνα : E5 1,2%