

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΝΙΣΙΝΗΣ ΣΕ ΒΟΕΙΟ ΚΡΕΑΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Μ. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του
Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2007

Στη μητέρα μου

Στον πατέρα μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και μίγματός τους κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* σε θρεπτικό ζωμό στους 37 ° C για 32 ώρες ήταν ασθενής σε συγκέντρωση 0.3%, ενώ ήταν ισχυρή στις συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9%. Η συνεργός αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων παθογόνων της προσθήκης των συνδυασμών των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη (500 ή 1000 IU/ml) ήταν εμφανής κατά κύριο λόγο στη συγκέντρωση 0.3% των αιθέριων ελαίων.

Τα εξετασθέντα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (οσμή, γεύση και συνολική αποδοχή) της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και μίγματός τους (σε ίσες αναλογίες) σε συγκεντρώσεις 0.3 και 0.6% και της ρίγανης 0.9% παρέμειναν αποδεκτά από τους δοκιμαστές καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη, σε αντίθεση με εκείνα της προσθήκης των αιθέριων ελαίων θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.9% που δεν ήταν αποδεκτά.

Για όλα τα αιθέρια έλαια οι συγκεντρώσεις 0.3% δεν επιλέχθηκαν να μελετηθούν στο μυττωτό βοείου κρέατος, γιατί παρουσίασαν ασθενή αντιμικροβιακή δράση στο TSB, ενώ αντίστοιχα για τα αιθέρια έλαια θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων οι συγκεντρώσεις 0.9% δεν επιλέχθηκαν, γιατί εμφάνισαν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που δεν ήταν αποδεκτά στον οργανοληπτικό έλεγχο.

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της προσθήκης των αιθέριων ελαίων, της νισίνης και του συνδυασμού τους σε «στείρο» μυττωτό βόειου κρέατος κατά στελεχών των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και

Salmonella κατά τη συντήρησή του στους 4 και 10 °C για 12 ημέρες, περιελάμβανε τις εξής ομάδες:

- Απουσία αιθέριου ελαίου (μάρτυρες)
- της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης (0.6 και 0.9%), θυμαριού (0.6%), δενδρολίβανου (0.6%) και μίγματός τους (0.6 %)
- της προσθήκης της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g και
- της προσθήκης των συνδυασμών των αιθέριων ελαίων ρίγανης (0.6 και 0.9%), θυμαριού (0.6%), δενδρολίβανου (0.6%) και μίγματός τους (0.6 %) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g)

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση στο μυττωτό βοείου κρέατος κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων, η οποία ήταν ισχυρότερη κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) από εκείνη κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*Salmonella* και *E. coli* O157:H7).

Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης των αιθέριων ελαίων (0.6%) στο μυττωτό βόειου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής του κατά των εξετασθέντων παθογόνων θα μπορούσε να διαβαθμιστεί από την ισχυρότερη στην ασθενέστερη ως εξής:

- Για την *L. monocytogenes* και τον *S. aureus*: ρίγανη ή θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο.
- Για την *S. enteritidis* και το μίγμα στελεχών της *Salmonella*: ρίγανη > θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο.
- Για την *S. typhimurium*: ρίγανη > μίγμα των αιθέριων ελαίων > θυμάρι ή δενδρολίβανο.
- Για την *E. coli* O157:H7: ρίγανη > μίγμα αιθέριων ελαίων > θυμάρι > δενδρολίβανο.

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στα δείγματα μυττωτού βοείου κρέατος παρουσίασε μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων παθογόνων στους 10 °C , σε σχέση με αυτή στους 4 °C.

Επίσης η προσθήκη της νισίνης στο μυττωτό βοείου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση μόνο κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*). Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης βρέθηκε ότι εξαρτώταν από την προστιθέμενη συγκέντρωση, από τα στελέχη των παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και από τη θερμοκρασία συντήρησης.

Η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης (0.6 ή 0.9%) και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 4 και 10 °C παρουσίασε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων (*L. monocytogenes*, του *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) παρουσίασε συνεργό δράση κατά της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *S. enteritidis* όχι όμως κατά των στελεχών της *E. coli* O157:H7, της *S. typhimurium* και του μίγματος των στελεχών της *Salmonella*.

Διαφορές στην αντιμικροβιακή συμπεριφορά παρατηρήθηκαν μεταξύ των στελεχών ή του μίγματός τους των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus* και *Salmonella* κυρίως κατά την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) καθώς και της προσθήκης του συνδυασμού όλων των αιθέριων ελαίων 0.6% με τη νισίνη στις 500 και 1000 IU/g.

Λόγω της βακτηριοστατικής δράσης κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* της προσθήκης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) και του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη

(1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος πληρούνται τα μικροβιολογικά κριτήρια της Ε.Ε., που προβλέπουν πληθυσμούς του παθογόνου χαμηλότερους από 2 log cfu/g κατά τη συντήρηση στους 4 °C (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005). Η βακτηριοκτόνος δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και της *Salmonella* της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη στις 500 ή στις 1000 IU/g στο μυττωτό βοείου κρέατος πληρεί τα μικροβιολογικά όρια στα τρόφιμα που έχουν τεθεί από την Ε.Ε. τόσο για τη *L. monocytogenes* (< 2 log cfu/g) όσο και για τη *Salmonella* (απουσία στα 25 g) κατά τη συντήρηση στους 4 °C (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005).

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF HERBS
ESSENTIAL OILS AND NISIN ADDED IN
BEEF MEAT**

NIKOLAOS M. SOLOMAKOS

Veterinarian

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin of the
Faculty of Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa. Greece 2007

ABSTRACT

The antimicrobial effect of oregano, thyme, rosemary essential oils and their mixture, nisin at 500 or 1000 IU/g, and their combinations, on *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in tryptic soy broth (TSB) during incubation at 37 °C for 32 h was weak at the concentration of 0.3%, but high at the levels of 0.6 and 0.9%. Due to strong antimicrobial activity presented by the essential oils at 0.6 and 0.9% in TSB, the synergistic activity against the tested pathogens was only evident for the combinations with nisin at 500 or 1000 IU/g and the essential oils at 0.3%.

Sensory evaluation revealed that the organoleptic properties of minced beef meat treated with oregano, thyme, rosemary essential oils and their mixture at the supplementation levels of 0.3 and 0.6% and also oregano at 0.9% were acceptable by the panelists. In contrast, the organoleptic properties of thyme, rosemary essential oils and the mixture of all the essential oils at 0.9% were not acceptable by the panelists.

The antibacterial efficacy of all the essential oils at 0.3% in minced beef meat was not examined, since pertinent results in TSB showed a weak antibacterial activity against the examined pathogens, whereas the addition of thyme, rosemary and the mixture of the essential oils at 0.9% were also not examined because organoleptic study showed unacceptable organoleptic properties in minced meat.

The antimicrobial effect against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* of the essential oils, nisin and their combinations were studied in minced beef meat during refrigerated storage at 4 or 10 °C 12 days and were studied in the following treatment groups:

- No addition of essential oils, nisin or their combinations

- Addition of oregano essential oil at 0.6 or 0.9%, thyme essential oil at 0.6%, rosemary essential oil at 0.6% or their mixture at 0.6%,
- Addition of nisin at 500 or 1000 IU/g and
- Addition of combinations of oregano essential oil at 0.6 or 0.9%, thyme essential oil at 0.6%, rosemary essential oil at 0.6% or their mixture at 0.6% with nisin at 500 or 1000 IU/g,

The addition of the essential oils at 0.6% in beef meat presented an inhibitory activity against all tested pathogens, which was higher at 10 than 4 °C of storage.

An inhibition activity of nisin against Gram-positive pathogens (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) was observed in minced beef meat. This activity was found to depend on the concentration level of nisin, the strains used, as well as the storage temperature.

The addition of the combination of oregano essential oil (0.6% and 0.9%) or thyme essential oil (0.6%) with nisin (500 or 1000 IU/g) in minced beef meat during storage at 4 or 10 °C showed synergistic activity against all tested pathogens (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella*). The addition of the combination of rosemary essential oil (0.6%) with nisin (500 or 1000 IU/g) presented synergistic activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. enteritidis*, but not against *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and cocktail strains *Salmonella*.

Differences in antimicrobial behavior were observed among the strains of the pathogen or their mixture mainly by the addition of oregano essential oil (0.9%) as well as by the addition of the combination of all examined essential oils with nisin at 500 and 1000 IU/g.

Due to bacteriostatic activity against the examined strains of *L. monocytogenes* of the addition of oregano essential oil (0.9%) and the combinations of oregano or thyme essential oil (0.6%) with nisin (500 IU/g) in minced beef meat, the microbiological criteria of E.U. ($<2 \log \text{ cfu/g}$) for this pathogen in meat are fulfilled (EU directive 2073, 2005). The bactericidal activity of the addition of the combination of oregano essential oil (0.9%) with nisin at 500 or 1000 IU/g in minced beef meat are in accordance with the microbiological criteria of E.U. for *L. monocytogenes* ($<2 \log \text{ cfu/g}$) or *Salmonella* (absence in 25 g) during storage at 4 °C (EU directive 2073, 2005).

ADVISOR COMMITTEE

A. Govaris, Associate Professor Supervisor

Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly

P. Koidis, Professor Member of advisor committee

Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, School of Veterinary Medicine, Aristotle
University of Thessaloniki

N. Botsoglou, Professor Member of advisor committee

Laboratory of Animal Nutrition, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of
Thessaloniki.

EXAMINATION BOARD

Professor F. Athanassopoulou Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly

Professor I. Amvrosiadis School of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki

Professor N. Botsoglou School of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki

Professor P. Koidis School of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki

Professor G. Papageorgiou Faculty of Medicine, Aristotle
University of Thessaloniki

Associate Professor A. Govaris Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly

Assistant Professor I. Pappas Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περίληψη	3
Συμβουλευτική Επιτροπή – Εξεταστική Επιτροπή	7
Abstract	9
Advisory Committee – Examination Board	12
Περιεχόμενα	13
Σκοπός	17
Ευχαριστίες	19
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο</u>	
Γενική Εισαγωγή	
1.1. Αιθέρια Έλαια	22
1.1.1 Εισαγωγή	22
1.1.2 Ιστορικά στοιχεία	22
1.1.3 Σύγχρονες χρήσεις	23
1.1.4 Εμπορική σημασία	24
1.1.5 Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα	27
1.2 Αιθέριο έλαιο ρίγανης	28
1.2.1 Ταξινόμηση	28
1.2.2 Ενεργά συστατικά	28
1.2.3 Αντιμικροβιακή δράση	29
1.2.4 Αντιμυκητιακή δράση	34
1.2.5 Αντιοξειδωτική δράση	35
1.2.6 Άλλες ιδιότητες	36
1.3 Αιθέριο έλαιο θυμαριού	37
1.3.1 Ταξινόμηση	37

1.3.2	Ενεργά συστατικά	37
1.3.3	Αντιμικροβιακή δράση	38
1.3.4	Αντιμυκητιακή δράση	41
1.3.5	Αντιοξειδωτική δράση	41
1.4	Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου	43
1.4.1	Ταξινόμηση	43
1.4.2	Ενεργά συστατικά	43
1.4.3	Αντιμικροβιακή δράση	44
1.4.4	Αντιμυκητιακή δράση	46
1.4.5	Αντιοξειδωτική δράση	46
1.4.6	Άλλες ιδιότητες	47
1.5	Νισίνη	48
1.5.1	Εισαγωγή	48
1.5.2	Αντιμικροβιακή δράση	50
1.5.3	Χρήση της νισίνης σε ορισμένα ζωικά τρόφιμα	53
1.6	Παθογόνοι μικροοργανισμοί	58
1.6.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	58
1.6.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	61
1.6.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	64
1.6.4	<i>Salmonella</i>	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων και του συνδυασμού τους με νισίνη *in vitro*

2.1	Εισαγωγή	69
2.2	Υλικά και Μέθοδοι	70
2.2.1	Παθογόνα βακτήρια	70
2.2.2	Παρασκευή των αιθέριων ελαίων	71

2.2.3	Παρασκευή των διαλυμάτων νισίνης	72
2.2.4.	Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων σε ζωμό TSB	72
2.2.5.	Στατιστική επεξεργασία	74
2.3	Αποτελέσματα	75
2.3.1	Αιθέριο έλαιο ρίγανης	75
2.3.2	Αιθέριο έλαιο θυμαριού	82
2.3.3	Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου	89
2.3.4	Μίγμα των αιθέριων ελαίων	98
2.4	Συζήτηση	105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

3.1	Εισαγωγή	111
3.2	Υλικά και Μέθοδοι	112
3.2.1	Αιθέρια έλαια	112
3.2.2	Ομάδες δειγμάτων μυττωτού κρέατος	112
3.2.3	Οργανοληπτικός έλεγχος	113
3.2.4.	Στατιστική επεξεργασία	114
3.3	Αποτελέσματα	115
3.4	Συζήτηση	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων και του συνδυασμού τους με νισίνη σε μυττωτό βοείου κρέατος

4.1	Εισαγωγή	131
4.2	Υλικά και Μέθοδοι	132
4.2.1	Παθογόνα βακτήρια	132
4.2.2	Αιθέρια έλαια και νισίνη	132
4.2.3	Παρασκευή των δειγμάτων μυττωτού κρέατος	132

4.2.4	Μικροβιολογική ανάλυση	134
4.2.5.	Χημική ανάλυση	136
4.2.6.	Στατιστική επεξεργασία	136
4.3.	Αποτελέσματα	138
4.3.1	Χημική ανάλυση	138
4.3.2	Συμπεριφορά των παθογόνων βακτηρίων στους μάρτυρες	138
4.3.3	Αντιμικροβιακή δράση της νισίνης	139
4.3.4	Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης	141
4.3.5.	Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού	161
4.3.6.	Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου	179
4.3.7.	Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού και δενδρολίβανου	197
4.4.	Σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων	215
4.5	Συζήτηση	217
	Συμπεράσματα	229
	Βιβλιογραφικές παραπομπές	236

ΣΚΟΠΟΣ

Η επιμόλυνση του νωπού κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων του με κοινούς μικροοργανισμούς ή παθογόνα βακτήρια μπορεί να οδηγήσει τόσο σε απώλεια της ποιότητάς τους, όσο και σε κίνδυνο της υγείας των καταναλωτών. Η ψύξη αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο συντήρησης του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων. Για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων στην ψύξη, χρησιμοποιούνται διάφορα αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά χημικά πρόσθετα. Όμως τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες εγείρουν αμφιβολίες για την ασφαλή χρήση των χημικών προσθέτων στα τρόφιμα (Imaida και συν 1983, Chen και συν. 1992).

Τα βότανα και τα αιθέρια έλαια των βοτάνων χρησιμοποιούνται ως βελτιωτικά της γεύσης στο κρέας και τα κρεατοσκευάσματα για πολλά χρόνια. Η ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων των βοτάνων που φύονται στην Ελλάδα, όπως η ρίγανη, το θυμάρι και το δενδρολίβανο έχει εγείρει το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη χρήση τους στα τρόφιμα καθώς και στο κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, ως μια πιθανή εναλλακτική λύση για τη μείωση των χημικών προσθέτων.

Η νισίνη αποτελεί μια φυσική αντιμικροβιακή ουσία που παράγεται από τον οξυγαλακτικό μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* subsp *lactis* και αποτελεί την πιο γνωστή βακτηριοσίνη που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα.

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό:

- Την αρχική εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης τόσο των αιθέριων ελαίων της ρίγανης, του θυμαριού, του δενδρολίβανου και μίγματός τους κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* σε θρεπτικό ζωμό, όσο και του συνδυασμού τους με τη νισίνη για την επιλογή

των καταλληλότερων συγκεντρώσεων με την ισχυρότερη δράση κατά των παθογόνων βακτηρίων για την προσθήκη τους στο μυττωτό βόειου κρέατος.

- Στον έλεγχο της επίδρασης της προσθήκης των αιθέριων ελαίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μυττωτού βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του στην ψύξη για την επιλογή της καταλληλότερης συγκέντρωσης για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της προσθήκης στο μυττωτό βοείου κρέατος.
- Στη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων και του συνδυασμού τους με τη νισίνη στο μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 και 10 °C.

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι οικονομικές απαιτήσεις της διατριβής καλύφθηκαν από το Υπουργείο Παιδείας και την Ε.Ε. στα πλαίσια του Γ' Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης μέσω της Υποτροφίας Βασικής Έρευνας «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί καρπό επίπονων προσπαθειών και θέλω να απευθύνω ένα μεγάλο «ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ» στους γονείς μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ τον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη δυνατότητα που μου παρείχε να εκπονήσω απρόσκοπτα αυτή τη διατριβή. Ο κ. Γκόβαρης υπήρξε πραγματικός «δάσκαλος» για εμένα. Η επιστημονική καθοδήγησή του, η διάθεση απεριόριστου από τον πολύτιμο χρόνο του για την επίλυση κάθε προβληματισμού και η ανθρώπινη στήριξή του σε κάθε δυσκολία, αποτέλεσαν πηγή γνώσης, έμπνευσης και δύναμης για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ τον κ. Νικόλαο Μπότσογλου, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. για την πολύπλευρη συμβολή του. Η αμέριστη συμπαράστασή του υπήρξε ουσιαστική για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ τον κ. Παύλο Κοΐδη, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. για την επιστημονική υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ επιπλέον τους κ.κ. Μπότσογλου και Κοΐδη, οι οποίοι δε δίστασαν ούτε στιγμή να αφιερώσουν τον πολύτιμο χρόνο και την εμπειρία τους όποτε αυτό τους ζητήθηκε.

Ευχαριστώ την αδερφή μου, τα αγαπημένα μου πρόσωπα και τους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους σε όλες τις δύσκολες στιγμές που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Υπουργείο Παιδείας για την Υποτροφία «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ», χάρη στην οποία κατέστη δυνατή η χρηματοδότηση αυτής της διατριβής.

Κεφάλαιο 1°

Γενική Εισαγωγή

1.1. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

1.1.1. Εισαγωγή

Αιθέρια έλαια είναι οι αρωματικές πτητικές ουσίες, οι οποίες είναι διαλυτές στην αλκοόλη, λιγότερο διαλυτές στο νερό και αποτελούνται από μίγμα εστέρων, αλδευδών, κετονών και τερπενίων. Λαμβάνονται κυρίως από φυτικές πρώτες ύλες μετά από απόσταξη με υδρατμούς (Hargreaves 1975).

Ο χρησιμοποιούμενος όρος «αιθέριο έλαιο» χρονολογείται από τον 16^ο αιώνα και αποδίδεται στον Ελβετό ιατρό Paracelsus von Hohenheim, ο οποίος ονόμασε το δραστικό συστατικό ενός φαρμάκου *Quinta essentia* (Guenther 1948). Σήμερα υπολογίζεται ότι είναι γνωστά περίπου 3000 διαφορετικά αιθέρια έλαια από τα οποία τα 300 έχουν εμπορική σημασία, χρησιμοποιούμενα κυρίως ως βελτιωτικά γεύσης και στην αρωματοποιία.

1.1.2. Ιστορικά στοιχεία

Η απόσταξη, ως μέθοδος για την παραγωγή των αιθέρων ελαίων, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ανατολή (Ινδία, Αίγυπτος, Περσία), περισσότερα από 2000 χρόνια πριν και βελτιώθηκε από τους Άραβες μόλις τον 9^ο αιώνα μ.Χ. (Guenther 1948, Bauer και συν. 2001). Η πρώτη γραπτή αναφορά για απόσταξη αιθέριου ελαίου έγινε από τον φυσικό Villanova, ο οποίος έζησε την περίοδο 1235 έως 1311 μ.Χ.. Τον 13^ο αιώνα μ.Χ. η παρασκευή των αιθέρων ελαίων γινόταν σε φαρμακεία και οι φαρμακολογικές τους χρήσεις περιγράφονται σε φαρμακευτικά εγχειρίδια (Bauer και συν 2001). Τον 16^ο αιώνα μ.Χ., δύο Γάλλοι

φυσικοί (Brunschwig και Reiff) αναφέρουν σε κείμενα τους την απόσταξη μικρού αριθμού αιθέριων ελαίων, μεταξύ των οποίων έλαια από δενδρολίβανο, λεβάντα, γαρύφαλλο, μοσχοκάρυδο, άνηθο και κανέλλα. Σύμφωνα με το Γάλλο φυσικό Du Chesne, τον 17^ο αιώνα, η απόσταξη των αιθέριων ελαίων ήταν πια διαδεδομένη και η πρώτη πειραματική μέτρηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε από τον De la Croix το 1881 (Guenther 1948). Κατά τη διάρκεια του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα, η ιατρική χρήση των αιθέριων ελαίων απέκτησε δευτερεύουσα σημασία, σε σχέση με την χρήση των αιθέριων ελαίων στην αρωματοποιία και την προσθήκη τους στα τρόφιμα ως βελτιωτικά της γεύσης (Guenther 1948, Boyle 1955).

1.1.3 Σύγχρονες χρήσεις

Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα κυρίως ως βελτιωτικά της γεύσης, στην αρωματοποιία και στην παρασκευή φαρμάκων (Bauer και Garbe 1985, Van Welie 1997, Van de Braak και Leijten 1999). Σε μικρότερη κλίμακα, οι ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους αξιοποιούνται σήμερα ως αντισηπτικά και ως εντομοαποθητικά (Bauer και Garber 1985, Manabe και συν. 1987, Cox και συν. 2000). Η χρήση των αιθέριων ελαίων ως αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών προσθέτων για την συντήρηση των τροφίμων διαρκώς αυξάνεται.

1.1.4. Εμπορική σημασία

Η διεθνής αγορά των αιθέριων ελαίων συνεχώς διευρύνεται. Το μέγεθος των συναλλαγών που πραγματοποιούνται σε παγκόσμιο επίπεδο δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα αιθέρια έλαια και γενικότερα τα εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης, αποτελούν σε μεγάλο βαθμό επιμέρους συστατικά άλλων προϊόντων. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών, το 1998 οι εξαγωγές αιθέριων ελαίων σε παγκόσμια κλίμακα ανήλθαν σε περίπου 7,5 δισεκατομμύρια δολάρια. Στον πίνακα 1 απεικονίζεται η αύξηση του όγκου συναλλαγών στην παγκόσμια αγορά των αιθέριων ελαίων που παρατηρήθηκε από το 1986 έως το 1998. Οι κυριότεροι εξαγωγείς αιθέριων ελαίων είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση και οι Η.Π.Α. με ποσοστό περίπου 65% του συνόλου των εξαγωγών που πραγματοποιήθηκαν το 1998 (Ο.Η.Ε. 1999).

Πίνακας 1. Όγκος συναλλαγών της αγοράς των αιθέριων ελαίων σε παγκόσμια κλίμακα

	1986	1990	1994	1998
(Αξία σε εκατομμύρια δολάρια)				
Όγκος συναλλαγών (Ο.Η.Ε. 1999)	2 149	4 122	5 051	7 435

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ποσοτήτων αιθέριων ελαίων που παράγονται παγκοσμίως, κατέχει το αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και ακολουθούν σε μικρότερες ποσότητες τα αιθέρια έλαια από ευκάλυπτο, κιτρονέλλα, μέντα και λεμόνι (Ο.Η.Ε. 1999). Στον πίνακα 2 παρατίθενται στοιχεία για την παγκόσμια παραγωγή των κυριότερων αιθέριων ελαίων καθώς και αιθέριων ελαίων από την οικογένεια *Lamiaceae*, μέλη της οποίας θα μελετηθούν στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας 2. Παγκόσμια παραγωγή αιθέριων ελαίων.

Αιθέριο έλαιο	Παραγωγή σε τόνους	Αξία (εκατομμύρια δολάρια)
Πορτοκάλι	26.000	58,5
Ευκάλυπτος	3.728	29,8
Κιτρονέλλα	2.830	10,8
Μέντα	2.367	28,4
Λεμόνι	2.158	21,6
Δενδρολίβανο	295	3,5
Βασιλικός	43	2,8
Ρίγανη	62	1,2
Θυμάρι	29	1

(Ο.Η.Ε. 1999)

Στην Ελλάδα η καλλιέργεια αρωματικών φυτών παρουσιάζει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, λόγω τόσο των κλιματολογικών συνθηκών οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξή τους, όσο και της πολύ καλής ποιότητάς τους. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια ρίγανης πραγματοποιείται κυρίως στην Θεσσαλία, στην Κεντρική Μακεδονία, στην Ήπειρο και σε νησιά του Βορείου Αιγαίου. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά στοιχεία για τις εκτάσεις στην Ελλάδα της καλλιεργούμενης ρίγανης, καθώς και οι ποσότητες που παράγονται. Αντίστοιχα στον πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκριτικά στοιχεία των ποσοτήτων ρίγανης που παράγονται στις καλλιεργούμενες εκτάσεις και αυτών της αυτοφυούς ρίγανης που συλλέγεται στην Ελλάδα.

Πίνακας 3. Καλλιεργητικές εκτάσεις και παραγωγή ρίγανης στην Ελλάδα κατά τα έτη 1981 ως 1997

Έτος	Καλλιεργητικές εκτάσεις (σε στρέμματα)	Παραγωγή (σε τόνους)
1981	687	69
1982	548	76
1983	705	67
1984	1569	206
1985	719	89
1986	837	79
1987	752	83
1988	772	65
1989	832	68
1990	750	75
1991	680	190
1992	810	205
1993	775	63
1994	750	61
1995	725	60
1996	725	90
1997	760	80

(ANKO 2000 και Επενδυτικές δυνατότητες Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα 2002)

Πίνακας 4. Παραγωγή αυτοφυούς και καλλιεργούμενης ρίγανης στην Ελλάδα κατά το 1998

Παραγωγή ρίγανης (<i>Origanum vulgare</i>)	Νομοί της Ελλάδας	Συνολική ετήσια παραγωγή (τόνοι)
Αυτοφυή φυτά	Ροδόπης, Ξάνθης, Πρέβεζας, Λάρισα, Τρικάλων, Μαγνησίας, Καρδίτσας, Ευρυτανίας, Φωκίδας, Φθιώτιδας, Αιτωλοακαρνανίας, Αχαΐας, Ηλείας, Αργολίδας, Αρκαδίας, Μεσσηνίας, Λακωνίας, Λέσβου, Χίου, Σάμου, Κυκλάδων, Χανίων, Ρεθύμνου	897,7
Καλλιεργούμενα φυτά	Ροδόπης, Έβρου, Θεσσαλονίκης, Κιλκίς, Σερρών, Χαλκιδικής, Ημαθίας, Περίας, Λάρισα, Τρικάλων, Μαγνησίας, Καρδίτσας, Γρεβενών, Κοζάνης, Ιωαννίνων, Θεσπρωτίας, Αιτωλο-Ακαρνανίας	90,0

(Α.Τ.Ε. 1998 και Επενδυτικές δυνατότητες Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών)

1.1.5. Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα

Διάφορα συστατικά των αιθέριων ελαίων θεωρούνται ασφαλή για την υγεία των καταναλωτών και έχουν εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για χρήση στα τρόφιμα ως βελτιωτικά της γεύσης. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η καρβακρόλη (κύριο συστατικό της ρίγανης), η θυμόλη (κύριο συστατικό του θυμαριού), η μενθόλη, το κυμένιο και η ευγενόλη (EC/113/2002). Όλες οι εγκεκριμένες από την Ε.Ε. ουσίες που αναφέρονται παραπάνω, διαθέτουν άδεια για χρήση στα τρόφιμα και στις Η.Π.Α. Οι ουσίες αυτές είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (FDA) και περιλαμβάνονται στην λίστα *'Everything Added to Food in the US'* (www.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html). Για την έγκριση νέων ουσιών στην κατηγορία αυτή χρειάζονται πλήρεις φαρμακολογικές και τοξικολογικές μελέτες, μια διαδικασία που είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και δαπανηρή (EC/2232/96, EC/1565/2000).

1.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

1.2.1. Ταξινόμηση

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, στο γένος *Origanum*. Το γένος *Origanum* περιλαμβάνει 38 είδη ρίγανης, τα περισσότερα εκ των οποίων απαντώνται σε όλη την Μεσόγειο, ενώ 11 είδη από αυτά φύονται στην Ελλάδα (Greuter και συν. 1986). Στην Ελλάδα, η πιο γνωστή ρίγανη είναι αυτή η οποία ταξινομείται ως *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Kokkini 1994). Το είδος αυτό της ρίγανης, που απαντάται και σε άλλες περιοχές της Μεσογείου, είναι γνωστό στο εμπόριο ως «ελληνική» ρίγανη και ανήκει στα 4 πλέον εμπορεύσιμα είδη ρίγανης που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα σε όλο τον κόσμο (Rousso και συν. 1998). Η «ελληνική ρίγανη» θεωρείται ότι έχει την καλύτερη ποιότητα από τα διάφορα άλλα είδη ρίγανης που χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα (Calrouzos 1954, Fleisher και Sneer 1982, Lawrence 1984, Fleisher και Fleisher 1988).

1.2.2. Ενεργά συστατικά

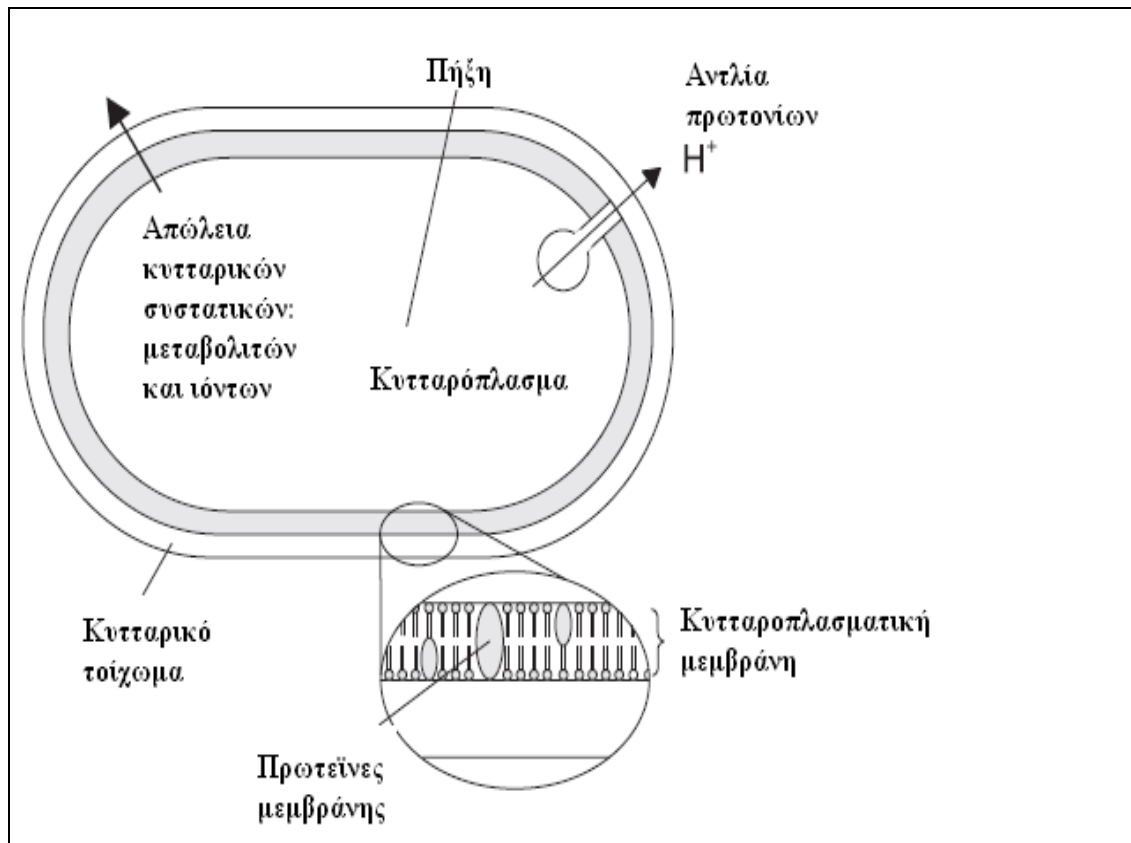
Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει περισσότερες από 30 χημικές ενώσεις και είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι οι δύο κύριες φαινόλες αποτελώντας το 78-82 % του αιθέριου ελαίου και θεωρούνται υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Adam και συν. 1998, Yanishlieva και συν. 1999).

Επίσης, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο είναι δύο υδρογονάνθρακες που αποτελούν περίπου το 5 % και 7 %, αντίστοιχα του αιθέριου ελαίου και

συνεισφέρουν στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης (Adam και συν. 1998). Εκτός των φαινολών και υδρογονανθράκων, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει διάφορες αλκοόλες και εστέρες που βρίσκονται σε μικρά ποσοστά, περίπου 1,5 % (Daferera και συν. 2000).

1.2.3. Αντιμικροβιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης εμφανίζει βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση (Charai και συν. 1996, Sinvroulou και συν. 1996), η οποία θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει (Beuchat 1976, Zaika και Kissinger 1981, Conner και Beuchat 1984). Οι φαινόλες έχουν τη δυνατότητα να εισχωρούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και να προσβάλλουν τα ένζυμα του μεταβολισμού του μικροβιακού κυττάρου (Juven και συν. 1972). Οι κυριότερες φαινόλες του αιθέριου ελαίου της ρίγανης είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη. Λόγω της λιποφιλικής της ιδιότητας, η καρβακρόλη απορροφάται από τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της δομής της μεμβράνης και την απώλεια ζωτικών κυτταρικών συστατικών (Judis 1963, Juven και συν. 1972). Η καρβακρόλη δρα επίσης εναντίον των μικροοργανισμών, προκαλώντας μείωση του ενδοκυτταρικού ATP, του καλίου και της τιμής του pH (Ultee και συν. 1999). Η καρβακρόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση τόσο κατά των σπόρων (Ultee και συν. 1999), όσο και κατά των βλαστικών κυττάρων του *Bacillus cereus* (Rybka-Rodgers 2001). Στο σχήμα 1 που παρατίθεται, διακρίνονται οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των φαινολών στο βακτηριακό κύτταρο.



Σχήμα 1. Μηχανισμοί δράσης των φαινολών στο βακτηριακό κύτταρο (τροποποιημένο από Burt 2004).

Οι Marino και συν. (2001) μελέτησαν *in vitro* την επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όταν προστέθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα προκάλεσε αναστολή όλων των παραπάνω μικροοργανισμών σε ποσοστό 100 % στα 800 ppm, αναστολή κυμαινόμενη μεταξύ 70 – 100 % στα 400 ppm και αναστολή μόνο της *E. coli* O157:H7 στα 200 ppm.

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε θρεπτικά υποστρώματα σε συγκέντρωση 0.4% παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μικροοργανισμών *S. aureus*, *Y. enterocolitica* και *A. hydrofila*, ενώ σε συγκεντρώσεις

1% και 2% στη *S. typhimurium* (Ozcan και συν. 2003). Σε μια άλλη μελέτη, οι Hammer και συν. (1999) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης για την ανάσχεση της ανάπτυξης των παθογόνων *A. sobria*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* ήταν 0.12, 0.25, 0.12, 0.12 και 2% αντίστοιχα. Η αντιμικροβιακή δράση της ρίγανης βρέθηκε ισοδύναμη με εκείνη του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη κατά των παθογόνων *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, ενώ μεγαλύτερη από εκείνη των αντιβιοτικών γενταμυκίνη, καναμυκίνη και αμπικιλλίνη στην περίπτωση της *Y. enterocolitica* (Sagdic και συν. 2003).

Οι Dorman και Deans (2000) σε *in vitro* πειράματα, βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Brocothrix thermosphacta* και *Salmonella pullorum*.

Οι Friedman και συν. (2004) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1,33 – 66,7 (μg/ml) σε θρεπτικό ζωμό, παρουσίασε σημαντική βακτηριοκτόνο δράση κατά ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το αιθέριο έλαιο βρέθηκε δραστικό ακόμα και κατά σπόρων του παραπάνω παθογόνου στις ίδιες συνθήκες.

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του παθογόνου *E. coli* O157:H7 μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές. Σύμφωνα με τους Sagdic και συν. (2002) αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1, 1,5 και 2% είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμό 10⁸ CFU/ml σε θρεπτικό υπόστρωμα που επώαστηκε στους 37 °C. Στην ίδια εργασία διαπιστώθηκε ότι συγκέντρωση 0.5% του ελαίου παρουσίασε βακτηριοστατική δράση. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου

ρίγανης κατά της *E. coli* O157:H7 σε ακόμη μικρότερες συγκεντρώσεις. Έτσι σύμφωνα με τους Caillet και συν. (2005), η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης για την ανάσχεση της *E. coli* O157:H7 ήταν 0.025 (w/v). Σε μια άλλη μελέτη, οι Skandamis και συν. (2001) αναφέρουν ότι συγκέντρωση 0.05% αιθέριου ελαίου ρίγανης είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμούς 5 log cfu/ml σε ζωμό BHI και επώαστηκε στους 37 °C. Στην ίδια εξάλλου μελέτη, συγκέντρωση 0.03% του αιθέριου ελαίου παρουσίασε βακτηριοστατική δράση. Οι Burt και Reinders (2003) ενοφθάλμισαν *E. coli* O157:H7 (10⁶ cfu/ml) σε θεραπευτικό ζωμό και παρατήρησαν ότι αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 625 μl/l παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου σε επώαση στους 10, 20 και 37 °C.

Οι Skandamis και Nychas (2000) βρήκαν ότι η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε κατεψυγμένα τρόφιμα με χαμηλό pH σε συγκεντρώσεις (0.1-0.7%), αύξησε το ρυθμό θανάτωσης της *E. coli* O157:H7 και μείωσε το χρόνο επιβίωσής της. Είναι γνωστό ότι η *E. coli* O157:H7 επιβιώνει σε χαμηλό pH, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι Juven και συν. (1994) παρατήρησαν ότι σε τρόφιμα με χαμηλό pH το αιθέριο έλαιο ήταν περισσότερο δραστικό κατά της *E. coli* O157:H7, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι σε χαμηλό pH το έλαιο γίνεται περισσότερο υδρόφοβο, με αποτέλεσμα να επιδρά καλύτερα στη λιπιδική φάση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Οι Koutsoumanis και συν. (1999) παρατήρησαν ότι σε ταραμοσαλάτα με pH 5.3 που είχε ενοφθαλμιστεί με *S. enteritidis* (8 log cfu/g), η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1 και 2% είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού σε 1 log cfu/g κατά τη συντήρηση του προϊόντος σε θερμοκρασία 20 °C για 16 ημέρες. Στις ίδιες συνθήκες, συγκέντρωση του ελαίου ίση με 0.5% μετά από μια αρχική μείωση περίπου κατά 1 log cfu/g του πληθυσμού του παθογόνου δεν είχε στη συνέχεια άλλη

επίδραση για όλο το χρονικό διάστημα της συντήρησης του προϊόντος. Αντίθετα, όταν το pH της ταραμοσαλάτας ρυθμίστηκε στο 4.3, η συγκέντρωση αυτή (0.5%) του αιθέριου ελαίου της ρίγανης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών του παθογόνου σε επίπεδα της τάξης του 1 log cfu/g.

Οι Tsigarida και συν. (2000) ενοφθάλμισαν σε μυττωτό βόειου κρέατος την *L. monocytogenes* σε πληθυσμούς 3.5 log cfu/g και στη συνέχεια, συντήρησαν τα δείγματα στους 5 °C για 16 ημέρες. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε αερόβιες συνθήκες ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (40% CO₂/ 30% O₂/ 30% N₂). Στα δείγματα που είχε προστεθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 0.8%, οι πληθυσμοί του παθογόνου ήταν κατά 1, 3.84 και 4.36 log CFU/g χαμηλότεροι από αυτούς που καταγράφηκαν στους μάρτυρες στο τέλος της συντήρησης.

Οι Skandamis και συν. (2002β) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.8% στην επιφάνεια βόειου κρέατος που επιμολύνθηκε τεχνητά με *S. typhimurium*, οδήγησε σε σημαντική μείωση του παθογόνου στη διάρκεια της συντήρησής του στους 5 °C για 15 ημέρες.

Ο Ismael και συν. (1990) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του *C. botulinum* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των ποσοτήτων των νιτρικών και νιτρωδών αλάτων, που χρησιμοποιούνται στα κρεατοσκευάσματα. Όπως είναι γνωστό, τα άλατα αυτά έχουν κατηγορηθεί για πιθανή καρκινογένεση στον άνθρωπο, όταν ξεπερνούν ορισμένα ποσοστά.

Η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης για την ανασχεση της ανάπτυξης του *Vibrio parahaemolyticus* σε θρεπτικό ζωμό βρέθηκε ότι ήταν 0.5% κατά την επώαση στους 5 °C και στους 30 °C για 24 ώρες (Yano και συν. 2006). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τους Lin και συν. (2005) οι οποίοι βρήκαν

ότι εκχύλισμα ρίγανης με συγκέντρωση φαινολικών συστατικών 0.1 mg/ml μείωσε τους πληθυσμούς *V. parahaemolyticus* σε ζωμό TSB μετά από επώαση στους 30 °C για 10 ώρες σε σχέση με τους μάρτυρες. Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι το εκχύλισμα ρίγανης μείωσε κατά 1 log cfu/g τον αρχικό πληθυσμό (10^3 log CFU/g) του *V. parahaemolyticus* σε φιλέτα μπακαλιάρου και σε γαρίδες, μετά από συντήρηση των δειγμάτων στους 4 °C για 8 ημέρες.

Οι Mejlholm και Dalgaard (2002) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.05% ανέστειλε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Photobacterium phosphoreum* σε φιλέτα μπακαλιάρου που συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 2 °C. Στις ίδιες συνθήκες η προαναφερθείσα συγκέντρωση ρίγανης επιμήκυνε τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων από 11-12 ημέρες στους μάρτυρες σε 21-26 ημέρες.

1.2.4. Αντιμυκητιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει επίσης αξιοσημείωτη αντιμυκητιακή δράση (Daw και συν. 1995). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Penicillium spp.* (Daouk και συν. 1995, Venturini και συν. 2002). Η παραγωγή των μυκοτοξινών και ειδικότερα των αφλατοξινών στα τρόφιμα, περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (Bullerman και συν. 1977, Chatterjee 1990, Daw και συν. 1995, El-Baroty 1997). Αυτή η παρατήρηση αποδόθηκε στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με ενεργά ένζυμα των μυκήτων *Aspergillus spp.* που οδηγούν σε απενεργοποίηση της παραγωγής των αφλατοξινών (Juglal και συν. 2002). Αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2 μl/ml ανέστειλε

πλήρως την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και περιόρισε την παραγωγή αφλατοξινών *in vitro* (El-Baroty 1997).

Οι Ozcan και Osman (2001) αναφέρουν ότι ρίγανη σε συγκέντρωση 15% σε θρεπτικό υπόστρωμα κατάφερε να αναστείλει όλους τους μύκητες και τις ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae*, *A. niger* και *C. rugosa*).

1.2.5. Αντιοξειδωτική δράση

Η ρίγανη είναι μια φυσική αντιοξειδωτική ουσία (Kokkini 1994, Exarchou και συν. 2002). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό στις φαινόλες της και κυρίως στην καρβακρόλη και στη θυμόλη (Adam και συν. 1998). Άλλες χημικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, όπως το ροσμαρινικό οξύ, συντελούν επίσης στην αντιοξειδωτική αυτή συμπεριφορά (Exarchou και συν. 2002). Η ρίγανη βρέθηκε ότι εμποδίζει την οξείδωση του λίπους σε διάφορα τρόφιμα (Abdalla και Roozen 2001) και ζωικά λίπη (Economou και συν. 1991, Vekiarí και συν. 1993, Lagouri και συν.1993, Milos και συν. 2000). Η χορήγηση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με την τροφή σε πτηνά βρέθηκε ότι προστατεύει από την οξείδωση το λίπος του κρέατος τους (Botsoglou και συν. 2002 α, 2002 β, Botsoglou και συν. 2003 α, 2003 β, Papageorgiou και συν. 2003, Govaris και συν. 2004) στη διάρκεια συντήρησης του κρέατος αυτού στην ψύξη ή την κατάψυξη. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών με την τροφή στα ζώα αποδείχθηκε ότι είναι μια πολύ καλή τεχνική για την απορρόφηση και την ενσωμάτωση των ουσιών αυτών στις μεμβράνες των κυττάρων των ιστών, όπου δρουν εμποδίζοντας την οξείδωση (Botsoglou και συν. 2002 α,β).

1.2.6. Άλλες ιδιότητες

Κλινική μελέτη σε ασθενείς ανθρώπους έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης σε γαλάκτωμα είχε αντιπαρασιτική δράση κατά των εντερικών πρωτοζώων *Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni* και *Endolimax nana* (Force και συν. 2000). Εξάλλου, η χορήγηση καρβακρόλης και θυμόλης με την τροφή βρέθηκε ότι βελτιώνει τις αποδόσεις κρεοπαραγωγών ορνιθίων που είχαν μολυνθεί πειραματικά με ωοκύστες του κοκκιδίου *Eimeria acervulina* (Ibrir και συν. 2001). Οι Giannenas και συν. (2003) βρήκαν ότι η χορήγηση αιθέριου έλαιου ρίγανης σε συγκέντρωση 300 mg/kg με την τροφή παρουσιάζει δράση κατά της *E. tenella* σε παχυνόμενες όρνιθες. Σε άλλη σχετική μελέτη με πτηνά διαπιστώθηκε ότι οι φαινόλες της ρίγανης παρουσιάζουν ισχυρή δράση κατά των κοκκιδίων του γένους *Eimeria* (Williams 1997).

Οι Sivropoulou και συν. (1997) έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα.

Οι Tunc και συν. (2000) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είχε εντομοκτόνο δράση, ειδικότερα κατά των ωών των εντόμων *Tribolium confusum* και *Ephestia kuehniella*.

1.3. Αιθέριο έλαιο θυμαριού

1.3.1. Ταξινόμηση

Το θυμάρι (γένος *Thymus*) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και περιλαμβάνει 350 είδη, 66 από τα οποία φύονται στην Ευρώπη (Juliano και συν. 2000). Το είδος του θυμαριού, που απαντάται συχνότερα στην Ελλάδα και στις χώρες της Μεσογείου, είναι το *Thymus vulgaris* L. Το είδος αυτό έχει ερευνηθεί περισσότερο από τα υπόλοιπα σε παγκόσμια κλίμακα (Economidou και συν. 1991).

1.3.2. Ενεργά συστατικά

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού είναι πλούσιο σε φαινόλες (θυμόλη και καρβακρόλη), οι οποίες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές του. Συνήθως σε μικρότερα ποσοστά βρίσκονται και άλλες ενώσεις, όπως οι υδρογονάνθρακες π-κυμένιο και γ-τερπινένιο ($C_{10}H_{16}$) και άλλα συστατικά, όπως το β-καρνοφυλένιο ($C_{15}H_{24}$) ή β-βισαπολένιο ($C_{15}H_{24}$) (Senatore 1996). Ο Senatore (1996) παρατήρησε ότι υπάρχει εποχιακή διακύμανση της σύστασης του αιθέριου ελαίου στα διάφορα είδη του θυμαριού. Στο αιθέριο έλαιο θυμαριού το ποσοστό θυμόλης, καρβακρόλης, π-κυμενίου και γ-τερπινένιου συνήθως κυμαίνεται σε ποσοστά 42,7%, 3%, 16% και 18% αντίστοιχα (Daferera και συν. 2000, Hudaib και συν. 2002). Σε όλα τα είδη του θυμαριού το ποσοστό της θυμόλης είναι εκείνο που υπερτερεί σε σχέση με τα ποσοστά των άλλων φαινολών (Juliano και συν. 2000, Karaman και συν. 2001).

1.3.3. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Το θυμάρι εμφανίζει σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά μεγάλου αριθμού παθογόνων των τροφίμων (Friedman και συν. 2002). Οι Karaman και συν. (2001) βρήκαν ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του θυμαριού κατά των παθογόνων *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus*, *E. coli* και *L. monocytogenes* ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών αμπικιλίνη και πενικιλίνη G.

Αιθέριο έλαιο θυμαριού προστιθέμενο σε θρεπτικά υποστρώματα σε συγκέντρωση 1 και 2% εμφάνισε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μικροοργανισμών *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrofila*, *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, αλλά όχι κατά της *E. coli* O157:H7 (Ozcan και συν. 2003). Σε άλλη μελέτη οι Hammer και συν. (1999) βρήκαν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση ανάσχεσης αιθέριου ελαίου θυμαριού που προστίθεται σε υπόστρωμα Mueller-Hinton κατά των παθογόνων *A. sobria*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* ήταν 0.12, 0.12, 2, 0.25 και >2% μετά από επώαση για 48 ώρες στους 35 °C, αντίστοιχα. Οι Dorman και Deans (2000) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο του θυμαριού παρουσιάζει σημαντική ζώνη αναστολής σε υπόστρωμα Iso-sensitest κατά των παθογόνων *B. subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Brocothrix thermosphacta* και *S. pullorum*.

Οι Friedman και συν. (2004) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο θυμαριού είχε σημαντική βακτηριοκτόνο δράση σε συγκεντρώσεις 6.67 - 66.7 (μg/ml) σε θρεπτικό ζωμό έναντι ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βλαστικών κυττάρων *B. cereus* μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Επίσης οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι το

αιθέριο έλαιο σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν ήταν δραστικό κατά των σπόρων του παθογόνου στις ίδιες συνθήκες.

Σύμφωνα με τους Sagdic και συν. (2002), το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 1.5 και 2% σε θρεπτικό υπόστρωμα εμφάνισε βακτηριοκτόνο δράση κατά της *E. coli* που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμό 10^8 log cfu/ml κατά τη διάρκεια επώασης στους 37 °C. Ομοίως οι Burt και Reinders (2003) παρατήρησαν ότι αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1250 μl/l σε ζωμό Mueller-Hinton παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά της *E. coli* O157:H7 (10^6 cfu/ml) κατά τη διάρκεια επώασης στους 10, 20 και 37 °C. Στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε ότι το έλαιο σε συγκέντρωση 625 μl/l, παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά του παθογόνου.

Οι Bagamboula και συν. (2004) παρατήρησαν αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά των μικροοργανισμών *Shigella sonnei* και *S. flexneri* σε πληθυσμούς 10^5 cfu/ml σε υπόστρωμα Mueller – Hinton μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.

Οι Valero και Salmeron (2003) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού σε συγκέντρωση 35 μl/100ml σε ζωμό καρότου, όπου είχε ενοφθαλμιστεί *B. cereus*, καθυστέρησε τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά 23 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία 16 °C.

Σύμφωνα με τους Yano και συν. (2006), η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου θυμαριού για την ανάσχεση της ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* κατά την επώαση για 24 ώρες στους 5 °C και 2% στους 30 °C σε θρεπτικό ζωμό ήταν 1%.

Οι Smith-Palmer και συν. (1998) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού σε θρεπτικό ζωμό εμφάνισε βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση κατά 5 σημαντικών παθογόνων των τροφίμων (*Campylobacter jejuni*, *L.*

monocytogenes, *S. enteritidis*, *S. aureus* και *E. coli*) σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.075% και 0.1%.

Οι Singh και συν. (2003) αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά της *L. monocytogenes* τόσο σε *in vitro* πειράματα, όσο και σε κρεατοσκεύασμα (χοινοτόγκ) ποικίλης λιποπεριεκτικότητας. Το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 0.5 ml/l σε πεπτονόχο ύδωρ μείωσε τους πληθυσμούς του μικροοργανισμού από 7 σε 1.78 log₁₀ cfu/ml στα 5 min και σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ο χρόνος δράσης του ελαίου αυξήθηκε σε 10 ή 15 λεπτά, οι πληθυσμοί του παθογόνου έπεσαν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά της *L. monocytogenes* στα κρεατοσκευάσματα αυτά μειωνόταν όσο αυξανόταν η λιποπεριεκτικότητά τους.

Οι Smith-Palmer και συν. (2001) αναφέρουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του θυμαριού κατά των παθογόνων *L. monocytogenes* και *S. enteritidis* σε μαλακό τυρί τύπου Φιλαδέλφειας με χαμηλή (16 g / 100 g) και υψηλή λιποπεριεκτικότητα (30 g / 100 g) στη διάρκεια επώασης στους 4 και 10 °C σε χρονικό διάστημα 14 ημερών. Το έλαιο δοκιμάστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις με πιο σημαντικά αντιμικροβιακά αποτελέσματα να καταγράφονται σε συγκέντρωση 1%. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του θυμαριού ήταν μεγαλύτερη στο τυρί χαμηλής λιποπεριεκτικότητας από την αντίστοιχη στο τυρί υψηλής λιποπεριεκτικότητας.

1.3.4. Αντιμυκητιακή δράση

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού, προστιθέμενο σε θρεπτικό υπόστρωμα βρέθηκε ότι ήταν δραστικό σε συγκέντρωση 250 ppm κατά του *A. flavous* και σε συγκέντρωση 500 ppm κατά των *A. parasiticus* και *A. ochraceus* (Soliman και Badeau 2002). Σύμφωνα με τον Ozcan (1998) το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2 % ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη του *A. parasiticus*, ενώ σε συγκέντρωση 1% παρατηρήθηκε μερική μόνο αναστολή του μύκητα. Σε συγκέντρωση 400 µg/ml ανέστειλε την ανάπτυξη των μυκήτων *A. parasiticus*, *A. ochraceus* και *A. versicolor* όσο και την παραγωγή τοξινών από αυτούς (Hitokoto και συν. 1980). Η ελάχιστη συγκέντρωση ανάσχεσης (MIC) του αιθέριου ελαίου του θυμαριού κατά των μυκήτων *A. niger* και *Candida albicans* βρέθηκε ότι ήταν 0.5 mg/ml και 0.25 mg/ml, αντίστοιχα (Juliano και συν. 2000).

1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση

Το θυμάρι είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Economou και συν. 1991). Οι Lee και Shibamoto (2002) παρατήρησαν ότι η αντιοξειδωτική δράση του θυμαριού στα λίπη των τροφίμων ήταν εξίσου ισχυρή με γνωστά αντιοξειδωτικά, όπως η α-τοκοφερόλη και το βουτυλοϋδροξυτολουόλιο (BHT). Η καρβακρόλη και ιδιαίτερα η θυμόλη είναι τα φαινολικά συστατικά, που είναι κυρίως υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του θυμαριού (Farag 1989, Deighton και συν. 1993).

Η χορήγηση αιθέριου ελαίου θυμαριού με την τροφή σε όρνιθες ωοπαραγωγής είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας του

λίπους της λεκίθου των παραγόμενων αυγών τους στη διάρκεια της συντήρησής τους στην ψύξη (Botsoglou και συν. 1997).

1.4 Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου

1.4.1. Ταξινόμηση

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*. Είναι αρωματικό, θαμνώδες φυτό και αποτελεί τυπικό είδος της Μεσογειακής χλωρίδας. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι παρατεταμένη και σταδιακή από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο, αλλά συχνά είναι δυνατό να ανθοφορεί όλο τον χρόνο. Το δενδρολίβανο καλλιεργείται κυρίως στην Ισπανία, το Μαρόκο και την Τυνησία, αλλά απαντάται ευρέως και στην Ελλάδα. Φύεται σε όλα τα είδη εδάφους, αν και προτιμά αμμώδες και ξηρό έδαφος (Catizone και συν. 1986).

Το αιθέριο έλαιο παράγεται με απόσταξη με υδρατμούς των φύλλων και ανθέων του βοτάνου που συλλέγονται την χρονική περίοδο από την άνοιξη έως αργά το φθινόπωρο. Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου παράγεται κυρίως σε Ισπανία, Μαρόκο και Τυνησία. Αντίθετα οι κύριοι εισαγωγείς αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου είναι οι Η.Π.Α., η Ιαπωνία και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Οι κύριες χρήσεις του είναι στα τρόφιμα και στη φαρμακευτική βιομηχανία (Murari Calalongo G 1988, Weiss RF 1988).

1.4.2. Ενεργά συστατικά

Το αιθέριο έλαιο είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Τα κύρια ενεργά συστατικά του δενδρολίβανου είναι η 1,8 κινεόλη ($C_{10}H_{18}O$), το α -πινένιο ($C_{10}H_{16}$), η καμφορά, η ροσμανόλη, η ισοροσμανόλη, το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη ($C_{20}H_{26}O_4$), το καρνοσικό οξύ ($C_{20}H_{28}O_8$), η βορνεόλη και η α -τερπινεόλη (Daferera και συν. 2000, Pintore και συν.

2002). Η 1,8 κινεόλη είναι η ένωση που βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά (μέχρι και 88,9 %) στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου που φύτεται στην Ελλάδα (Daferera και συν. 2000). Το δενδρολίβανο δεν περιέχει καρβακρόλη ή θυμόλη.

1.4.3. Αντιμικροβιακή δράση

Οι Hammer και συν. (1999) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου για την ανάσχεση της ανάπτυξης των παθογόνων *A. sobria*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* και *P. aeruginosa* ήταν 0,5, 1, >2, 1 και >2% αντίστοιχα.

Οι Quattara και συν. (1997) αναφέρουν ότι αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά έξι μικροοργανισμών που αλλοιώνουν συνήθως το κρέας. Συγκεκριμένα αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε αραιώση 1/100 πέτυχε να αναστείλει *in vitro* τους μικροοργανισμούς *B. thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus saki*.

Οι Chaibi και συν. (1997) βρήκαν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου για την ανάσχεση ανάπτυξης των σπόρων του *B. cereus* ήταν 200 ppm. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η αναστολή ανάπτυξης των σπόρων από το έλαιο δενδρολίβανου οφείλεται πιθανώς σε λύση των σπόρων.

Οι Smith-Palmer και συν. (1998) αναφέρουν ότι αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου εμφάνισε βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση κατά 5 σημαντικών παθογόνων των τροφίμων. Έτσι οι βακτηριοστατικές συγκεντρώσεις του δενδρολίβανου κατά των παθογόνων μικροοργανισμών (*C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *S. aureus* και *E. coli*). ήταν 0,5, 0,02, >1, 0,04 και >1%, αντίστοιχα, ενώ οι

βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις ήταν >1, 0.1, >1, 0.1 και >1% σε ζωμό TSB, αντίστοιχα.

Οι Pandit και Shelef (1994) αναφέρουν ότι το δενδρολίβανο σε συγκέντρωση 0.5% επέδειξε βακτηριοκτόνο δράση κατά της *L. monocytogenes* σε υπόστρωμα BHI μετά από επώαση στους 35 °C για 48 ώρες. Στην ίδια μελέτη μόνο το α-πινένιο από τα τέσσερα κύρια συστατικά του δενδρολίβανου (κινεόλη, βορνεόλη, α-πινένιο και καμφορά) κατάφερε να αναστείλει την *L. monocytogenes*. Προσθήκη 1 % του αιθέριου ελαίου σε λουκάνικο από ήπαρ χοίρου πριν το μαγείρεμα, κατάφερε να καθυστερήσει την ανάπτυξη του παθογόνου κατά τη διάρκεια συντήρησης στην ψύξη.

Η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου για την ανάσχεση της ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* σε θρεπτικό ζωμό μετά από επώαση στους 5 °C και 0.5% στους 30 °C για 24 ώρες ήταν 0.25%. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις θυμαριού, όταν η μελέτη επαναλήφθηκε σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, ήταν 0.063 και 0.008%, αντίστοιχα (Υανο και συν. 2006).

Οι Govaris και συν. (2007) αναφέρουν ότι χορήγηση δενδρολίβανου με την τροφή σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 g /100 g σε γαλοπούλες, είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα στους πληθυσμούς της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των οξυγαλακτικών και ψυχρόφιλων βακτηρίων, καθώς και των εντεροβακτηρίων σε φιλέτα στήθους από τα σφάγια των πτηνών αυτών κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στην ψύξη για 12 ημέρες.

1.4.4. Αντιμυκητιακή δράση

Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου ανέστειλε μερικώς την ανάπτυξη *A. parasiticus*, *A. ochraceus* και *A. versicolor* καθώς και την παραγωγή τοξινών από αυτούς (Hitokoto και συν. 1980).

Οι Daferera και συν. (2000) αναφέρουν ότι αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 1000 µg/ml, ανέστειλε σε ποσοστό 24% την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium digitatum*.

1.4.5. Αντιοξειδωτική δράση

Οι Han και Rhee (2005) αναφέρουν ότι προσθήκη εκχυλίσματος δενδρολίβανου σε μοσχαρίσιο και αίγιο κρέας σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.10 και 0.25%, είχε πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, όταν τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4 °C για 6 ημέρες. Το ίδιο ισχυρό αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και όταν στα ίδια δείγματα κρέατος προστέθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε συγκέντρωση 2%.

Οι Govaris και συν. (2007) αναφέρουν ότι χορήγηση δενδρολίβανου σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 g /100 g με την τροφή σε γαλοπούλες καθυστέρησαν την οξείδωση του κρέατός τους, κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C για 12 ημέρες.

Οι Sanchez-Escalante και συν. (2001) αναφέρουν ότι δενδρολίβανο σε σκόνη και σε συγκέντρωση 1000 ppm εμπόδισε την οξείδωση μπιφτεκιών από μοσχαρίσιο κρέας, που συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 2±1 °C για 20 ημέρες. Το δενδρολίβανο αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό σε συγκέντρωση 1000 ppm όταν δοκιμάστηκε

σε μοσχαρίσιες μπριζόλες που συσκευάστηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 1 ± 1 °C για 29 ημέρες, σύμφωνα με τους Djepane και συν. (2002). Ο συνδυασμός του δενδρολίβανου στην παραπάνω συγκέντρωση με τη βιταμίνη C (500 ppm) ήταν επίσης ιδιαίτερα αποτελεσματικός.

1.4.6. Άλλες ιδιότητες

Το *Helicobacter pylori* είναι ένας μικροοργανισμός, ο οποίος συνδέεται με παθήσεις του γαστρεντερικού π.χ. έλκος στον άνθρωπο. Οι Ohno και συν. (2003) μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *H. pylori*. Έτσι, το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 0.1% κατάφερε να αναστείλει πλήρως τον μικροοργανισμό σε θρεπτικό ζωμό (BHI).

1.5 ΝΙΣΙΝΗ

1.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βακτηριοσίνες είναι πολυπεπίδια με αντιμικροβιακή δράση, τα οποία συνθέτονται στα ριβοσώματα ορισμένων βακτηρίων. Οι βακτηριοσίνες, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στα τρόφιμα, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μικρού μεγέθους πεπίδια (<5 kDa) που χαρακτηρίζονται από την παρουσία των ασυνήθιστων αμινοξέων lanthionine (Lan) και 3-methyllanthionine (MeLan) και ονομάζονται lantibiotics. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν μικρά πεπίδια (<10 kDa), σταθερά σε θέρμανση, τα οποία δεν περιέχουν lanthionine. Οι βακτηριοσίνες της τρίτης κατηγορίας είναι πρωτεΐνες (>30 kDa) θερμικά ασταθείς και μικρού ενδιαφέροντος για την βιομηχανία των τροφίμων.

Η νισίνη ($C_{134}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) είναι ένα πολυπεπίδιο που παράγεται από τον οξυγαλακτικό μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* subsp *lactis* και αποτελεί την πιο γνωστή βακτηριοσίνη που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα.

Οι Rogers και Whittier (1928) ήταν οι πρώτοι που υπέθεσαν την ύπαρξη της νισίνης, όταν προσπάθησαν να εξηγήσουν την ανασταλτική δράση κατά του *Lactobacillus bulgaricus* που είχαν παρατηρήσει από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactococcus lactis*. Το όνομα νισίνη αποδόθηκε από τους Mattick και Hirsch (1947) από τις Αγγλικές λέξεις “N inhibitory substance”.

Ιδιότητες. Η νισίνη ανήκει σε μια υποκατηγορία των βακτηριοσινών τα lantibiotics, που χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποτελεί ότι στην πεπτιδική τους αλυσίδα φέρουν τα ασυνήθιστα αμινοξέα lanthionine (Lan) και 3-methyllanthionine (MeLan).

Πέντε από τα αμινοξέα της νισίνης μαζί με τις κυστεΐνες δημιουργούν τους θειοαιθερικούς δεσμούς, που σχηματίζουν τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους lantionine. Οι θειοαιθερικοί δεσμοί δίνουν στη νισίνη δύο συστήματα δακτυλίων, τα οποία εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο του μορίου. Λόγω των δακτυλίων αυτών, το μόριο της νισίνης έχει ελικοειδή τρισδιάστατη δομή. Έτσι, η νισίνη εμφανίζει το εξωτερικό της τμήμα να είναι περισσότερο υδρόφοβο από το εσωτερικό της τμήμα (Breukink και de Kruijff 1999). Το γεγονός αυτό έχει επίσης σαν αποτέλεσμα η νισίνη να εμφανίζεται θετικά φορτισμένη.

Στη φύση παρατηρούνται δύο μορφές της νισίνης, η νισίνη A και η νισίνη Z. Η νισίνη A διαφέρει από τη νισίνη Z σε ένα μόνο αμινοξύ στη θέση 27, το οποίο είναι ιστιδίνη στη νισίνη A και ασπαργινίνη στη νισίνη Z (Mulders και συν 1991), αλλά τα δύο πεπτίδια δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά στις ιδιότητές τους.

Η νισίνη εξετάσθηκε και κρίθηκε ασφαλής σε πειραματόζωα, αφού δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό τους (Frazer και συν. 1962, Shtenberg και Ignatev 1970). Έχει εγκριθεί σε πάνω από πενήντα χώρες σε όλο τον κόσμο για χρήση στα τρόφιμα (Jay 2000). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι εγκεκριμένη ως συντηρητικό κάποιων τροφίμων, πχ ανακατεργασμένο τυρί και κρέμα (Οδηγία 95/2/EK της ΕΕ) με κωδικό E 234. Σύμφωνα με την κοινή επιτροπή ειδικών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (WHO/FAO), ως μέγιστη ημερήσια δόση για άτομο 70 κιλών, συνίστανται τα 60 mg ή 33000 IU (Hurst και Hoover 1993). Στις ΗΠΑ το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για χρήση σε επεξεργασμένα τυριά είναι 10000 IU/g, ενώ στη Ρωσία 8000 IU/g. Σε Αργεντινή, Ιταλία και Μεξικό το όριο είναι 500 IU/g στα επεξεργασμένα τυριά και άλλα προϊόντα (Chikindas και Montville 2002). Σε κάποιες χώρες η νισίνη επιτρέπεται να προστεθεί σε διάφορα τρόφιμα, όπως κονσερβοποιημένες σούπες

(Αυστραλία), πάγος για συντήρηση φρέσκων ψαριών (Βουλγαρία), παιδικές τροφές – ψημένα τρόφιμα – μαγιονέζα (Τσεχία) και μίλκσεϊκ (Ισπανία) (Hurst και Hoover 1993).

Η νισίνη προστίθεται στα τρόφιμα συχνότερα με την μορφή εμπορικών σκευασμάτων (Lück και Jager 1997) και λιγότερο με την προσθήκη στα τρόφιμα των οξυγαλακτικών καλλιεργειών που την παράγουν. Τα βασικότερα εμπόδια για την ευρύτερη εμπορική χρήση της νισίνης στα τρόφιμα είναι το υψηλό κόστος παρασκευής και η αναποτελεσματικότητα κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων.

1.5.2. Αντιμικροβιακή δράση

Η νισίνη έχει βακτηριοκτόνο δράση για μεγάλο εύρος Gram θετικών βακτηρίων και αποτρέπει την εκβλάστηση των σπόρων τους. Αντίθετα είναι αναποτελεσματική κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων λόγω του προστατευτικού ρόλου μιας εξωτερικής μεμβράνης που τα περιβάλλει (Hurst και Hoover 1993, De Vuyst και Vandamme 1994).

Σαν αντιμικροβιακή ουσία η νισίνη παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων αντιμικροβιακών ουσιών: 1) είναι μια ουσία ευρέως αναγνωρισμένη ως ασφαλής «GRAS» (FDA 1988), 2) είναι σταθερή σε συνθήκες κατάψυξης και θερμικής επεξεργασίας, 3) είναι ενεργή σε συνθήκες χαμηλού pH και 4) αποδομείται εύκολα από τις πρωτεάσες του ανθρώπινου πεπτικού σωλήνα (Cutter και Siragusa 1998, Joerger και συν. 2000).

Νισίνη και Gram θετικά βακτήρια

Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης περιλαμβάνει τόσο παθογόνα, όσο και μη παθογόνα Gram θετικά βακτήρια των τροφίμων. Έτσι, η νισίνη είναι δραστική

κατά των οξυγαλακτικών βακτηρίων των τροφίμων π.χ. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Leuconostoc cremoris*, *Pediococcus pentosaceus* και κατά παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων όπως *Clostridium sporogenes*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* (Cindas και συν. 1998).

Μηχανισμός δράσης. Ο βασικότερος μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης της νισίνης κατά των Gram θετικών βακτηρίων είναι η δημιουργία πόρων στη κυτταρική τους μεμβράνη που έχει σαν συνέπεια την διαταραχή της λειτουργίας των βακτηριακών κυττάρων (Sahl και Brandis 1983, Montville και συν 1995, Breukink και de Kruijff 1999, Hoffman και συν. 2001)

Ο σχηματισμός πόρων στη βακτηριακή μεμβράνη γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η νισίνη δεσμεύεται στη βακτηριακή μεμβράνη. Η δέσμευση αυτή είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ του θετικά φορτισμένου υδρόφοβου τμήματος της νισίνης με την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή μεμβράνη. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι σε μεμβράνες που περιέχουν ποσοστό μεγαλύτερο του 40 % σε λιπίδια με αρνητικό φορτίο, η ποσότητα της νισίνης που δεσμεύεται σε αυτές αυξάνεται σημαντικά (Breukink και συν. 1997). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι γενικά τα Gram-θετικά βακτήρια περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων με αρνητικό φορτίο στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη από τα Gram-αρνητικά βακτήρια (O'Leary και Wilkinson 1988, Breukink και συν. 1997, Breukink και de Kruijff 1999). Μετά το πρώτο στάδιο της δέσμευσης της νισίνης από το λιπιδικό στρώμα της βακτηριακής μεμβράνης, ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, όπου το υδρόφιλο τμήμα της νισίνης εισέρχεται στη μεμβράνη, που έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πόρου.

Η προσβολή της βακτηριακής μεμβράνης με τον σχηματισμό πόρων, έχει σαν αποτέλεσμα την διαρροή διαφόρων ουσιών όπως ιόντων, αμινοξέων ή ATP (μικρού

μεγέθους μεταβολιτών), γεγονός που οδηγεί σε άμεση αναστολή όλων των κυτταρικών βιοσυνθετικών διαδικασιών του βακτηρίου (Sahl και Brandis 1983, Ruhr και Sahl 1985, Benz και συν. 1991, Jack και συν. 1994). Η είσοδος της νισίνης στο βακτηριακό κύτταρο έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την αναστολή σύνθεσης διαφόρων μακρομορίων όπως DNA, RNA, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών (Sahl και Brandis 1982).

Επιπρόσθετα της δημιουργίας πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, η νισίνη προκαλεί αναστολή της σύνθεσης του λιπιδίου II, το οποίο συμμετέχει στην σύνθεση των πεπτιδογλυκανών της μεμβράνης. Το γεγονός αυτό προκαλεί αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου (Brotz και συν. 1998). Επίσης, η αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των σταφυλοκοκκικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται και σε δύο υδρολυτικά ένζυμα που απελευθερώνονται από τη νισίνη (Bierbaum και Sahl 1987).

Η αποτρεπτική, για την εκβλάστηση των σπόρων, δράση της νισίνης οφείλεται στην παρουσία του αμινοξέος 2,3- διυδροξυαλανίνη (Dha) στη θέση 5 του πεπτιδίου (Liu και Hansen 1993, Chan και συν. 1996), που αντιδρά με ένα παράγοντα που είναι αναγκαίος για την εκβλάστηση των σπόρων (Chan και συν. 1996).

Νισίνη και Gram αρνητικά βακτήρια

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν για την αναποτελεσματικότητα της νισίνης κατά της ομάδας των Gram αρνητικών βακτηρίων, στην οποία ανήκουν πολλά παθογόνα των τροφίμων. Η αδυναμία αυτή της νισίνης οφείλεται κυρίως στην προστατευτική εξωτερική μεμβράνη, η οποία καλύπτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από δύο στρώματα, ένα εξωτερικό από μόρια λιποπολυσακχαριτών (LPS) και ένα εσωτερικό από γλυκεροφωσφολιπίδια. Τα

μόρια των λιποπολυσακχαριτών αποτελούνται από ένα λιπιδικό μέρος και ένα σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με ελάχιστα ανιονικό χαρακτήρα και σχηματίζουν ένα συμπαγές στρώμα με υδρόφιλη επιφάνεια (Nikaido 1996). Ως αποτέλεσμα, η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελεί φραγμό για την είσοδο υδρόφοβων ουσιών και μακρομορίων, όπως είναι η νισίνη.

Για να δράσει η νισίνη κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων, πρέπει πρώτα να αρθεί ο φραγμός της προστατευτικής μεμβράνης. Η προσβολή της εξωτερικής τους μεμβράνης, επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως χηλικών ενώσεων π.χ. EDTA (Stevens και συν. 1991, Delves-Broughton 1993, Schved και συν. 1994, Cutter και Siragusa 1995 a,b), αιθανόλης (Brewer και συν. 2002), αιθέριων ελαίων βοτάνων (Singh και συν. 2001, Dykes και συν. 2003, Yamazaki και συν. 2004) ή και με την χρήση χαμηλής θερμοκρασίας (Boziaris και Adams 2001). Ακολούθως, μετά την προσβολή της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης, η νισίνη μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να δράσει εναντίον του Gram αρνητικού βακτηρίου.

1.5.3. Χρήση της νισίνης σε ορισμένα ζωικά τρόφιμα

Μετά την ανακάλυψη της νισίνης, αρκετές προσπάθειες έγιναν για την πρακτική εφαρμογή της. Οι Taylor και συνεργάτες το 1949 δοκίμασαν τη δράση της νισίνης στη θεραπεία της μαστίτιδας σε γαλακτοπαραγωγά ζώα. Η πρώτη προσπάθεια για χρήση της νισίνης στα τρόφιμα έγινε από τους Hirsch και συν. (1951).

Νισίνη και κρεατοσκευάσματα. Η προσθήκη νισίνης (800 IU/g) σε ωμό μιττωτό κρέατος βούβαλου που ενοφθαλμίστηκε με *Listeria monocytogenes* (10^3 cfu/g) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των πληθυσμών του παθογόνου κατά 2,4 log cfu/g σε σχέση με τους μάρτυρες, στη διάρκεια της συντήρησης στους 4⁰ C για 16 ημέρες

(Pawar και συν. 2000). Σφάγια μοσχαριών που ενοφθαλμίστηκαν με *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* και *L. innocua* ($4 \log \text{ cfu/cm}^2$) και ψεκάστηκαν με νισίνη (5000 IU/ml), παρουσίασαν μείωση των πληθυσμών των μικροβίων κατά 1,8 έως $3,5 \log \text{ cfu/cm}^2$ αμέσως μετά τον ψεκασμό και κατά 2,0 έως $3,6 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ μετά από συντήρηση στους 4°C για μία ημέρα (Cutter και Siragusa 1994).

Στην διάρκεια συντήρησης μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος στους 4°C , η προσθήκη νισίνης (10000 IU/g) ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* όχι όμως και της *Pseudomonas fragi*, ενώ σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (80 % CO_2 και 20 % αέρα) ανέστειλε την ανάπτυξη και των δύο παραπάνω μικροοργανισμών (Fang και Lin 1994). Ο συνδυασμός 3000 IU/g νισίνης και 40 ppm νιτρικών αλάτων απέτρεψε σχεδόν ολοκληρωτικά την εκβλάστηση των σπόρων *C. sporogenes* σε ζωμούς κρέατος που διατηρήθηκαν στους 37°C για 56 ημέρες (Rayman και συν. 1981). Επίσης, σε χοίρειο κρέας με τιμή pH 5,8 ο συνδυασμός νισίνης σε συγκέντρωση 22000 IU/g με 60 ppm νιτρικών αλάτων, δεν μπόρεσε να αποτρέψει την εκβλάστηση σπόρων *C. botulinum*, ενώ αντίθετα σε pH 5,5 ο συνδυασμός νισίνης 8000 IU/g με 60 ppm νιτρικών αλάτων απέτρεψε την εκβλάστηση σπόρων *C. botulinum* (Rayman και συν. 1983).

Σε συντήρηση (4°C) υπό κενό ζωμών κρέατος κοτόπουλου που επιμολύνθηκαν με *C. botulinum*, η προσθήκη νισίνης (4000 IU/g) και νιτρικών (120 ppm) καθυστέρησε τον σχηματισμό της τοξίνης της αλλαντίασης για 5 εβδομάδες, σε αντίθεση με τους μάρτυρες που εμφάνισαν την τοξίνη από την 1^η εβδομάδα (Taylor και συν. 1985).

Νισίνη και γαλακτοκομικά. Οι Ferreira και Lund (1996) παρατήρησαν ότι η προσθήκη νισίνης (2000 IU/g) σε τυρί cottage (pH 4.6 – 4.7) μείωσε την *L.*

monocytogenes που είχαν ενοφθαλμίσει στο τυρί αυτό, κατά 3 log μετά από 3 ημέρες συντήρησης στους 20 °C. Ομοίως, οι Davies και συν. (1997) βρήκαν ότι η προσθήκη νισίνης (100 IU/g) σε τυρί ricotta ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε συντήρηση σε θερμοκρασία 6 – 8 °C για χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, σε αντίθεση με τους μάρτυρες που περιείχαν υψηλούς πληθυσμούς του παθογόνου καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Σε τυρί cold pack cheese spreads, η νισίνη (100 και 300 IU/g) μείωσε σημαντικά τους πληθυσμούς *L. monocytogenes*, *S. aureus* και των θερμικά ευαισθητοποιημένων σπόρων *C. sporogenes* (Zottola και συν. 1994).

Η νισίνη κατάφερε να αναστείλει πλήρως, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις 5 ή 10 IU/ml την ανάπτυξη στελεχών *Bacillus spp.* που είχαν ενοφθαλμιστεί σε κρέμα κατά τη συντήρηση της στους 8 και 10 °C (Nissen και συν. 2001). Οι Samelis και συν. (2003) μελέτησαν την ανασταλτική δράση της νισίνης κατά της *L. monocytogenes* (10^4 cfu/g) σε ανθότυρο συσκευασμένου σε κενό. Η νισίνη (500 IU/g) προστιθέμενη τόσο στον ορό πριν την τυροκόμηση, όσο και στο τελικό προϊόν είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του παθογόνου (0.7 – 2.2 log cfu/g) μέχρι την 5^η ημέρα της συντήρησης στους 4 °C, ενώ μετέπειτα παρουσίασε ανάπτυξη μέχρι το τέλος της συντήρησης (45^η ημέρα).

Νισίνη και αλιεύματα. Η προσθήκη νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε δείγματα σολωμού ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes* (10^3 cfu/g) και συσκευασμένα σε ατμόσφαιρα CO₂, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 1 – 2 log στο τέλος της συντήρησης στους 4 °C για 27 ημέρες (Nilsson και συν. 1997).

Για την αύξηση της διάρκειας συντήρησης των γαρίδων, προστίθενται οργανικά οξέα (κυρίως σορβικό και βενζοϊκό), αλλά τα οξέα αυτά δημιουργούν ανησυχίες για πιθανά προβλήματα υγείας στους καταναλωτές. Η προσθήκη νισίνης

(800 IU/g) σε γαρίδες σε άλμη, σαν εναλλακτική μορφή συντηρητικού, είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Einarsson και Lauzon 1995).

Σε καπνιστή πέστροφα που ενοφθαλμίστηκε με *L. monocytogenes* (4.9 log cfu/g) και συντηρήθηκε στους 8 °C για 17 ημέρες, τόσο η νισίνη (4000 IU/g) όσο και το γαλακτικό νάτριο (1%) μείωσαν τον πληθυσμό του παθογόνου σε 3.3 log cfu/g. Όμως, η προσθήκη του συνδυασμού των δύο αυτών ουσιών ήταν πιο αποτελεσματική, αφού προκάλεσε μείωση στον πληθυσμό της *L. monocytogenes* σε 1.8 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης (Nykänen και συν. 2000).

Οι Zuckerman και Avraham (2002) βρήκαν ότι η μεμονωμένη προσθήκη της νισίνης σε σολομό προκάλεσε μείωση του αρχικού πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 2.5 log cfu/g, ενώ η προσθήκη του συνδυασμού της νισίνης με το Microgard™ (βακτηριοσίνη του *Propionibacterium shermanii*) παρουσίασε μείωση κατά 1.5 log cfu/g, μετά από συντήρηση 3 ημερών στους 6 °C. Επίσης, η προσθήκη του συνδυασμού τους μείωσε την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (τελικός πληθυσμός 4.7 log cfu/g έναντι 8.3 log cfu/g των μαρτύρων) μετά από συντήρηση 8 ημερών σε θερμοκρασία 6 °C.

Νισίνη και συσκευασία. Η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών σε πλαστικά φύλλα της συσκευασίας, αποτελεί μια μέθοδο για τον έλεγχο των παθογόνων καθώς και των μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα τρόφιμα. Για να είναι αποτελεσματική, η αντιμικροβιακή δράση με τα πλαστικά φύλλα της συσκευασίας πρέπει τα φύλλα αυτά να εφάπτονται στο τρόφιμο, ώστε η αντιμικροβιακή ουσία να διαχέεται στην επιφάνειά του τροφίμου. Η προσθήκη της νισίνης στα πλαστικά φύλλα της συσκευασίας για μια αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη συντήρηση τροφίμων (κρέας, τυριά κλπ), αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας την τελευταία δεκαετία. Δύο είναι οι κύριες μέθοδοι προσθήκης νισίνης στα φύλλα του υλικού

συσκευασίας, είτε με ενσωμάτωση στα υλικά της συσκευασίας ή με απορρόφηση της νισίνης στην επιφάνεια της μεμβράνης υλικού της συσκευασίας.

Οι Siragusa και συν (1999) ενσωμάτωσαν νισίνη σε φύλλο από πολυαιθυλένιο που χρησιμοποιήθηκε για συσκευασία σε κενό σφάγιων μόσχου. Τις πρώτες 2 ημέρες συντήρησης στους 4 °C, παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του *B. thermosphacta* κατά 2 log. Η ενσωμάτωση νισίνης σε βρώσιμη μεμβράνη από κυτταρίνη που χρησιμοποιήθηκε για τη συσκευασία διαφόρων τροφίμων, είχε σαν αποτέλεσμα την ανασταλτική δράση έναντι των *Listeria innocua* και *S. aureus* κατά την διάρκεια της συντήρησης τους στην ψύξη (Coma και συν. 2001).

Οι Bower και συν (1995) μελέτησαν την επίδραση πλαστικού φύλλου συσκευασίας με νισίνη σε υπόστρωμα που περιείχε *L. monocytogenes*. Το παθογόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις νισίνης (40000 IU/ml) δεν παρουσίασε ανάπτυξη, ενώ αντίθετα όταν τοποθετήθηκε σε χαμηλότερη συγκέντρωση νισίνης (4000 IU/ml) παρουσίασε μικρότερο βαθμό αναστολής του παθογόνου.

Οι Scannell και συν. (2000) εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση της νισίνης που είχε απορροφηθεί σε πλαστικό φύλλο συσκευασίας, κατά των *L. innocua* και *S. aureus* σε τυρί και χοιρομέρι στην διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη (4 °C). Οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. innocua* (4×10^5 cfu/g) παρουσίασαν μείωση >3 log cfu/g στο τυρί μετά από 5 ημέρες και μείωση κατά 1.5 log cfu/g στο χοιρομήρι μετά από 12 ημέρες. Οι αρχικοί πληθυσμοί του *Staphylococcus aureus* (4×10^5 cfu/g) μειώθηκαν 1.5 και 2.8 log cfu/g στο τυρί και το χοιρομέρι, αντίστοιχα μετά από 12 ημέρες συντήρηση.

1.6 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

1.6.1. *Escherichia coli* O157:H7

Η εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC) αναγνωρίστηκε ως παθογόνο μόλις το 1982, όταν το στελέχος *Escherichia coli* O157:H7 απομονώθηκε από δύο τροφογενείς λοιμώξεις μετά από κατανάλωση χάμπουργκερ από βόειο κρέας μιας αλυσίδας εστιατορίων στις πολιτείες του Όρεγκον και του Μίσιγκαν των Η.Π.Α. (Riley και συν. 1983, Wells και συν. 1983).

Όλα τα στελέχη της εντεροαιμορραγικής *E. coli* παράγουν τοξίνες που ονομάζονται επίσης και shiga-τοξίνες, εξαιτίας της ομοιότητας που παρουσιάζουν με την τοξίνη της *Shigella dysenteriae*. Οι Karmali και συν. (1985) συνέδεσαν τα στελέχη που παράγουν αυτές τις τοξίνες με το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), το οποίο μπορεί να οδηγήσει και σε θάνατο.

Η *E. coli* O157:H7 εμφανίζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες $\geq 44.5^{\circ}\text{C}$
- Δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες
- Δεν παράγει τη β-γλυκουρονιδάση
- Μπορεί να διαθέτει το γονίδιο *eae* το οποίο ευθύνεται για την προσκόλληση και παθογόνο δράση του μικροοργανισμού στο έντερο.

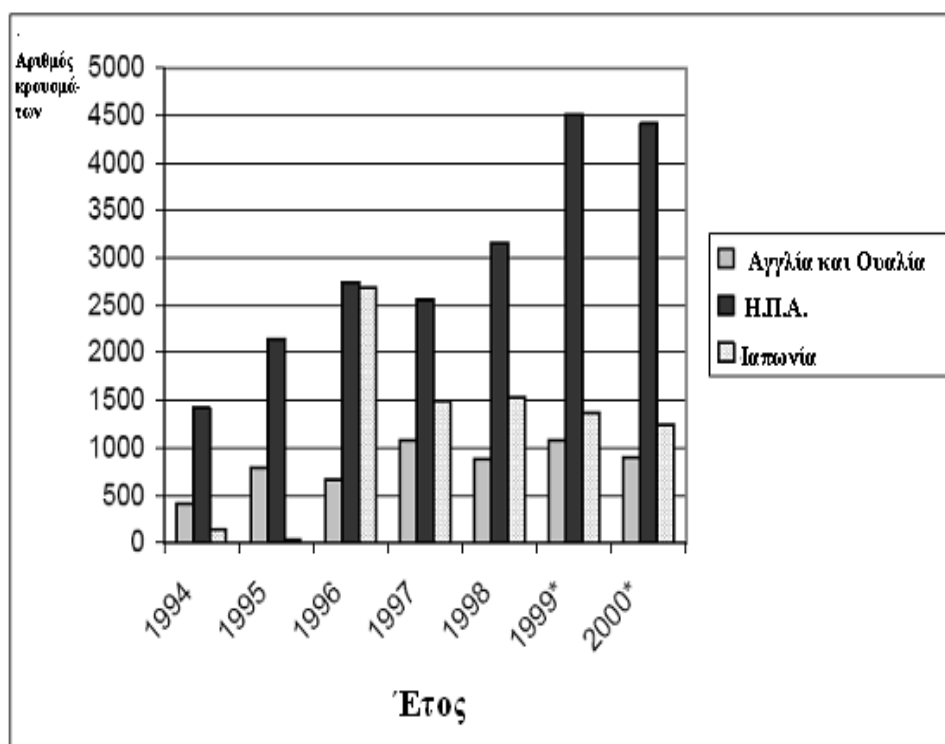
Η *E. coli* O157:H7 παρουσιάζει ασυνήθιστη ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον. Ως ελάχιστο εύρος pH, στο οποίο δύναται να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός. θεωρείται η περιοχή 4 - 4.5, αλλά αυτό εξαρτάται και από άλλους παράγοντες. Έτσι όταν το παθογόνο ενοφθαλμίστηκε σε μεγάλους πληθυσμούς, επέζησε σε ώριμο λουκάνικο αέρος (pH 4.5) για περισσότερο από δύο μήνες σε θερμοκρασία 4°C

(Glass και συν. 1992). Σε μαγιονέζα (pH 3.6-3.9), επέζησε για 5 - 7 εβδομάδες στους 5 °C και για 1 - 3 εβδομάδες στους 20 °C (Zhao και Doyle 1994).

Αντίθετα, η *E. coli* O157:H7 είναι ευαίσθητη στην θερμική επεξεργασία. Οι τιμές κλίσης (D) της λογαριθμικής μείωσης ήταν 270, 45, 24 και 9.6 δευτερόλεπτα στους 57.2, 60, 62.8 και 64.3 °C αντίστοιχα (Doyle και Shoeni 1984). Η παστερίωση του γάλακτος (72 °C για 16 sec) θεωρείται αποτελεσματική για τη θανάτωση του παθογόνου (D'Aoust και συν. 1988).

Δεξαμενή του παθογόνου αυτού οργανισμού στη φύση θεωρήθηκε αρχικά ότι αποτελούν τα βοοειδή, αλλά μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ανευρίσκεται και σε άλλα είδη ζώων, όπως τα πρόβατα, οι αίγες, τα γουρούνια, τα άλογα κ.α. Διάφορα είδη τροφίμων έχουν αναγνωριστεί ως το μέσο μόλυνσης του ανθρώπου από το παθογόνο στέλεχος *E. coli* O157:H7. Ανάμεσα σε αυτά είναι το ατελώς ψημένο κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, το νωπό γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ο μη παστεριωμένος χυμός μήλου κτλ (Meng και Doyle 1998). Οι μεγαλύτερες ομαδικές τροφογενείς λοιμώξεις από το στέλεχος αυτό έχουν καταγραφεί στην Ιαπωνία το 1996, όπου 11000 άνθρωποι είχαν νοσήσει (Michino και συν. 1998) και στην Σκωτία με 501 κρούσματα και 21 θανάτους (Ahmed και Donaghy 1998). Το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Λοιμώξεων των Η.Π.Α. υπολογίζει ότι συμβαίνουν 73480 περιστατικά λοίμωξης και 61 θάνατοι ετησίως από *E. coli* O157:H7 στις Η.Π.Α. (Mead και συν. 1999). Στο Σχήμα 2 που ακολουθεί απεικονίζεται χαρακτηριστικά η αύξηση των κρουσμάτων που καταγράφονται τα τελευταία χρόνια.

Σχήμα 2. Αριθμός των καταγεγραμμένων κρουσμάτων από *E. coli* O157:H7 σε Η.Π.Α. (1994-2000), Αγγλία και Ουαλία (1994-2000) καθώς και Ιαπωνία (1996-2000) (WHO 2004).



Στην Ελλάδα, η *E. coli* O157:H7 ανιχνεύθηκε σε νωπό αγελαδινό γάλα (450 δείγματα) σε ποσοστό 1.77% και σε νωπό αίγιο (460 δείγματα) και πρόβειο γάλα (595 δείγματα) σε ποσοστό 0.8% (Gouvaris και συν. 2002, Gouvaris και συν. 2004, Gouvaris και συν. 2005). Οι Dontorou και συν. (2003) αναφέρουν την απομόνωση του μικροοργανισμού από ένα δείγμα πρόβειου γάλακτος (1%), από ένα δείγμα φρέσκου λουκάνικου (1.3%) και από έντερο χοίρου (2%). Οι Dontorou και συν. (2004) απομόνωσαν το παθογόνο σε κόπρανα αιγός από την περιοχή της Ηπείρου.

1.6.2. *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, το οποίο είναι ευρύτατα διαδεδομένο στο περιβάλλον. Είναι ευκαιριακά παθογόνο και προσβάλλει συνήθως άτομα με μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα (φορείς του AIDS, άτομα με χρόνιες παθήσεις, εγκύους, βρέφη ή υπερήλικες) προκαλώντας λοίμωξη, η οποία μπορεί να αποβεί μοιραία για τη ζωή του ατόμου σε ποσοστό 20-30% (Mead και συν. 1999).

Η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 0 έως 45 °C. Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται συνήθως σε pH από 5.6-9.6, ενώ αν και μπορεί να επιβιώσει σε τιμές pH χαμηλότερες 4.3 δεν πολλαπλασιάζεται (Lou and Yousef 1999). Τα περισσότερα στελέχη της *L. monocytogenes* απαιτούν ελάχιστη τιμή ενεργού υγρασίας (a_w) 0.93 για να αναπτυχθούν, αλλά κάποια στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν και σε τιμές a_w 0.90 (Lou and Yousef 1999). Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τιμές a_w 0.83 (Shahamat και συν. 1980). Σημαντικό χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού είναι ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl), έως και 12%.

Παρά την ευρύτατη διάδοση της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον, τα τρόφιμα αναγνωρίστηκαν ως το κύριο μέσο για την μετάδοση στον άνθρωπο μόλις τη δεκαετία του 1980 μετά από μεγάλες, ομαδικές λοιμώξεις στην Ευρώπη και την Βόρειο Αμερική (Broome και συν. 1990, Bille 1990). Σε περιστατικά τροφογενών λοιμώξεων από *L. monocytogenes* έχουν ενοχοποιηθεί πολλά είδη τροφίμων όπως: τυριά, χοινοτόγκ, επεξεργασμένο κρέας, σαλάμι, παστεριωμένο σοκολατούχο γάλα,

νωπό και παστεριωμένο γάλα, βούτυρο, μαγειρεμένες γαρίδες, καπνιστό ψάρι, πατατοσαλάτα και ωμά λαχανικά (WHO/FAO 2004).

Στις περισσότερες περιπτώσεις τροφογενούς λοίμωξης από *L. monocytogenes*, ο πληθυσμός του παθογόνου στο εμπλεκόμενο τρόφιμο ξεπερνούσε το 10^3 CFU/g (EC 1999, FDA/FSIS 2001). Υπήρχαν όμως και περιστατικά που ο πληθυσμός του βακτηρίου στο εμπλεκόμενο τρόφιμο κυμαινόταν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Υπάρχει όμως μια ευρύτερη αμφισβήτηση στις παραπάνω εκτιμήσεις, η οποία στηρίζεται στο γεγονός, ότι οι πληθυσμοί του παθογόνου στις ποσότητες του τροφίμου που καταναλώθηκε από τα άτομα τα οποία νόσησαν τελικώς, διέφεραν σημαντικά από τους πληθυσμούς που κατεγράφησαν στο τρόφιμο μετά την εκδήλωση της τροφολοίμωξης (WHO/FAO 2004).

Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί απεικονίζεται ο αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης στις χώρες της Ε.Ε. το 2004 (EFSA 2004).

Πίνακας 6. Αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ε.Ε. ανάλογα με την ηλικία το 2004 (EFSA 2004).

	ΗΛΙΚΙΕΣ							Άγνοστος ηλικίας
	<1	1 to 4	5 to 14	15 to 24	25 to 44	45 to 64	65	
L. MONOCYTOGENES								
ΑΥΣΤΡΙΑ	0	0	0	0	0	10	9	0
ΒΕΛΓΙΟ	7	-	2	1	7	18	35	-
ΤΣΕΧΙΑ	0	1	1	0	4	5	5	0
ΔΑΝΙΑ	3	-	-	-	2	10	26	-
ΕΣΘΟΝΙΑ	0	0	0	0	0	2	0	0
ΦΙΛΑΝΔΙΑ	0	0	0	0	3	8	24	0
ΓΑΛΛΙΑ	0	1	4	0	7	55	120	-
ΓΕΡΜΑΝΙΑ	20	3	-	2	30	77	163	-
ΟΥΓΓΑΡΙΑ	0	0	0	0	3	10	2	0
ΙΡΑΝΔΙΑ					4	3	3	1
ΙΤΑΛΙΑ	-	-	-	1	3	9	12	-
ΛΕΤΤΟΝΙΑ	2	-	-	-	1	1	-	-
ΛΙΘΟΥΑΝΙΑ	0	0	0	0	0	1	0	-
ΝΟΡΒΗΓΙΑ	1	-	-	-	1	9	10	-
ΠΟΡΤΟΓΑΛΛΙΑ	-	-	-	11	23	-	-	1
ΣΛΟΒΑΚΙΑ	-	-	-	-	3	3	2	-
ΣΟΥΗΔΙΑ	1	1	0	0	3	10	29	0
ΟΛΛΑΝΔΙΑ	1	0	0	0	6	15	29	4
LISTERIA SPP.								
ΑΥΣΤΡΙΑ	0	0	0	0	0	10	9	0
ΕΛΛΑΔΑ	0	0	0	0	0	0	3	0
ΟΥΓΓΑΡΙΑ	0	0	0	0	0	0	1	0
ΙΡΑΝΔΙΑ	-	-	-	-	4	2	3	1
ΛΕΤΤΟΝΙΑ	2	-	-	-	2	1	-	-
ΝΟΡΒΗΓΙΑ	1	-	-	-	1	9	10	-
ΠΟΛΩΝΙΑ	-	-	-	-	-	-	-	10
ΠΟΡΤΟΓΑΛΛΙΑ	-	-	-	11	23	1	1	1
ΣΛΟΒΕΝΙΑ	-	-	-	-	-	1	-	-
ΙΣΠΑΝΙΑ	9	-	-	-	15	26	46	4
ΣΟΥΗΔΙΑ	1	1	0	0	3	10	29	0
ΟΛΛΑΝΔΙΑ	1	0	0	0	6	15	29	4
ΑΓΓΛΙΑ	6	2	3	3	30	47	135	10

1.6.3. *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, Gram-θετικό βακτήριο. Είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος μικροοργανισμός στο περιβάλλον και παρά το γεγονός ότι είναι παθογόνος, απαντάται και σε υγιείς ανθρώπους στη χλωρίδα των ρινικών κοιλοτήτων, του δέρματος ή του περινέου. Μάλιστα υπολογίζεται ότι ποσοστό 30-50% του υγιούς πληθυσμού φέρει το βακτήριο στις ρινικές του κοιλότητες (Le Loir και συν. 2003).

Ορισμένα στελέχη του *S. aureus* μπορούν να παράγουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, οι οποίες αποτελούν το κύριο αίτιο των τροφογενών λοιμώξεων που προκαλούνται από το συγκεκριμένο βακτήριο. Ο *S. aureus* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (7 έως 48.5 °C), αλλά οι ιδανικές θερμοκρασίες για την ανάπτυξή του είναι από 30 έως 37 °C (Schmitt και συν. 1990). Ομοίως το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε ευρύ φάσμα τιμών pH (4.2 έως 9.3), αλλά ιδανικές όμως τιμές για την ανάπτυξή του θεωρούνται από 7 έως 7.5 (Bergdoll 1989). Ο *S. aureus* παρουσιάζει εξαιρετική ανθεκτικότητα στην παρουσία NaCl, αφού μπορεί και αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις μέχρι και 25% (Le Loir και συν. 2003).

Ο *S. aureus* αποτελεί ένα από τα πιο συχνά αίτια τροφολοιμώξεων σε παγκόσμια κλίμακα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα τόσο κατά το στάδιο της προετοιμασίας όσο και κατά το στάδιο της επεξεργασίας τους. Σε όλες τις περιπτώσεις τροφολοιμώξεων από *S. aureus*, το εμπλεκόμενο τρόφιμο ή κάποιο από τα συστατικά του εκτέθηκε σε θερμοκρασία, η οποία επέτρεψε στο παθογόνο να παράγει εντεροτοξίνες (Le Loir και συν. 2003). Οι εντεροτοξίνες του είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές τόσο στην θερμική επεξεργασία όσο και σε πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η πεψίνη και η τρυψίνη, με αποτέλεσμα να διατηρούν

την παθογόνο δράση τους στο γαστρεντερικό σωλήνα και μετά την διαδικασία της πέψης.

Τα τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί σε περιπτώσεις τροφολοιμώξεων από *S. aureus* είναι, μεταξύ των άλλων, γάλα, τυριά, κρέας και κρεατοσκευάσματα, ζυμαρικά, βούτυρο, σαλάτες, κ.α. (Bergdoll 1989). Το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα αποτελούν, σε πολύ μεγάλο ποσοστό, το εμπλεκόμενο τρόφιμο στις περιπτώσεις τροφολοιμώξεων από *S. aureus*. Έτσι στο Ηνωμένο Βασίλειο το 53% των τροφολοιμώξεων από το συγκεκριμένο παθογόνο που κατεγράφησαν το χρονικό διάστημα 1969 έως 1990, οφείλονταν στην κατανάλωση κρέατος και κρεατοσκευασμάτων (Wieneke και συν. 1993). Στη Γαλλία, το αντίστοιχο ποσοστό για το χρονικό διάστημα 1999 έως 2000, ήταν 22% (Haeghebaert και συν. 2002), ενώ στις Η.Π.Α. για το διάστημα 1975-1982 ήταν 36% (Genigeorgis 1989).

1.6.4. *Salmonella* spp.

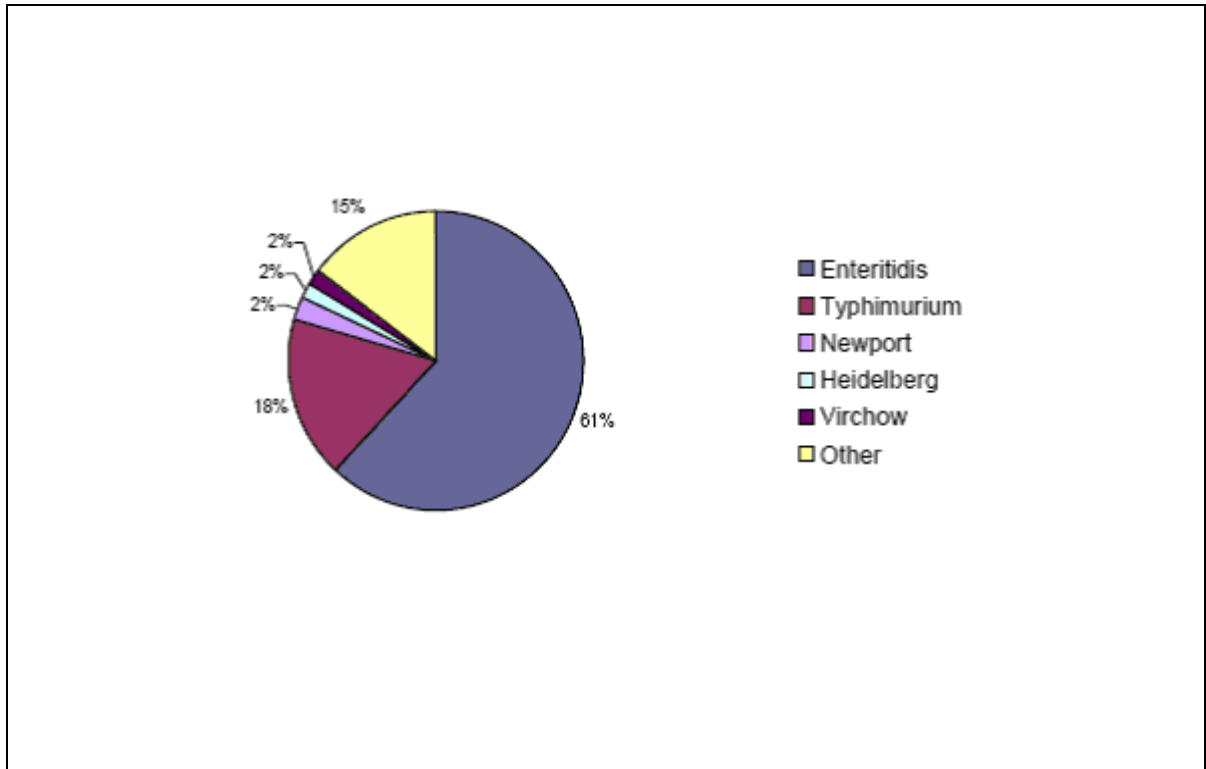
Η *Salmonella* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο Gram-αρνητικό βακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η ταξινόμηση των σαλμονελλών σύμφωνα με το μοντέλο των Kauffmann-White περιλαμβάνει περισσότερους από 2400 ορότυπους (Poroff και συν. 2000).

Οι σαλμονέλλες αναπτύσσονται ιδανικά σε θερμοκρασία 37 °C. Υπάρχουν όμως στελέχη, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και σε θερμοκρασίες ≤54 °C. Συγκεκριμένα η έκθεση μεσόφιλων στελεχών σε παρατεταμένης διάρκειας θερμικό σοκ μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλαγμένα στελέχη του ορότυπου *Typhimurium*, τα οποία είναι σε θέση να αναπτυχθούν στους 54⁰ C (Droffner και Yamamoto 1992). Οι σαλμονέλλες αναπτύσσονται σε τιμές pH από 4.5 έως 9.5

(ιδανικά σε 6.5-7.5). Η ανάπτυξη του παθογόνου εμποδίζεται σε τρόφιμα με $a_w \leq 0.93$, ενώ συγκέντρωση $\text{NaCl} \geq 4\%$ θεωρείται ότι σε γενικές γραμμές, αποτρέπει την ανάπτυξη των σαλμονελλών (D'Aoust 1989).

Οι σαλμονέλλες αποτελούν ένα από τα συχνότερα αίτια τροφολοιμώξεων, προκαλώντας πάνω από 1 εκατομμύριο λοιμώξεις κάθε χρόνο σε παγκόσμια κλίμακα (Pang και συν. 1995). Το μολυσμένο κρέας των πτηνών και τα αυγά αποτελούν το κυριότερο μέσο για την μόλυνση του ανθρώπου σε τέτοιο βαθμό, ώστε να υποβαθμίζεται η σημασία του χοιρινού και μοσχαρίσιου κρέατος που αποτελούν αρκετά συχνά το εμπλεκόμενο τρόφιμο σε τροφοδηλητηριάσεις από σαλμονέλλες. Ένας μεγάλος αριθμός τροφίμων έχουν ενοχοποιηθεί επίσης ως μέσο για την μόλυνση του ανθρώπου, όπως γάλα, τυριά, πατατοσαλάτα, λαχανικά κ.α. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και 10 κύτταρα από το στέλεχος *S. typhimurium* μπορούν να αποτελέσουν ικανή δόση για να προκληθεί λοίμωξη του ανθρώπου (D'Aoust και συν. 1985).

Τα στελέχη *S. typhimurium* και *S. enteritidis* απομονώνονται περισσότερο συχνά από άτομα που έχουν νοσήσει από σαλμονέλλες στην Ευρώπη και στην Ελλάδα, όπως φαίνεται στα σχήματα 3 και 4 αντίστοιχα.



Σχήμα 3. Ορότυποι *Salmonella spp.*, οι οποίοι απομονώθηκαν από άτομα που νόσησαν στην Ευρώπη (WHO 2004).

Greece	other serovars	29
	S. Adamstua	2
	S. Agama	1
	S. Anatum	1
	S. Blockley	1
	S. Enteritidis	309
	S. Infantis	1
	S. Paratyphi A	2
	S. Typhi	6
	S. Typhimurium	20
	Salmonella spp.	1 121

Σχήμα 4. Ορότυποι *Salmonella spp.*, οι οποίοι απομονώθηκαν από άτομα που νόσησαν στην Ελλάδα (EFSA 2004).

Κεφάλαιο 2^ο

Διερεύνηση της
αντιμικροβιακής δράσης των
αιθέριων ελαίων και του
συνδυασμού τους με νισίνη
in vitro

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων, οι οποίες απαιτούνται για την αναστολή διάφορων παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα *in vitro*, παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος που οφείλεται στο είδος του αιθέριου ελαίου που χρησιμοποιείται, στη σύστασή του, στο στέλεχος του μικροοργανισμού που εξετάζεται και στη μεθοδολογία η οποία εφαρμόζεται για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης (Burt 2004).

Τρεις συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος τους (0.3%, 0.6% και 0.9%) επιλέχθηκαν να μελετηθούν για την αντιμικροβιακή τους δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*, σε *in vitro* συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις αυτές των αιθέριων ελαίων επιλέχθηκαν, γιατί είναι ευρύτερα αποδεκτό ότι η προσθήκη αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν το 1% στα τρόφιμα, μπορεί να προκαλέσει απόρριψη του τροφίμου από τους καταναλωτές (Lis-Balchin και συν. 1998).

Εξάλλου, η νισίνη είναι μια βακτηριοσίνη με αντιμικροβιακή δράση και συνήθως χρησιμοποιείται στα τρόφιμα σε συγκεντρώσεις 500 έως 1000 IU/g (Pawar και συν. 2000).

Στόχος της παρούσας μελέτης στο κεφάλαιο αυτό ήταν η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης τριών συγκεντρώσεων των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου, του μίγματος αυτών, δύο συγκεντρώσεων νισίνης και των συνδυασμών τους σε *in vitro* συνθήκες.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Παθογόνα βακτήρια

Τα στελέχη των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Στελέχη των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων

Μικροοργανισμοί	Προέλευση
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL932	Prof. Genigeorgis, University of Davis, USA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL932	Prof. Genigeorgis, University of Davis, USA
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΑΠΘ ¹ , Ελλάδα
<i>Listeria monocytogenes</i> (Lmk)	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΠΘ ² , Ελλάδα
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sap)	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΑΠΘ ¹ , Ελλάδα
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sak)	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΠΘ ² , Ελλάδα
<i>Salmonella typhimurium</i>	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΑΠΘ ¹ , Ελλάδα
<i>Salmonella enteritidis</i> HO 9,12	Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, ΠΘ ² , Ελλάδα

¹Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

²Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το κάθε στέλεχος από τα χρησιμοποιηθέντα παθογόνα υποβαλόταν σε αναζωογόνηση με επώαση σε 50 ml ζωμού Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke, UK) στους 37° C για 24 ώρες με δύο διαδοχικές καλλιέργειες αναζωογόνησης. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα που προέκυπτε από τη φυγοκέντρηση, πλενόταν δύο

φορές με 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) (Oxoid), pH 7 και αραιωνόταν με PBS σε 1.0×10^8 cfu/ml. Το κυτταρικό αυτό εναιώρημα χρησιμοποιούταν για την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος (καλλιέργεια χρήσεως). Για το μίγμα των στελεχών των παθογόνων, τα δύο στελέχη ενώνονταν σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις. Ο προσδιορισμός του πληθυσμού των παθογόνων του ενοφθαλμίσματος γινόταν με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε πεπτονούχο ύδωρ (0.1%) 1:10 και καταμέτρηση σε διπλά τριβλία με Tryptone Soy Agar (TSA) (Oxoid). Η καλλιέργεια χρήσεως από κάθε στέλεχος ή από το μίγμα των στελεχών περιείχε τελικό βακτηριακό πληθυσμό περίπου 10^4 log cfu/ml.

2.2.2. Παρασκευή των αιθέριων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια παρασκευάστηκαν με απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation) αποξηραμένων φυτών ρίγανης (*Origanum vulgare spp. hirtum*), θυμαριού (*Thymus vulgaris*) και δενδρολίβανου (*Rosemarinus officinalis*). Τα παραπάνω φυτά που αποτελούνταν από στελέχη, μίσους, φύλλα και άνθη αγοράστηκαν από εξειδικευμένο τοπικό κατάστημα. Σε κάθε διαδικασία απόσταξης, ποσότητα 500 γραμμαρίων από κάθε φυτό τεμαχιζόταν, τοποθετόνταν σε δίλιτρη, σφαιρική φιάλη και γινόταν προσθήκη 1 λίτρου απιονισμένου ύδατος. Ακολουθούσε απόσταξη με υδρατμούς σε συσκευή τύπου Clevenger για 3 ώρες. Το αιθέριο έλαιο από κάθε φυτό που παραγόταν με την παραπάνω διαδικασία, συλλεγόταν, αποξηραινόταν με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου, τοποθετούνταν σε φιαλίδια σκούρου χρωματισμού και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.2.3. Παρασκευή των διαλυμάτων νισίνης

Για την παρασκευή των διαλυμάτων νισίνης χρησιμοποιήθηκε νισίνη σε καθαρή μορφή 10^6 IU/g (Nisaplin®), η οποία παραχωρήθηκε στο εργαστήριο από την εταιρεία Aplin and Barrett, Ltd (Trowbridge, UK). Η παρασκευή του διαλύματος εργασίας γινόταν με διάλυση της νισίνης σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCL) 0.02 N και αραιώση με αποστειρωμένο, απιονισμένο ύδωρ μέχρι να προκύψει τελικό διάλυμα συγκέντρωσης 25000 IU νισίνης/ml. Το διάλυμα αυτό αποστειρωνόταν με χρήση φίλτρου 0.2 μ m (Pall Newquay, Cornwall, UK) και στη συνέχεια διατηρούνταν σε θερμοκρασία -20° C μέχρι τη χρήση του.

2.2.4. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων σε ζωμό TSB

Σε 40 ml αποστειρωμένου ζωμού TSB (Oxoid, Basingstoke, UK), σε γυάλινους περιέκτες (100 ml) με βιδωτό πώμα, γινόταν προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου ή μίγματός τους σε συγκεντρώσεις 0, 0.3, 0.6, και 0.9 %. Η νισίνη προσθέτονταν σε συγκεντρώσεις 0, 500 και 1000 IU/ml σε 40 ml αποστειρωμένου ζωμού TSB (Oxoid, Basingstoke, UK), σε γυάλινους περιέκτες (100 ml) με βιδωτό πώμα. Για την παρασκευή του μίγματος των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αναλογίες:

- 0.1% αιθέριου ελαίου ρίγανης - 0.1% αιθέριου ελαίου θυμαριού – 0.1% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου, για το μίγμα των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.3%
- 0.2% αιθέριου ελαίου ρίγανης - 0.2% αιθέριου ελαίου θυμαριού – 0.2% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου, για το μίγμα των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.6% και

- 0.3% αιθέριου ελαίου ρίγανης - 0.3% αιθέριου ελαίου θυμαριού – 0.3% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου, για το μίγμα των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.9%.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και οι ακόλουθοι συνδυασμοί των αιθέριων ελαίων και της νισίνης:

- 0.3% αιθέριου ελαίου ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου ή του μίγματος των αιθέριων ελαίων και νισίνη 500 ή 1000 IU/ml.
- 0.6% αιθέριου ελαίου ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου ή του μίγματος των αιθέριων ελαίων και νισίνη 500 ή 1000 IU/ml
- 0.9% αιθέριου ελαίου ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου ή του μίγματος των αιθέριων ελαίων και νισίνη 500 ή 1000 IU/ml.

Στη συνέχεια γινόταν ο ενοφθαλμισμός του παθογόνου (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*) και ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 32 ώρες. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων γινόταν την 0, 4, 8, 12, 16, 24 και 32 ώρα της επώασης στους 37 °C. Τα δείγματα αραιώνονταν με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε στείρο πεπτονόχο ύδωρ (0.1%) και στη συνέχεια γινόταν ενοφθαλμισμός 0.1 ml στην επιφάνεια διπλών τριβλίων του αντίστοιχου εκλεκτικού υποστρώματος για το κάθε παθογόνο. Η καταμέτρηση των πληθυσμών του κάθε μικροοργανισμού γινόταν στα ακόλουθα εκλεκτικά υποστρώματα: PALCAM (Merck) για τη *L. monocytogenes*, Baird Parker (Merck) για τον *S. aureus*, SMAC (Oxoid) για την *E. coli* O157:H7 και XLD (Merck) για τη *Salmonella*. Τα τριβλία στην συνέχεια επωάζονταν στους 37 °C για 24 ώρες.

2.2.5. Στατιστική επεξεργασία

Η *in vitro* μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων και της νισίνης διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το τεστ του Bartlett. Στις περιπτώσεις που υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις των επιμέρους χειρισμών σε κάθε χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών του Duncan για τη διαπίστωση σημαντικών διαφορών μεταξύ τους. Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.

2.3. Αποτελέσματα

2.3.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.3, 0.6 και 0.9%) στο θρεπτικό ζωμό TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* φαίνεται στους πίνακες 7-10 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη 0.3% αιθέριου ελαίου ρίγανης στο ζωμό TSB οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν περίπου κατά 2.5, 2.3, 1.25 και 2 log cfu/ml την 4^η ώρα και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν φτάνοντας τους 5.94, 5.76, 7.05 και 6.83 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 ° C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των παθογόνων που εξετάστηκαν και μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.3%) ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση από την προσθήκη 0.3% ελαίου ρίγανης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής καθόσον οι πληθυσμοί όλων των παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν σε υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης.

Η προσθήκη 0.6 και 0.9% του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στο TSB είχε ως αποτέλεσμα τη μη καταγραφή αποικιών όλων των παθογόνων που εξετάστηκαν από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης.

Με την προσθήκη 500 IU/ml νισίνης στο TSB οι πληθυσμοί των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και του *S. aureus*) μειώθηκαν περίπου κατά 1.2 log cfu/ml την 4^η ώρα της επώασης και στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 7 και 7.85 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί αυτών

των Gram-θετικών βακτηρίων παρέμειναν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Αντίθετα οι πληθυσμοί των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E. coli* O157:H7 και *Salmonella*) δε διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) από τους αντίστοιχους των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης, ένδειξη της μη αντιμικροβιακής δράσης της νισίνης (500 IU/ml) κατά των παθογόνων αυτών.

Η προσθήκη της νισίνης (1000 IU/ml) στο TSB είχε ως αποτέλεσμα την ακόλουθη αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων: Οι πληθυσμοί των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) μειώθηκαν την 4^η ώρα της επώασης περίπου κατά 2.18 και 2 log cfu/ml και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν φτάνοντας στο τέλος της επώασης τους 5.4 και 6 log cfu/ml, αντίστοιχα. Αντίθετα οι πληθυσμοί των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E. coli* O157:H7 και *Salmonella*) δε διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) από τους αντίστοιχους των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης, φανερώνοντας τη μη αντιμικροβιακή δράση της νισίνης (1000 IU/ml) κατά των παθογόνων αυτών. Η προσθήκη της νισίνης (1000 IU/ml) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P < 0.05$) πληθυσμούς από τους πληθυσμούς της προσθήκης των 500 IU/ml κατά των Gram θετικών βακτηρίων, ένδειξη ισχυρότερης αντιμικροβιακής δράσης.

Η προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου της ρίγανης με 500 IU/ml νισίνης μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C. Ο ίδιος συνδυασμός μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς των *Salmonella* και της *E. coli* O157:H7 την 4^η ώρα κατά περίπου 1.3 και 1.2 log cfu/ml και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 3.27 και 4.92 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των

εξετασθέντων παθογόνων που προέκυψαν από την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης και της νισίνης ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από αυτούς που μετρήθηκαν όταν προστέθηκαν μεμονωμένα είτε το αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.3%) ή η νισίνη (500 IU/ml), ένδειξη συνεργού αντιμικροβιακής δράσης.

Η προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου της ρίγανης με 1000 IU/ml νισίνης μείωσε τους πληθυσμούς όλων των εξετασθέντων παθογόνων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) σε όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C.

Η προσθήκη των συνδυασμών του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6 και 0.9% v/v) με τη νισίνη (500 IU/ml ή 1000 IU/ml) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των εξετασθέντων παθογόνων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων στους 37 °C για 32 ώρες.

Πίνακας 7. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης (PI), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Listeria monocytogenes* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση PI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις PI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.18±0.14a	4.11±0.19a	4.00±0.16a	3.94±0.12a	4.10±0.27a	4.15±0.15a	4.05±0.16a	4.02±0.12a	3.94±0.14a	3.88±0.15a	3.91±0.13a	3.85±0.29a
4	4.88±0.26a	1.52±0.11e	0±0.0c	0±0.0c	2.88±0.15b	1.86±0.17d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.20a	1.68±0.12e	0±0.0c	0±0.0c	3.90±0.25b	2.07±0.13d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.03±0.23a	2.69±0.19b	0±0.0c	0±0.0c	5.70±0.19d	2.85±0.2b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	7.85±0.24a	3.76±0.16b	0±0.0c	0±0.0c	6.68±0.16d	3.60±0.26b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.91±0.22a	4.88±0.07b	0±0.0c	0±0.0c	7.76±0.23d	4.50±0.3b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.99±0.27a	5.94±0.23b	0±0.0c	0±0.0c	7.85±0.2d	5.42±0.18e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$).

*Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 8. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης (PI), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά του *Staphylococcus aureus* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ώρες επώασης	Μάρτυρας	Πληθυσμοί (log cfu/g) *										
		<u>% Συγκέντρωση PI (v/v)</u>			<u>Νισίνη (IU/ml)</u>		<u>Συγκεντρώσεις PI (%) και Νισίνης (IU/ml)</u>					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6+1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.02±0.24a	3.87±0.15a	3.90±0.21a	3.93±0.2a	4.05±0.29a	3.98±0.2a	3.73±0.31a	3.80±0.24a	3.89±0.11a	3.83±0.1a	3.99±0.23a	3.82±0.19a
4	4.69±0.26a	1.69±0.2b	0±0.0c	0±0.0c	2.85±0.25d	2.05±0.17b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.28a	2.06±0.18b	0±0.0c	0±0.0c	3.34±0.15d	2.35±0.23b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	6.99±0.3a	3.34±0.18b	0±0.0c	0±0.0c	4.54±0.19d	3.29±0.2b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.06±0.33a	4.3±0.19b	0±0.0c	0±0.0c	5.72±0.16d	4.56±0.18b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.54±0.2a	5.37±0.22b	0±0.0c	0±0.0c	6.74±0.2d	5.53±0.21b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.53±0.17a	5.76±0.27b	0±0.0c	0±0.0c	7.00±0.22d	5.98±0.28b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 9. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης (PI), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *E. coli* O157:H7 σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37°C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση PI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις PI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.21±0.1a	4.05±0.15a	4.02±0.12a	3.99±0.12a	4.18±0.16a	4.20±0.11a	4.06±0.16a	4.04±0.12a	4.05±0.14a	4.01±0.17a	3.96±0.09a	3.91±0.2a
4	5.31±0.11a	2.78±0.06b	0±0.0c	0±0.0c	5.22±0.15a	5.11±0.18a	2.20±0.05d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.92±0.12a	3.2±0.05b	0±0.0c	0±0.0c	6.85±0.2a	6.81±0.2a	2.16±0.05d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	8.22±0.15a	4.60±0.09b	0±0.0c	0±0.0c	8.14±0.13a	8.11±0.17a	1.98±0.05d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	9.23±0.1a	6.02±0.08b	0±0.0c	0±0.0c	9.18±0.19a	9.14±0.12a	2.65±0.03d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	9.59±0.14a	6.90±0.12b	0±0.0c	0±0.0c	9.5±0.17a	9.48±0.16a	3.77±0.01d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	9.51±0.16a	7.05±0.07b	0±0.0c	0±0.0c	9.47±0.14a	9.38±0.1a	4.92±0.03d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 10. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης (PI), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Salmonella* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση PI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις PI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6+1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.09±0.24a	4.12±0.15a	3.94±0.21a	3.85±0.2a	4.19±0.29a	4.09±0.2a	4.04±0.31a	4.02±0.24a	3.9±0.11a	3.91±0.1a	3.89±0.23a	3.86±0.19a
4	4.95±0.46a	1.95±0.2b	0±0.0c	0±0.0c	4.85±0.32a	4.7±0.47a	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.08±0.28a	2.08±0.18b	0±0.0c	0±0.0c	5.93±0.15a	5.76±0.23a	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.19±0.3a	2.49±0.28b	0±0.0c	0±0.0c	6.86±0.19a	6.72±0.2a	1.36±0.2d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.20±0.26a	3.81±0.29b	0±0.0c	0±0.0c	7.95±0.36a	7.85±0.28a	1.74±0.22d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.71±0.24a	5.2±0.28b	0±0.0c	0±0.0c	8.55±0.17a	8.40±0.31a	2.23±0.15d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.83±0.37a	6.83±0.21b	0±0.0c	0±0.0c	8.74±0.32a	8.58±0.25a	3.27±0.18d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

2.3.2. Αιθέριο έλαιο θυμαριού

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.3, 0.6 και 0.9%) στο θρεπτικό ζωμό TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* φαίνεται στους πίνακες 11-14 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη 0.3% αιθέριου ελαίου θυμαριού στο TSB, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν την 4^η ώρα της επώασης περίπου κατά 2, 1.9, 1.3 και 1.8 log cfu/ml και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν στο τέλος της επώασης στους 37 °C, τους 7.8, 6.21, 8.3 και 8 log cfu/ml, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.3%) ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση από την προσθήκη 0.3% ελαίου θυμαριού θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής καθώς οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης.

Με την προσθήκη 0.6% αιθέριου ελαίου θυμαριού στο ζωμό TSB οι αρχικοί πληθυσμοί της *Listeria monocytogenes*, του *Staphylococcus aureus* και της *Escherichia coli* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης στους 37 °C. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *Salmonella* μειώθηκαν περίπου κατά 2.6 log cfu/ml την 4^η ώρα και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 6.65 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη 0.6% αιθέριου ελαίου θυμαριού ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων,

της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου (0.3%) καθώς και από την προσθήκη της νισίνης (500 ή 1000 IU/ml) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Η προσθήκη 0.9% αιθέριου ελαίου θυμαριού μείωσε τους πληθυσμούς όλων των εξετασθέντων βακτηρίων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης στους 37 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου θυμαριού και 500 IU/ml νισίνης οι αρχικοί πληθυσμοί του *S. aureus* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης στους 37 °C. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella*, μετά από μια αρχική πτώση περίπου κατά 2.7, 1.9, 2 log cfu/ml την 4^η ώρα, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν τους 6.88, 5.77 και 6.57 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν από την προσθήκη του ίδιου συνδυασμού ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από αυτούς που μετρήθηκαν όταν προστέθηκε μεμονωμένα είτε το αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.3%) ή η νισίνη (500 IU/ml), έδειξε συνεργού αντιμικροβιακής δράσης σε όλη τη διάρκεια της επώασης.

Η προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου θυμαριού και 1000 IU/ml νισίνης μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης στους 37 °C. Η προσθήκη του ίδιου συνδυασμού μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς της *E. coli* και της *Salmonella* κατά 2.43 και 2.5 log cfu/ml την 4^η ώρα, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4.9 και 5.8 log cfu/ml αντίστοιχα στο τέλος της επώασης στους 37 °C. Οι

πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που προέκυψαν από την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού 0.3% και της νισίνης (1000 IU/ml) ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από αυτούς που καταγράφηκαν όταν προστέθηκε μεμονωμένα είτε το αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.3%) ή η νισίνη (1000 IU/ml), ένδειξη συνεργού αντιμικροβιακής δράσης σε όλη τη διάρκεια της επώασης.

Η προσθήκη των συνδυασμών του αιθέριου ελαίου θυμαριού στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.6 και 0.9%) με τη νισίνη (500 ή 1000 IU/ml), παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση μειώνοντας τους αρχικούς πληθυσμούς όλων των παθογόνων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης στους 37 °C.

Πίνακας 11. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού (**ΘΥ**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Listeria monocytogenes* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Μάρτυρας	Πληθυσμοί (log cfu/g) *										
		<u>% Συγκέντρωση ΘΥ (v/v)</u>			<u>Νισίνη (IU/ml)</u>		<u>Συγκεντρώσεις ΘΥ (%) και Νισίνης (IU/ml)</u>					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.19±0.14a	4.05±0.19a	3.98±0.16a	4.03±0.12a	4.09±0.17a	3.99±0.19a	3.98±0.20a	3.97±0.17a	3.97±0.14a	3.95±0.15a	3.99±0.13a	4.01±0.19a
4	4.88±0.26a	2.08±0.15b	0±0.0f	0±0.0f	2.88±0.15d	1.86±0.17b	1.22±0.09c	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f
8	5.97±0.18a	2.55±0.26b	0±0.0f	0±0.0f	3.90±0.25d	2.07±0.13e	1.26±0.06c	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f
12	7.03±0.23a	3.49±0.18b	0±0.0f	0±0.0f	5.70±0.19d	2.85±0.2e	2.34±0.11c	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f
16	7.85±0.19a	5.43±0.20b	0±0.0f	0±0.0f	6.68±0.16d	3.60±0.26c	3.75±0.11c	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f
24	8.91±0.32a	6.63±0.17b	0±0.0f	0±0.0f	7.76±0.21e	4.50±0.13d	5.26±0.11c	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f	0±0.0f
32	8.99±0.27a	7.80±0.16b	0±0.0d	0±0.0d	7.85±0.18b	5.42±0.18c	6.88±0.19e	0±0.0d	0±0.0d	0±0.0d	0±0.0d	0±0.0d

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

*Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g) σε τρεις ανεξάρτητους πειραματισμούς.

Πίνακας 12. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού (**ΘΥ**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά του *Staphylococcus aureus* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΘΥ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΘΥ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.16±0.24a	4.03±0.19a	3.94±0.16a	4.08±0.12a	4.07±0.29a	4.11±0.2a	4.11±0.16a	3.97±0.12a	3.90±0.14a	3.86±0.15a	3.91±0.13a	3.83±0.29a
4	4.69±0.26a	2.12±0.14b	0±0.0c	0±0.0c	2.85±0.2d	2.05±0.17b	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.28a	2.4±0.0b	0±0.0c	0±0.0c	3.34±0.15d	2.35±0.23b	1.39±0.0e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	6.99±0.27a	3.11±0.18b	0±0.0c	0±0.0c	4.54±0.19b	3.29±0.2b	1.51±0.0e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.06±0.33a	5.04±0.19b	0±0.0c	0±0.0c	5.72±0.16d	4.56±0.18e	2.18±0.32e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.54±0.2a	6.92±0.27b	0±0.0c	0±0.0c	6.74±0.16b	5.53±0.16d	3.23±0.4e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.53±0.17a	7.21±0.20b	0±0.0c	0±0.0c	7.00±0.22e	5.98±0.28d	3.95±0.22f	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 13. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού (ΘΥ), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *E. coli* O157:H7 σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37 °C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΘΥ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΘΥ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.21±0.31a	4.15±0.15a	4.05±0.20a	4.01±0.19a	4.18±0.16a	4.20±0.19a	4.17±0.16a	4.10±0.22a	4.18±0.24a	3.97±0.23a	4.17±0.19a	3.96±0.20a
4	5.31±0.29a	2.80±0.16b	0±0.0c	0±0.0c	5.22±0.22a	5.11±0.18a	2.25±0.20d	1.73±0.18e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.92±0.21a	3.61±0.25b	0±0.0c	0±0.0c	6.85±0.20a	6.81±0.19a	2.35±0.22d	1.70±0.21e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	8.22±0.15a	4.69±0.29b	0±0.0c	0±0.0c	8.14±0.23a	8.11±0.30a	2.73±0.15d	2.18±0.2e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	9.23±0.31a	5.98±0.28b	0±0.0c	0±0.0c	9.18±0.29a	9.14±0.25a	3.77±0.30d	2.75±0.24e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	9.59±0.34a	7.10±0.12b	0±0.0c	0±0.0c	9.5±0.25a	9.48±0.21a	4.76±0.21d	3.81±0.18e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	9.51±0.26a	8.30±0.27b	0±0.0c	0±0.0c	9.47±0.34a	9.38±0.25a	5.77±0.16d	4.90±0.22e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 14. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού (**ΘΥ**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Salmonella* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΘΥ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΘΥ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.24±0.22a	4.19±0.19a	4.16±0.33a	3.96±0.28a	4.16±0.34a	4.10±0.22a	4.05±0.18a	3.98±0.25a	4.05±0.24a	4.02±0.18a	3.90±0.29a	3.85±0.21a
4	4.95±0.33a	2.43±0.2b	1.51±0.24d	0±0.0c	4.85±0.26a	4.7±0.17a	2.05±0.18b	1.45±0.3d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.08±0.28a	3.17±0.26b	2.17±0.20de	0±0.0c	5.93±0.15a	5.76±0.23a	2.53±0.20d	1.71±0.30e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.19±0.4a	4.60±0.28b	3.37±0.19d	0±0.0c	6.86±0.33a	6.72±0.29a	3.46±0.25d	2.29±0.3e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.20±0.36a	5.9±0.20b	4.68±0.18d	0±0.0c	7.95±0.42a	7.85±0.22a	4.66±0.30d	3.49±0.23e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.71±0.31a	7.25±0.17b	5.94±0.21d	0±0.0c	8.55±0.27a	8.40±0.17a	5.70±0.18d	4.82±0.17e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.83±0.22a	8.02±0.17b	6.65±0.24d	0±0.0c	8.7±0.29a	8.58±0.23a	6.57±0.33d	5.83±0.18e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

2.3.3. Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.3, 0.6 και 0.9% v/v) στο θρεπτικό ζωμό TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* φαίνεται στους πίνακες 15 - 18 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη 0.3% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στο ζωμό TSB, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 1 και 0.2 log cfu/ml την 4^η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια, φτάνοντας στο τέλος της επώασης στους 37 °C τους 7.3 και 7.17 log cfu/ml, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* που μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.3%) ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Οι αρχικοί πληθυσμοί των Gram-αρνητικών βακτηρίων που μελετήθηκαν (*E. coli* O157:H7 και της *Salmonella*) αναπτύχθηκαν φτάνοντας περίπου 8.8 και 8.3 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Η αντιμικροβιακή δράση του ελαίου δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 0.3% θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής καθόσον οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης.

Με την προσθήκη 0.6% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στο ζωμό TSB, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν περίπου κατά 1.5, 1, 0.2 και 0.5 log cfu/ml την 4^η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν περίπου τους 7, 6.5, 8 και 7.9 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των παθογόνων βακτηρίων που εξετάστηκαν στο θρεπτικό ζωμό, παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους μάρτυρες σε όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C.

Με την προσθήκη 0.9% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στο ζωμό TSB, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) την 4^η ώρα, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν τους 5.1 και 4.5 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν κατά περίπου 2.5 και 2.7 log cfu/ml την 4^η ώρα της επώασης και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν, φτάνοντας 6 και 6.94 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων βακτηρίων που μετρήθηκαν στο ζωμό TSB με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.9%) παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς, οι οποίοι καταγράφηκαν τόσο στους μάρτυρες όσο και στις μικρότερες συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου (0.3 και 0.6%) σε όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 500 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν την 4^η ώρα της επώασης περίπου κατά 1.5 και 1 log cfu/ml και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 6.53 και 6.65 log cfu/ml στο τέλος της επώασης. Αντίθετα, η προσθήκη του ίδιου συνδυασμού παρουσίασε ασθενή αντιμικροβιακή δράση κατά της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella*, αφού οι πληθυσμοί τους έφτασαν τους 7.86 και 8.12 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των βακτηρίων που μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και της νισίνης ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους που μετρήθηκαν, από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.3%) ή της νισίνης (500 IU/ml) φανερώνοντας συνεργό αντιμικροβιακή δράση.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.3% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 1000 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν την 4^η ώρα της επώασης κατά 2 και 1.98 log cfu/ml και στη συνέχεια οι πληθυσμοί αναπτύχθηκαν, φτάνοντας περίπου τους 5.9 και 5.8 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Ο ίδιος συνδυασμός εμφάνισε ασθενή αντιμικροβιακή δράση κατά της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella*, αφού οι πληθυσμοί τους αναπτύχθηκαν, φτάνοντας τους 7.79 και 8.07 log cfu/ml στο τέλος του χρόνου επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των βακτηρίων που μετρήθηκαν στο ζωμό TSB με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.3%) και της νισίνης (1000 IU/ml) ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους που καταγράφηκαν από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου (0.3%) ή της νισίνης (1000 IU/ml), ένδειξη συνεργού αντιμικροβιακής δράσης.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.6% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 500 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) την 4^η ώρα και στη συνέχεια οι πληθυσμοί αναπτύχθηκαν, φτάνοντας περίπου τους 5.18 και 4.16 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν σε 3.8 και 3.17 log cfu/ml την 4^η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν περίπου τους 7.7 και 7.5 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *Salmonella* και της *E. coli* O157:H7 που μετρήθηκαν στο ζωμό με το συνδυασμό του αιθέριου ελαίου (0.6%) και της νισίνης (500 IU/ml) ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς που

προέκυψαν από την προσθήκη μεμονωμένα είτε του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/ml), φανερώνοντας συνεργό αντιμικροβιακή δράση.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.6% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 1000 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) την 4^η ώρα και στη συνέχεια οι πληθυσμοί του *S. aureus* παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, ενώ οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μετά από μια μείωση κατά 0.6 και 1 log cfu/ml την 4^η ώρα, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν τους 6.92 και 7.38 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζωμό με τη προσθήκη του συνδυασμού 0.6% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 1000 IU/ml νισίνης ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς που καταγράφηκαν από την προσθήκη μεμονωμένα είτε του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) ή της νισίνης (1000 IU/ml), ένδειξη συνεργού αντιμικροβιακής δράσης.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.9% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 500 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και μέχρι το τέλος της επώασης. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν περίπου κατά 2 και 1.6 log cfu/ml την 4^η ώρα, ενώ στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 5.6 και 6.15 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζωμό με την προσθήκη του συνδυασμού

0.9% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 500 IU/ml νισίνης ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς, οι οποίοι καταγράφηκαν από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.9%) ή της νισίνης (500 IU/ml) φανερώνοντας συνεργό αντιμικροβιακή δράση.

Με την προσθήκη του συνδυασμού 0.9% αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και 1000 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *E. coli* O157:H7 μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *Salmonella* μετά από πτώση κατά 1.8 log cfu/ml την 4^η ώρα αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν περίπου τους 5.9 log cfu/ml στο τέλος της επώασης. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων βακτηρίων, οι οποίοι μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζυμό με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.9%) και της νισίνης στις 1000 IU/ml ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς που καταγράφηκαν από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.9%) ή της νισίνης (1000 IU/ml), ένδειξη συνεργού αντιμικροβιακής δράσης.

Πίνακας 15. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (ΔE), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Listeria monocytogenes* σε ζωμό TSB σε επώαση στους $37^{\circ}C$ για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΔE (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΔE (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.15±0.24a	4.12±0.19a	4.03±0.16a	4.00±0.12a	3.98±0.17a	3.91±0.25a	4.09±0.23a	4.06±0.13a	3.99±0.14a	3.98±0.15a	3.90±0.23a	3.96±0.19a
4	4.88±0.26a	3.09±0.15b	2.47±0.13d	0±0.0c	2.88±0.17b	1.86±0.17e	2.44±0.1d	2.08±0.14e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.18a	4.13±0.26b	3.09±0.17d	0±0.0c	3.90±0.25b	2.07±0.13e	3.15±0.11d	2.58±0.12f	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.03±0.23a	5.04±0.18b	4.24±0.3d	1.89±0.2e	5.70±0.09g	2.85±0.2h	4.19±0.0d	3.55±0.15f	2.19±0.2e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	7.85±0.22a	6.06±0.19b	5.36±0.11d	2.91±0.13e	6.68±0.16i	3.60±0.26g	5.25±0.12d	4.54±0.09f	3.12±0.3g	2.14±0.34h	0±0.0c	0±0.0c
24	8.91±0.32a	6.84±0.17b	6.31±0.15d	4.05±0.2e	7.76±0.42d	4.50±0.13i	6.23±0.3d	5.37±0.33f	4.06±0.3e	3.26±0.29g	0±0.0c	0±0.0c
32	8.99±0.37a	7.32±0.15b	6.99±0.2b	5.13±0.18d	7.85±0.28i	5.42±0.18d	6.53±0.2e	5.90±0.11f	5.18±0.21g	4.01±0.26h	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

*Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 16. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (ΔΕ), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά του *Staphylococcus aureus* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΔΕ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΔΕ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.16±0.24a	4.15±0.2a	4.04±0.13a	3.98±0.17a	4.12±0.25a	4.01±0.2a	4.1±0.12a	3.95±0.22a	3.99±0.24a	3.89±0.25a	3.85±0.3a	3.80±0.26a
4	4.69±0.26a	3.95±0.14b	2.92±0.21d	0±0.0c	2.85±0.2d	2.05±0.19e	3.10±0.25d	1.98±0.22e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.28a	4.73±0.3b	3.39±0.15d	0±0.0c	3.34±0.25d	2.35±0.23e	3.56±0.2d	2.51±0.31e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	6.99±0.27a	6.11±0.21b	4.48±0.24d	1.71±0.19e	4.54±0.19d	3.29±0.2f	4.77±0.3d	3.52±0.22f	1.78±0.11e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.06±0.33a	7.12±0.3b	5.78±0.26d	2.47±0.29e	5.72±0.16d	4.56±0.18f	5.82±0.2d	4.70±0.19f	2.18±0.14e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.54±0.2a	7.2±0.17b	6.59±0.2d	3.71±0.3e	6.74±0.16d	5.53±0.16f	6.61±0.4d	5.66±0.25f	3.41±0.21e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.53±0.17a	7.17±0.20b	6.50±0.18d	4.51±0.2e	7.00±0.22b	5.98±0.28f	6.65±0.22d	5.80±0.2f	4.65±0.17e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 17. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (**ΔΕ**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *E. coli* O157:H7 σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ώρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΔΕ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΔΕ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.21±0.1a	4.09±0.15a	4.15±0.12a	4.19±0.12a	4.18±0.16a	4.20±0.11a	4.22±0.16a	4.00±0.12a	4.17±0.14a	3.99±0.17a	3.92±0.09a	4.15±0.2a
4	5.31±0.11a	4.86±0.15b	4.09±0.09d	2.53±0.09f	5.22±0.15a	5.11±0.04a	4.6±0.21bh	4.24±0.16h	3.8±0.11g	3.68±0.08g	2.06±0.14e	0±0.0c
8	6.92±0.12a	5.94±0.05b	4.82±0.1d	2.76±0.16e	6.85±0.2a	6.81±0.2a	4.77±0.13d	5.01±0.07f	3.9±0.12f	3.80±0.09f	2.26±0.2g	0±0.0c
12	8.22±0.15a	6.94±0.09b	5.76±0.22d	3.70±0.19e	8.14±0.13a	8.11±0.17a	5.75±0.15d	5.92±0.11f	4.74±0.09f	4.7±0.09f	2.71±0.28g	0±0.0c
16	9.23±0.1a	7.1±0.12b	6.87±0.1g	4.01±0.11d	9.18±0.19a	9.14±0.12a	6.98±0.13bg	6.85±0.19bg	5.92±0.22f	5.78±0.13f	3.64±0.16e	0±0.0c
24	9.59±0.14a	8.12±0.12b	7.88±0.2be	4.94±0.12g	9.5±0.17a	9.48±0.16a	7.97±0.1eb	7.86±0.14eb	6.96±0.24f	6.98±0.11f	4.60±0.18h	0±0.0c
32	9.51±0.16a	8.85±0.17b	8.2±0.19h	5.98±0.2d	9.47±0.14a	9.38±0.1a	7.86±0.13he	7.79±0.07e	7.69±0.08e	6.92±0.21f	5.61±0.12g	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 18. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (**ΔΕ**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Salmonella* σε ζυμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση ΔΕ (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις ΔΕ (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.09±0.14a	4.11±0.20a	4.11±0.27a	4.01±0.19a	4.19±0.18a	4.09±0.23a	3.94±0.13a	3.90±0.26a	4.02±0.14a	3.90±0.17a	3.89±0.30a	3.83±0.21a
4	4.95±0.36a	4.17±0.18b	3.53±0.19d	2.85±0.26ef	4.85±0.30a	4.7±0.25a	3.96±0.17bd	3.9±0.24bd	3.16±0.25ed	3.02±0.19e	2.44±0.16fg	2.04±0.20g
8	6.08±0.22a	4.89±0.23b	4.25±0.16d	3.19±0.20e	5.93±0.16a	5.76±0.21a	4.53±0.21d	4.44±0.30bd	3.71±0.0f	3.41±0.0ef	2.61±0.20g	2.17±0.3g
12	7.19±0.26a	6.05±0.17b	5.17±0.22c	3.97±0.17d	6.86±0.17a	6.72±0.15a	5.78±0.24be	5.53±0.20ec	4.58±0.21f	4.32±0.17fd	3.41±0.26g	3.04±0.21g
16	8.20±0.19a	7.19±0.23b	6.36±0.20c	4.98±0.30d	7.95±0.26a	7.85±0.18a	6.83±0.18be	6.68±0.20ce	5.56±0.24f	5.35±0.19f	4.42±0.3g	3.91±0.26g
24	8.71±0.29a	8.12±0.14b	7.53±0.22c	6.07±0.21d	8.55±0.27ab	8.40±0.27ab	7.77±0.30bc	7.62±0.20c	6.66±0.23e	6.59±0.20e	5.51±0.29g	5.00±0.17g
32	8.83±0.32a	8.30±0.26b	7.93±0.21b	6.94±0.22c	8.7±0.26ab	8.6±0.23ab	8.12±0.17b	8.07±0.15b	7.55±0.19be	7.38±0.23ec	6.15±0.25g	5.91±0.22g

* Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

2.3.4. Μίγμα των αιθέριων ελαίων

Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του μίγματος των τριών αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.3% (0.1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 0.1% αιθέριο έλαιο θυμαριού και 0.1% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου), 0.6% (0.2% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 0.2% αιθέριο έλαιο θυμαριού και 0.2% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου) και 0.9% (0.3% αιθέριο έλαιο ρίγανης, 0.3% αιθέριο έλαιο θυμαριού και 0.3% αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου) στο θρεπτικό ζωμό TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* φαίνεται στους πίνακες 19 – 22, αντίστοιχα.

Με την προσθήκη 0.3% μίγματος των αιθέριων ελαίων, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, του *Staphylococcus aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μετά από πτώση κατά 1.8, 1.95, 1 και 1.4 log cfu/ml την 4^η ώρα, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν τους 6.88, 6.1, 7.5 και 7.4 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζωμό με το μίγμα των αιθέριων ελαίων (0.3%) παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.3%) θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης.

Με την προσθήκη 0.6% μίγματος των αιθέριων ελαίων, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) την 4^η ώρα, οι οποίοι στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 5.84 log cfu/ml στο τέλος της επώασης. Οι αρχικοί πληθυσμοί του *S. aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* μειώθηκαν κατά

περίπου 2.7, 2.1 και 2.5 log cfu/ml την 4^η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια φτάνοντας τους 2.8, 6.09 και 4.52 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων βακτηρίων που μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζωμό με το μίγμα 0.6% των αιθέριων ελαίων παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους μάρτυρες σε όλη τη διάρκεια της επώασης.

Η προσθήκη του μίγματος 0.9% των αιθέριων ελαίων μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς όλων των εξετασθέντων βακτηρίων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και καθόλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος 0.3% των αιθέριων ελαίων και 500 IU/ml νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes*, της *E. coli* και της *Salmonella* μειώθηκαν κατά 2.3, 1.8 και 2 log cfu/ml την 4^η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια, φτάνοντας τους 5.66, 5.75 και 6.17 log cfu/ml στο τέλος της επώασης στους 37 °C, αντίστοιχα. Οι αρχικοί πληθυσμοί του *S. aureus* μετά από μια πτώση κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) την 4^η ώρα, αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν τους 5.15 log cfu/ml στο τέλος της επώασης. Οι πληθυσμοί όλων των παθογόνων που μετρήθηκαν στο TSB με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος 0.3% των αιθέριων ελαίων και 500 IU/ml νισίνης ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς που καταγράφηκαν από την προσθήκη μεμονωμένα είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.3%) ή της νισίνης (500 IU/ml), φανερώνοντας συνεργό αντιμικροβιακή δράση.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος 0.3% των αιθέριων ελαίων και 1000 IU/ml νισίνης μειώθηκαν οι πληθυσμοί του *S. aureus* κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και

σε όλη τη διάρκεια της επώασης στους 37 °C. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *L. monocytogenes* μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης την 4^η ώρα, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και έφτασαν περίπου τους 5.1 log cfu/ml στο τέλος της επώασης. Οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* και της *Salmonella* μειώθηκαν κατά 2.2 και 2.4 log cfu/ml την 4η ώρα και αναπτύχθηκαν στη συνέχεια, φτάνοντας τους 5.22 και 4.4 log cfu/ml στο τέλος της επώασης, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων παθογόνων που μετρήθηκαν στο θρεπτικό ζωμό με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.3%) με τη νισίνη (1000 IU/ml) ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους πληθυσμούς που καταγράφηκαν από την προσθήκη μεμονωμένα είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.3%) ή της νισίνης (1000 IU/ml), φανερώνοντας συνεργό αντιμικροβιακή δράση.

Η προσθήκη των συνδυασμών του μίγματος των αιθέριων ελαίων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.6 και 0.9%) με τις συγκεντρώσεις της νισίνης (500 ή 1000 IU/ml) μείωσε τους αρχικούς πληθυσμούς όλων των εξετασθέντων παθογόνων κάτω από το όριο ανίχνευσης (μη καταγραφή αποικιών στο εκλεκτικό υπόστρωμα) από την 4^η ώρα και σε όλη τη διάρκεια της επώασης.

Πίνακας 19. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου (**MI**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *Listeria monocytogenes* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση MI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις MI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.05±0.24a	4.07±0.09a	4.13±0.16a	3.96±0.12a	3.98±0.17a	3.91±0.25a	4.09±0.03a	4.13±0.13a	4.00±0.14a	4.03±0.15a	3.89±0.23a	3.83±0.19a
4	4.88±0.26a	2.2±0.2b	0±0.0c	0±0.0c	2.88±0.17e	1.86±0.17d	1.77±0.1d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.18a	3.51±0.26b	2.03±0.17d	0±0.0c	3.90±0.25b	2.07±0.13d	2.07±0.11d	1.58±0.1e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.03±0.23a	4.60±0.18b	3.21±0.3d	0±0.0c	5.70±0.09f	2.85±0.2d	3.12±0.0d	2.52±0.15e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	7.85±0.10a	5.38±0.19b	4.32±0.1d	0±0.0c	6.68±0.16f	3.60±0.26e	4.13±0.2d	3.64±0.12e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.91±0.02a	6.37±0.27b	5.24±0.2d	0±0.0c	7.76±0.02e	4.52±0.13f	5.14±0.2d	4.50±0.12f	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.99±0.07a	6.88±0.10b	5.84±0.1d	0±0.0c	7.85±0.28f	5.42±0.18ed	5.66±0.16d	5.12±0.2e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

*Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 20. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου (**MI**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά του *Staphylococcus aureus* σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση MI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις MI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.16±0.22a	4.07±0.21a	4.13±0.18a	3.98±0.27a	4.10±0.31a	4.02±0.29a	4.03±0.2a	3.99±0.11a	4.00±0.19a	3.95±0.09a	3.88±0.18a	3.84±0.20a
4	4.69±0.26a	2.05±0.24e	1.42±0.19d	0±0.0c	2.85±0.2b	2.05±0.19e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	5.97±0.28a	2.43±0.3b	1.38±0.22d	0±0.0c	3.34±0.2e	2.35±0.23b	1.39±0.12d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	6.99±0.27a	3.21±0.18b	1.52±0.3d	0±0.0c	4.54±0.19e	3.29±0.2b	1.91±0.12d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.06±0.33a	4.44±0.19b	1.66±0.4d	0±0.0c	5.72±0.16f	4.56±0.18b	2.85±0.32e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.54±0.2a	5.62±0.27b	2.26±0.31d	0±0.0c	6.74±0.16f	5.53±0.16b	4.03±0.4e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.53±0.17a	6.1±0.20b	2.8±0.19d	0±0.0c	7.00±0.22f	5.98±0.28b	5.15±0.22e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 21. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου (**MI**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά της *E. coli* O157:H7 σε ζωμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ώρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση MI (v/v)			Νισίνη (IU/ml)		Συγκεντρώσεις MI (%) και Νισίνης (IU/ml)					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9+1000
0	4.21±0.1a	4.21±0.15a	4.17±0.12a	4.17±0.12a	4.18±0.16a	4.20±0.11a	4.16±0.16a	4.15±0.12a	4.02±0.14a	3.97±0.17a	3.98±0.09a	3.9±0.2a
4	5.31±0.11a	3.29±0.08b	2.05±0.09d	0±0.0c	5.22±0.15a	5.11±0.18a	2.33±0.11e	1.97±0.05d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.92±0.12a	3.82±0.09b	2.33±0.08d	0±0.0c	6.85±0.2a	6.81±0.2a	2.55±0.13d	2.00±0.1e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	8.22±0.15a	4.94±0.11b	3.42±0.06d	0±0.0c	8.14±0.13a	8.11±0.17a	3.12±0.08e	2.97±0.1e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	9.23±0.1a	5.99±0.08b	4.56±0.11d	0±0.0c	9.18±0.19a	9.14±0.12a	4.12±0.13e	3.95±0.2e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	9.59±0.14a	6.84±0.13b	5.60±0.14d	0±0.0c	9.5±0.17a	9.48±0.16a	5.02±0.1e	4.86±0.11e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	9.51±0.16a	7.52±0.18b	6.09±0.2d	0±0.0c	9.47±0.14a	9.38±0.1a	5.75±0.14d	5.22±0.17e	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

Πίνακας 22. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου (**MI**), νισίνης και του συνδυασμού τους κατά του *Salmonella* σε ζυμό TSB σε επώαση στους 37° C για 32 ώρες.

Ωρες επώασης	Πληθυσμοί (log cfu/g) *											
	Μάρτυρας	% Συγκέντρωση MI (v/v)			<u>Νισίνη</u> (IU/ml)		<u>Συγκεντρώσεις MI (%) και Νισίνης (IU/ml)</u>					
		0.3	0.6	0.9	500	1000	0.3 + 500	0.3 +1000	0.6+500	0.6 +1000	0.9 +500	0.9 +1000
0	4.09±0.25a	4.16±0.18a	4.03±0.28a	3.93±0.17a	4.19±0.21a	4.09±0.23a	4.08±0.22a	4.07±0.21a	4.02±0.15a	3.98±0.23a	3.91±0.19a	3.94±0.22a
4	4.95±0.36a	2.61±0.20b	1.53±0.22d	0±0.0c	4.85±0.12a	4.7±0.27a	2.01±0.19e	1.70±0.22de	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
8	6.08±0.29a	2.8±0.23b	1.61±0.18d	0±0.0c	5.93±0.35a	5.76±0.20a	2.13±0.19e	1.83±0.16de	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
12	7.19±0.3a	4.09±0.18b	1.95±0.3d	0±0.0c	6.86±0.19a	6.72±0.2a	2.84±0.25e	2.23±0.18d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
16	8.20±0.29a	5.50±0.22b	2.44±0.3d	0±0.0c	7.95±0.36a	7.85±0.28a	4.09±0.26e	2.64±0.17d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
24	8.71±0.24a	6.73±0.17b	3.44±0.21d	0±0.0c	8.55±0.17a	8.40±0.31a	5.23±0.3e	3.43±0.18d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c
32	8.83±0.37a	7.38±0.20b	4.52±0.19d	0±0.0c	8.68±0.32a	8.58±0.3a	6.17±0.22e	4.4±0.2d	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c	0±0.0c

Οι πληθυσμοί στην ίδια γραμμή με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν τους μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των πληθυσμών του μικροοργανισμού που καταγράφηκαν (log cfu/g).

2.4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης προστιθέμενο στο θρεπτικό ζωμό σε συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9 % εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, του *S.aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella*, αφού δεν καταγράφηκαν πληθυσμοί των παθογόνων στα εκλεκτικά υποστρώματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Αντίθετα η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.3% θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής, καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων παρά την αρχική μείωση, αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, οι Özcan και συν. (2003) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση $\geq 0.4\%$ παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S.aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *S. enteritidis* και *S. typhimurium*. Ανάλογα, οι Sagdic και συν. (2002) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 1.5 και 2% σε θρεπτικό ζωμό εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *E. coli* O157:H7, η οποία βρίσκονταν σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου, κατά τη διάρκεια επώασης στους 37 °C. Οι Cosentino και συν. (1999) και οι Pol και Smid (1999) παρατήρησαν ότι η καρβακρόλη που είναι μια από τις σημαντικότερες φαινόλες του αιθέριου ελαίου ρίγανης, παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *L. monocytogenes*.

Το αιθέριο έλαιο θυμαριού προστιθέμενο σε συγκέντρωση 0.9% παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων, αφού δεν καταγράφηκαν πληθυσμοί των παθογόνων στα εκλεκτικά υποστρώματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Επίσης το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 0.6% είχε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των *L. monocytogenes*, *S.aureus* και *E. coli*

O157:H7, αφού δεν καταγράφηκαν πληθυσμοί των παθογόνων στα εκλεκτικά υποστρώματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Σε αντίθεση με τα άλλα παθογόνα, η προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) παρουσίασε ασθενέστερη αντιμικροβιακή δράση κατά της *Salmonella*, σε σχέση με τα άλλα εξετασθέντα παθογόνα, αφού καταγράφηκαν πληθυσμοί του παθογόνου καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου θυμαριού σε συγκέντρωση 0.3% θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής, καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, οι Özcan και συν. (2003) βρήκαν ότι το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις \geq 0.4% παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του *S.aureus*, της *E. coli* O157:H7 και της *S. enteritidis* και *S. typhimurium*. Οι Singh και συν. (2003) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 0.1% δεν είχε αντιμικροβιακή δράση κατά μίγματος τριών στελεχών της *L. monocytogenes* σε πεπτονόχο ύδωρ στους 37 °C, ενώ στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, και 1% του αιθέριου ελαίου παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου.

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* στο θρεπτικό ζωμό έδειξε ότι είχε εξάρτηση από την προστιθέμενη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου, παρουσιάζοντας αύξηση από τη μικρότερη (0.3%) προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.9%). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.3%) παρουσίασε ασθενή αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων, καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν, ότι το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά διάφορων

παθογόνων σε in vitro πειράματα. Οι Hammer και συν. (1999) βρήκαν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου ήταν $\geq 1\%$ σε θρεπτικό ζωμό για την αναστολή της ανάπτυξης του *S. aureus*, της *E. coli* και της *S. typhimurium* κατά τη διάρκεια επώασης στους 37 °C για 24 ώρες. Ομοίως, οι Rota και συν. (2004) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου για την αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *E. coli* O157:H7, της *S. enteritidis* και της *S. typhimurium*, ξεπέρασε το 1% έναντι όλων των παθογόνων σε ζωμό TSB.

Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού και δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 0.9 % στο θρεπτικό ζωμό, εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*, αφού δεν καταγράφηκαν πληθυσμοί των παθογόνων στα εκλεκτικά υποστρώματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του μίγματος των αιθέριων ελαίων ήταν ισχυρότερη στη συγκέντρωση του 0.6% σε σχέση με εκείνη του 0.3%. Όπως και στα προηγουμένως εξετασθέντα αιθέρια έλαια, η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.3%, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ασθενής, καθώς οι πληθυσμοί των παθογόνων παρά την αρχική μείωση αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης. Οι Delaquis και συν. (2002) βρήκαν ότι ο συνδυασμός αιθέριων ελαίων κολλιάνδρου, άνηθου και ευκαλύπτου παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά διάφορων παθογόνων σε θρεπτικό ζωμό. Πιθανώς η αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων να σχετίζεται με τη συνολική συγκέντρωση των δραστικών φαινολικών συστατικών στο μίγμα τους σε σχέση με τα επιμέρους αιθέρια έλαια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος αυτών με τη νισίνη (500 και 1000 IU/ml) στο ζωμό παρουσίασε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*, όταν τα αιθέρια έλαια είχαν προστεθεί σε συγκέντρωση 0.3%. Για την προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων ρίγανης και θυμαριού στις συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9%, καθώς και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.9% με τη νισίνη (500 και 1000 IU/ml) δεν μπορεί να εξαχθεί ανάλογο συμπέρασμα, αφού και η μεμονωμένη προσθήκη των αιθέριων ελαίων στις συγκεντρώσεις αυτές, εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, με τη μη καταγραφή πληθυσμών των παθογόνων στα εκλεκτικά υποστρώματα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Εξάιρεση αποτέλεσε η καταγραφή συνεργού αντιμικροβιακής δράσης της προσθήκης του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη κατά της *Salmonella*, αφού η μεμονωμένη προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) κατέγραψε πληθυσμούς του παθογόνου καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Όμως για την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στις συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9% και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.6% με τη νισίνη στις 500 και 1000 IU/ml μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων βακτηρίων, αφού η μεμονωμένη προσθήκη του δενδρολίβανου δεν είχε τόσο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, όπως η ρίγανη και το θυμάρι. Η συνεργός δράση της νισίνης με τα κύρια φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού την καρβακρόλη και τη θυμόλη αναφέρεται και από άλλους ερευνητές σε *in vitro* μελέτες (Pol και Smid 1999, Ettayebi και συν. 2002). Επίσης, οι Thomas και Isak (2006) αναφέρουν ότι εκχυλίσματα δενδρολίβανου με νισίνη παρουσίασαν συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes* σε *in vitro* πειράματα.

Συμπερασματικά, η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% στο θρεπτικό ζωμό, παρουσίασε αντιμικροβιακή κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*, που ήταν αυξανόμενη από τη μικρότερη (0.3%) προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.9%). Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του συνδυασμού τους σε συγκέντρωση 0.3% σε TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ασθενής, καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων, παρά την αρχική μείωση, αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της επώασης. Η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων στη χαμηλότερη συγκέντρωση (0.3%) με τη νισίνη (500 ή 1000 IU/ml), έδειξε κατά κύριο λόγο ότι παρουσίαζε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων βακτηρίων. Επειδή η μεμονωμένη προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9% παρουσίασε γενικά πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων παθογόνων, δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν ανάλογα συμπεράσματα για συνεργό αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων στις συγκεντρώσεις αυτές με τη νισίνη.

Κεφάλαιο 3^ο

Η επίδραση των **αιθέριων ελαίων στα** **οργανοληπτικά** **χαρακτηριστικά**

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων οφείλεται στα συστατικά των αιθέριων ελαίων και ιδιαίτερα στις φαινόλες που παρουσιάζουν χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Είναι γνωστό ότι εκτός της επίδρασης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα αιθέρια έλαια μπορούν να επιμηκύνουν το χρόνο συντήρησης των τροφίμων εξαιτίας των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων βοτάνων στα τρόφιμα και το κρέας, μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Συνήθως η προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Όμως η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων αιθέριων ελαίων, παρότι δε γεννά αμφιβολίες για την ασφάλεια των καταναλωτών, είναι δυνατόν να επηρεάσει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των τροφίμων.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης στο κεφάλαιο αυτό ήταν η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του μutton βουβίου κρέατος κατά τη διάρκεια της συντήρησής του στην ψύξη για 12 ημέρες με την προσθήκη αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και μίγματός τους σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9%.

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης, του θυμαριού και του δενδρολίβανου που χρησιμοποιήθηκαν για τον οργανοληπτικό έλεγχο του μυττωτού βόειου κρέατος παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 στην παράγραφο 2.2.2.

3.2.2 Ομάδες δειγμάτων μυττωτού κρέατος

Τα δείγματα «στείρου» βόειου κρέατος παρασκευάζονταν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4 στην παράγραφο 4.2.3.

Για τον οργανοληπτικό έλεγχο των δειγμάτων με την προσθήκη των αιθέρων ελαίων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ομάδες:

- O3, O6, O9 για τα δείγματα στα οποία προστέθηκε το αιθέριο έλαιο της ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 ή 0.9% (v/wt) αντίστοιχα.
- T3, T6, T9 για τα δείγματα στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 ή 0.9% (v/wt) αντίστοιχα
- R3, R6, R9 για τα δείγματα στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 ή 0.9% (v/wt) αντίστοιχα
- M3, M6, M9 για τα δείγματα στα οποία προστέθηκε μίγμα των αιθέρων ελαίων σε συνολική συγκέντρωση 0.3% (αποτελούμενο από 0.1% ρίγανη, 0.1% θυμάρι και 0.1% δενδρολίβανο), 0.6% (αποτελούμενο από 0.2% ρίγανη,

0.2% θυμάρι και 0.2% δενδρολίβανο) ή 0.9% (αποτελούμενο από 0.3% ρίγανη, 0.3% θυμάρι και 0.3% δενδρολίβανο), αντίστοιχα.

- Δείγματα στα οποία δεν προστέθηκαν αιθέρια έλαια χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (CONTROL).

Τα δείγματα τοποθετούνταν σε σακούλες stomacher που το στόμιό τους κλείνονταν με αναδίπλωση και συντηρούνταν στους 4°C για 12 ημέρες.

3.2.3 Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων μutton βoείου κρέατος γινόταν την 0, 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ημέρα της συντήρησής τους. Μια ομάδα (πάνελ) από 8 άτομα, που επιλέχθηκαν από άτομα του Εργαστηρίου και του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων μutton κρέατος. Το πάνελ των δοκιμαστών εκπαιδεύτηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της American Meat Science Association (AMSA 1995).

Σε κάθε δοκιμή, το κάθε δείγμα του μutton βoείου κρέατος τυλιγόταν σε αλουμίνιο και θερμαινόταν σε ατμό (ατμομάγειρας Braun MultiGourmet FS20) για τριάντα λεπτά. Τα δείγματα σερβίρονταν στον κάθε δοκιμαστή, που πραγματοποιούσε την αξιολόγηση ξεχωριστά από τους υπολοίπους, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε λευκά πιάτα με ένα τριψήφιο τυχαίο αριθμό. Η οσμή, η γεύση και η συνολική αποδοχή ήταν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν. Το κάθε ένα από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκε με μία κλίμακα από 1 έως 9. Στον πίνακα 23 φαίνονται οι χαρακτηρισμοί που αντιστοιχούσαν στον κάθε βαθμό της χρησιμοποιηθείσας κλίμακας.

Πίνακας 23. Αντιστοιχία χαρακτηρισμού και βαθμολογίας για κάθε δείγμα

Βαθμολογία	Χαρακτηρισμός
9	Εξαιρετικά ευχάριστο
8	Πολύ ευχάριστο
7	Αρκετά ευχάριστο
6	Ευχάριστο
5	Οριακά αποδεκτό
4	Δυσάρεστο
3	Αρκετά δυσάρεστο
2	Πολύ δυσάρεστο
1	Εξαιρετικά δυσάρεστο

Ως όριο αποδοχής του δείγματος τέθηκε ο βαθμός 5 (οριακά αποδεκτό). Όταν ο μέσος όρος της βαθμολογίας κάποιου δείγματος ήταν χαμηλότερος από το 5 το δείγμα θεωρούνταν ως απορριπτέο.

3.2.4. Στατιστική επεξεργασία

Το κάθε πείραμα του οργανοληπτικού ελέγχου διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις). Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκαν ANOVA και το t-test. Για τον εντοπισμό διαφορών στις μέσες τιμές επιλέχθηκε ένα επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μάρτυρες

Η βαθμολογία της οσμής των δειγμάτων της ομάδας των μαρτύρων (CONT) του μυττωτού βοείου κρέατος κυμάνθηκε από 7.7 έως 8.1, 7 έως 6.6 και 5.3 για τις ημέρες 0-4, 6-8 και 10 της συντήρησης στους 4 °C, αντίστοιχα. Η βαθμολογία της γεύσης των δειγμάτων της ομάδας των μαρτύρων κυμάνθηκε από 7.5 έως 7.55 για τις ημέρες 0-6 και στη συνέχεια έπεσε σημαντικά ($P<0.05$) φτάνοντας 6.7 και 5.5 για την 8^η και 10^η ημέρα της συντήρησης, αντίστοιχα. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής των μαρτύρων αξιολογήθηκε από 8 έως 7.8 για τις ημέρες 0-4 και στη συνέχεια έπεσε σημαντικά ($P<0.05$) φτάνοντας περίπου 7, 7 και 5.9 τις ημέρες 6, 8 και 10 της συντήρησης στους 4 °C, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βαθμολογία της οσμής, της γεύσης και της συνολικής αποδοχής των μαρτύρων έπεσε κάτω από το όριο της απόρριψης (5) στο τέλος της συντήρησης (12^η ημέρα).

Προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης

Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μυττωτού βόειου κρέατος, φαίνεται στο σχήμα 5.

Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.3%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$), μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη. Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του

αιθέριου ελαίου (0.6%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης (0.9%) παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C.

Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη δόση 0.3%, σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα της συντήρησής τους και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% παρέμεινε σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα της συντήρησης και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησής τους. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9%, παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η βαθμολογία της οσμής, της γεύσης και της συνολικής αποδοχής του μυττωτού βόειου κρέατος στο οποίο

προστέθηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης και στις τρεις συγκεντρώσεις (0.3, 0.6, 0.9%) παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης.

Προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού

Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου θυμαριού στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μυττωτού βόειου κρέατος, φαίνεται στο σχήμα 6.

Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του αιθέριου θυμαριού στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης στην ψύξη. Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και από την 6^η έως τη 12^η ημέρα δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$), ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C.

Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.3%), σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων, δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την

προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.9%) παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού στη δόση 0.9% παρέμεινε κάτω από το όριο απόρριψης (5) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η βαθμολογία της οσμής, της γεύσης και της συνολικής αποδοχής του μυττωτού βόειου κρέατος με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού στις δόσεις 0.3 και 0.6% παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης. Αντίθετα, μόνο η οσμή των δειγμάτων στα οποία προστέθηκε το αιθέριο έλαιο στη δόση 0.9% παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης, ενώ η αντίστοιχη βαθμολογία για τη γεύση και τη συνολική αποδοχή παρέμειναν κάτω από το όριο απόρριψης (5) για όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου

Η επίδραση της προσθήκης του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% (v/wt) στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μυττωτού βόειου κρέατος, φαίνεται στο σχήμα 7.

Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του αιθέριου δενδROLίβανου στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 2^η ημέρα, στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα, ενώ παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης (12^η ημέρα). Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) την ημέρα 0 της δειγματοληψίας και στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφεραν μεταξύ τους ($P>0.05$) μέχρι τη 12^η ημέρα της συντήρησης.

Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδROLίβανου στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδROLίβανου στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την

αντίστοιχη του 0.3% δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η βαθμολογία της οσμής, της γεύσης και της συνολικής αποδοχής με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στις δόσεις 0.3 και 0.6% παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης. Όμως, όταν προστέθηκε το αιθέριο έλαιο στη δόση 0.9%, μόνο η βαθμολογία για την οσμή παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης, αφού η γεύση και η συνολική αποδοχή αξιολογήθηκαν κάτω από το όριο απόρριψης (5) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη.

Προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων

Η επίδραση της προσθήκης του μίγματος των αιθέριων ελαίων στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μutton βόειου κρέατος, φαίνεται στο σχήμα 8.

Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P<0.05$) μέχρι την 2^η ημέρα, στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα, ενώ παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της οσμής από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% δε διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη της δόσης 0.9%, παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη

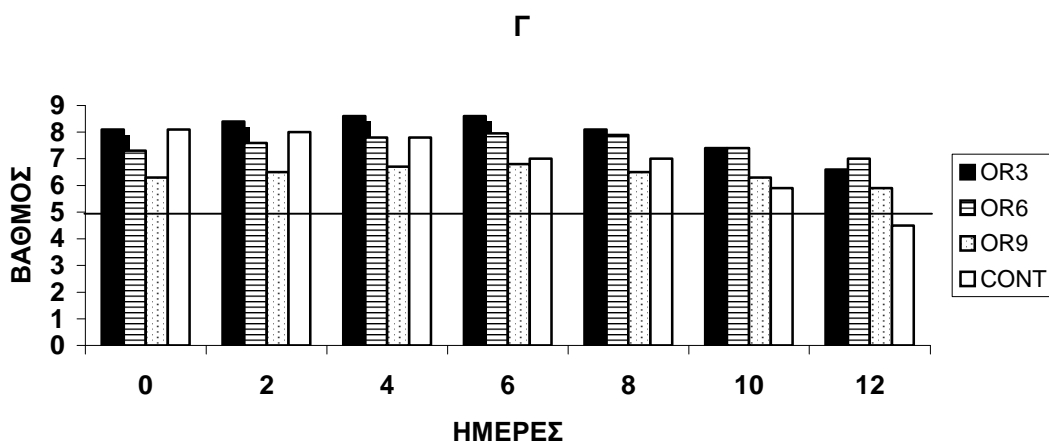
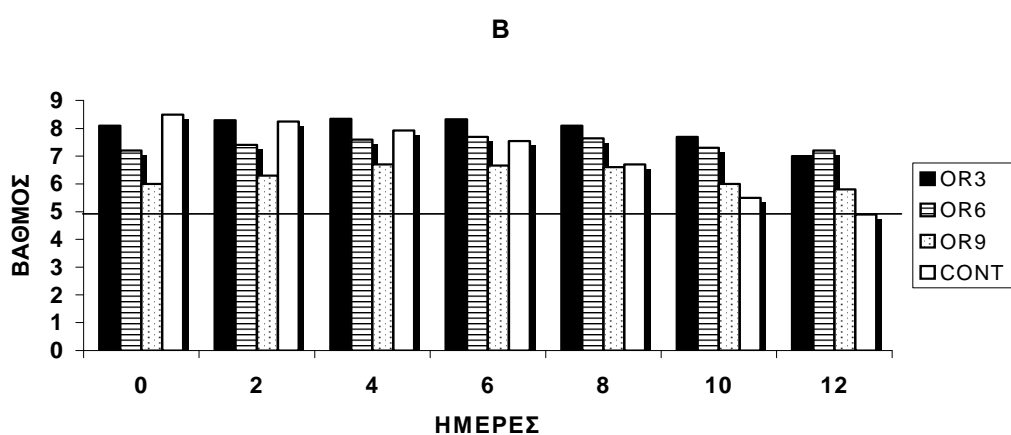
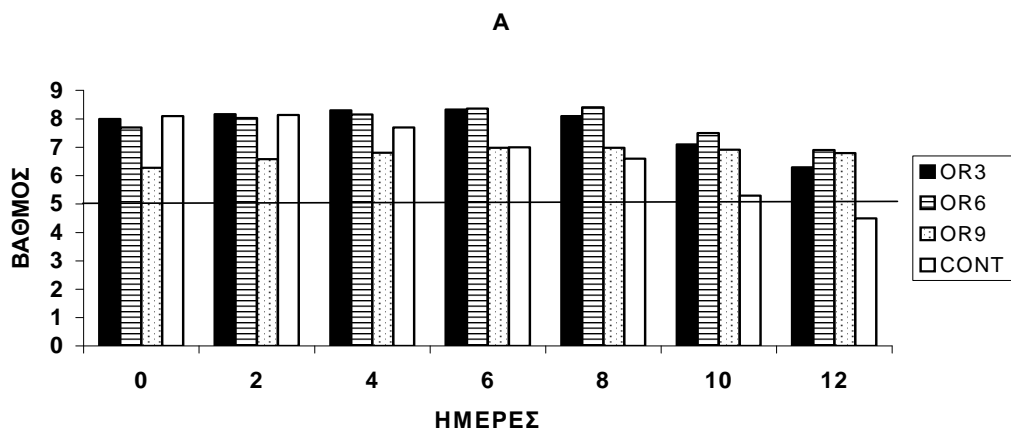
($P < 0.05$) μέχρι την 6^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε ($P > 0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 °C.

Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P < 0.05$) μέχρι τη 2^η ημέρα, στη συνέχεια δε διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) μέχρι την 8^η ημέρα, ενώ παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της γεύσης από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P < 0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. ενώ συγκρινόμενη με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

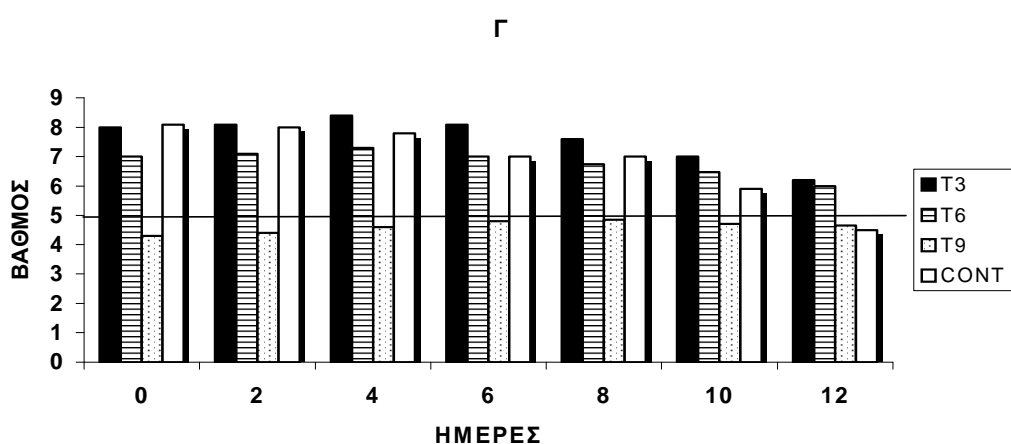
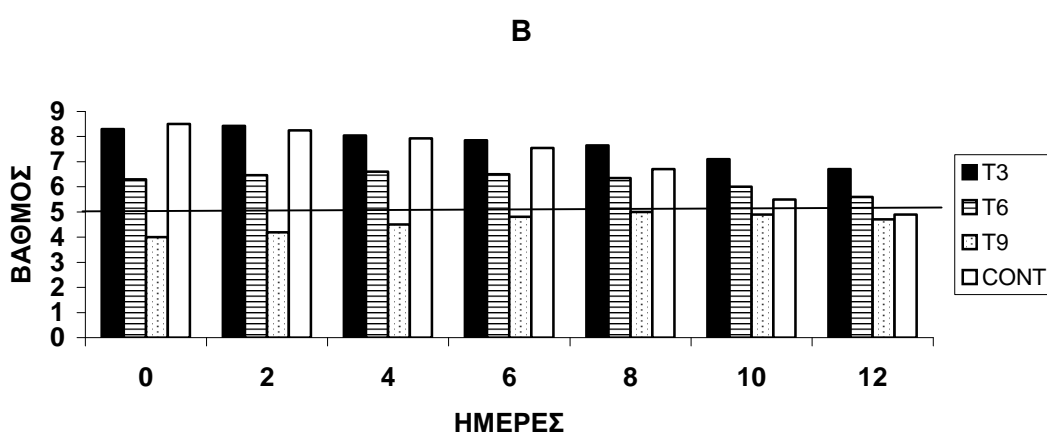
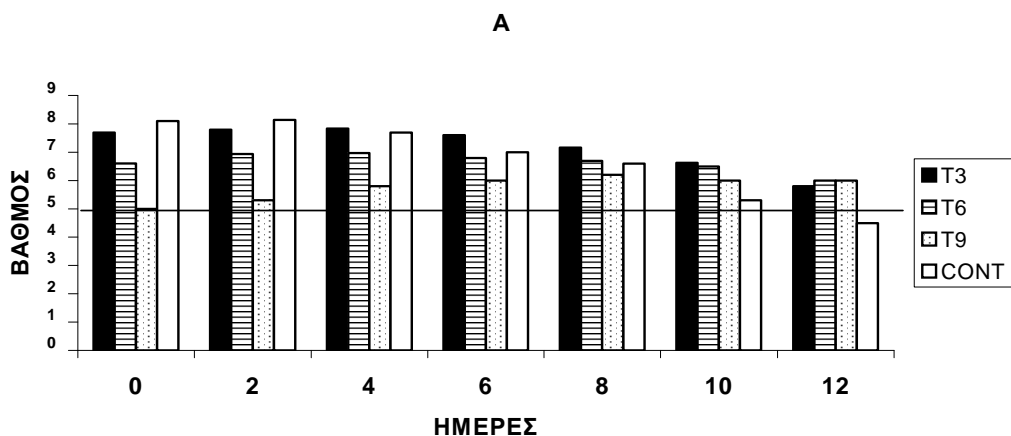
Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.3% σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μαρτύρων ήταν σημαντικά μικρότερη ($P < 0.05$) μέχρι τη 2^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P > 0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Η βαθμολογία της συνολικής αποδοχής από την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στη δόση 0.6% σε σύγκριση με την αντίστοιχη του 0.3% ήταν σημαντικά μικρότερη ($P < 0.05$) μέχρι τη 10^η ημέρα και στη συνέχεια δε διέφερε σημαντικά ($P > 0.05$), ενώ συγκρινόμενη με τη δόση 0.9% παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.05$) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Η οσμή, η γεύση και η συνολική αποδοχή του μυττωτού βόειου κρέατος με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων στις δόσεις 0.3 και 0.6% αξιολογήθηκαν πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης, ενώ αντίθετα μόνο η βαθμολογία της οσμής του μυττωτού με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου στη δόση 0.9% παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης (5) καθώς

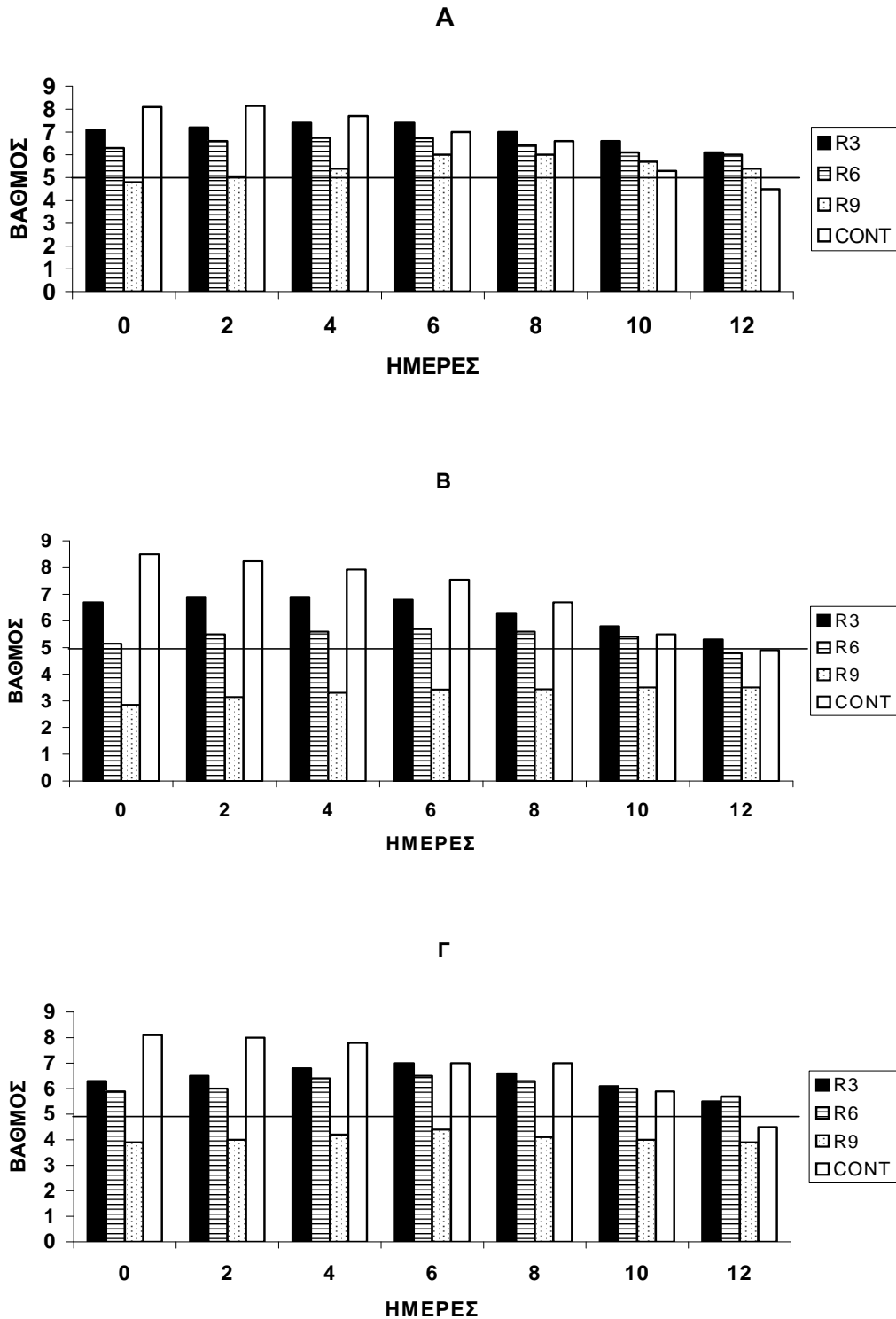
παράλληλα τόσο η γεύση όσο και η συνολική αποδοχή αξιολογήθηκαν κάτω από το όριο απόρριψης σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C.



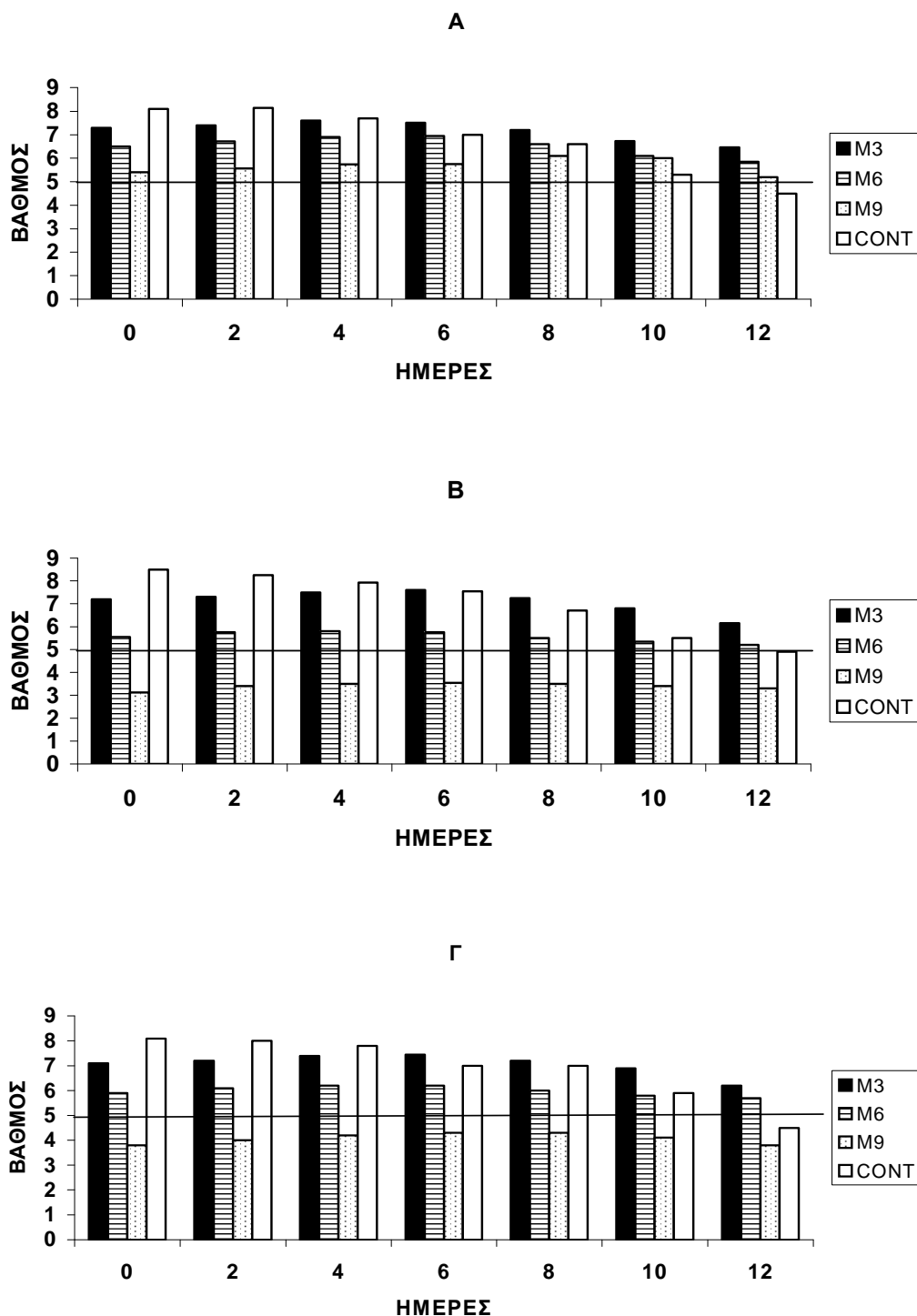
Σχήμα 5. Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων μυττωτού βόειου κρέατος στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.3% (OR3), 0.6% (OR6) και 0.9% (OR9) και των μαρτύρων (CONT): **A.** οσμή, **B.** γεύση και **Γ.** συνολική αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (5).



Σχήμα 6. Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων μυττωτού βόειου κρέατος στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.3% (T3), 0.6% (T6) και 0.9% (T9) και των μαρτύρων (CONT): **A.** οσμή, **B.** γεύση και **Γ.** συνολική αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (5).



Σχήμα 7. Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων μυττωτού βόειου κρέατος στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκεντρώσεις 0.3% (R3), 0.6% (R6) και 0.9% (R9) και των μαρτύρων (CONT): **A.** οσμή, **B.** γεύση και **Γ.** συνολική αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (5).



Σχήμα 8. Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων μυττωτού βόειου κρέατος στα οποία προστέθηκε το μίγμα των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.3% (M3), 0.6% (M6) και 0.9% (M9) και των μαρτύρων (CONT): **A.** οσμή, **B.** γεύση και **Γ.** συνολική αποδοχή. Η γραμμή αντιστοιχεί στο όριο απόρριψης (5).

3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματός τους σε συγκεντρώσεις 0.3 και 0.6% σε μυττωτό βόειου κρέατος είχε ως αποτέλεσμα τα εξετασθέντα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (οσμή, γεύση και συνολική αποδοχή) να είναι αποδεκτά από τους δοκιμαστές καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη, αφού αξιολογήθηκαν με βαθμολογίες πάνω από το όριο απόρριψης. Όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν από τους δοκιμαστές με μεγαλύτερη βαθμολογία σε σχέση με τους μάρτυρες από την 6^η – 8^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης (12^η ημέρα) στους 4 °C. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας και άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων μικρότερες του 1% βελτίωσαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων στα οποία προστέθηκαν. Έτσι οι Mejlholm και Dalgaard (2002) βρήκαν ότι δόσεις 0.05% αιθέριου ελαίου ρίγανης προκάλεσαν μια διακριτή αλλά ευχάριστη γεύση σε φιλέτα μπακαλιάρου, η οποία μειώθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου κατά τη συντήρηση των φιλέτων σε θερμοκρασία 2 °C. Ομοίως, οι Harpaz και συν (2003) ανέφεραν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης και θυμαριού σε δόση 0.05% σε λαυράκι είχε ως αποτέλεσμα μια ευχάριστη οσμή κατά τη διάρκεια συντήρησης σε θερμοκρασία 0-2°C για 33 ημέρες. Οι Quattara και συν. (2001) αναφέρουν ότι η εμβάπτιση μαγειρεμένων γαρίδων σε αιθέριο έλαιο θυμαριού στη δόση 0.9% δεν επηρέασε την οργανοληπτική εικόνα τους, ενώ η εμβάπτιση των μαγειρεμένων γαρίδων σε συγκέντρωση 1.8% του ελαίου προκάλεσε την απόρριψη του τροφίμου. Το γεγονός της μη απόρριψης των γαρίδων με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού στη δόση 0.9% σε αντίθεση με τη δική μας έρευνα, πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι

ερευνητές χρησιμοποίησαν το αιθέριο έλαιο με εμβάπτιση, ενώ στην παρούσα εργασία έγινε προσθήκη στο μυττωτό βόειου κρέατος.

Αντίθετα ο μυττωτός από βόειο κρέας με την προσθήκη των αιθέριων ελαίων θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των τριών αιθέριων ελαίων σε δόση 0.9%, παρουσίασε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που δεν ήταν αποδεκτά από τους δοκιμαστές, σε αντίθεση με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην ίδια δόση (0.9%) που ήταν αποδεκτά από τους δοκιμαστές καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μυττωτός βόειου κρέατος με τη προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε δόση 0.9% παρουσίασε βελτιωμένα, σε σχέση με τους μάρτυρες, οργανοληπτικά χαρακτηριστικά από τη 10^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης. Οι Skandamis και Nychas (2001) αναφέρουν ότι προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 1% (v/w) βελτίωσε την οσμή, τη γεύση και το χρώμα δειγμάτων μοσχαρίσιου κρέατος που είχαν συσκευαστεί σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή υπό κενό καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης τους στους 5 °C. Σύμφωνα με τους Tsigarida και συν. (2000) μοσχαρίσιο κρέας στο οποίο είχε προστεθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης σε δόση 0.8% ήταν οργανοληπτικά αποδεκτό ως προς τη γεύση του μετά από μαγείρεμα.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα μας, όλα τα αιθέρια έλαια και το μίγμα τους που εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 0.9% σε θρεπτικό ζωμό παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των τροφογενών παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* 0157:H7 και *Salmonella*. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενους ερευνητές, οι οποίοι παρατήρησαν ότι όταν οι υψηλές συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων των βοτάνων που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση σε *in vitro* πειράματα, προστεθούν στα τρόφιμα μπορούν να επηρεάσουν

αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, λόγω των αυξημένων ποσοτήτων των φαινολικών τους συστατικών (Burt 2004, Holeý και Patel 2005).

Κεφάλαιο 4^ο

Διερεύνηση της αντιμικροβιακής
δράσης των αιθέριων ελαίων και του
συνδυασμού τους με νισίνη
σε μυττωτό βοείου κρέατος

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και μίγματός τους σε συγκέντρωση 0.3% ήταν ασθενής και έτσι δεν μελετήθηκαν στη συγκέντρωση αυτή στο μυττωτό βόειου κρέατος. Εξάλλου, τα αιθέρια έλαια του θυμαριού, του δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων τους στη συγκέντρωση 0.9% επέδρασαν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μυττωτού βόειου κρέατος. Κατά συνέπεια, τα αιθέρια έλαια δεν μελετήθηκαν σ' αυτές τις συγκεντρώσεις στο μυττωτό βόειου κρέατος.

Η νισίνη είναι μια βακτηριοσίνη με αντιμικροβιακή δράση και συνήθως χρησιμοποιείται στα τρόφιμα σε συγκεντρώσεις 500 έως 1000 IU/g (Pawar και συν. 2000).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων της ρίγανης (0.6% και 0.9%), του θυμαριού (0.6%), του δενδρολίβανου (0.6%), του μίγματος αυτών (0.6%), της νισίνης (500 ή 1000 IU/g) και του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και της *E. coli* O157:H7 σε μυττωτό βόειου κρέατος, κατά τη συντήρησή του στην ψύξη.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. Παθογόνα βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes* (στελέχη Scott A, Lmk και μίγμα τους), *S. aureus* (στελέχη Sap, Sak και μίγμα τους), *E. coli* 0157:H7 (στελέχη EDL 932, EDL 933 και μίγμα τους) και *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. enteritidis* και μίγμα τους). Τα στελέχη ήταν τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων στο θρεπτικό ζωμό. Η παραγωγή της καλλιέργειας χρήσεως για τον ενοφθαλμισμό του μυττωτού βόειου κρέατος γίνονταν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.

4.2.2. Αιθέρια έλαια και νισίνη

Η εκχύλιση των αιθέριων ελαίων και η προετοιμασία του διαλύματος νισίνης που χρησιμοποιήθηκαν, περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.2.2.

4.2.3. Παρασκευή των δειγμάτων μυττωτού κρέατος

Μείζων ψοΐτες μύες (*Major psoas*) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μυττωτού βόειου κρέατος. Οι μύες συλλέχθηκαν από σφάγια βοοειδών 1 ώρα μετά τη σφαγή, από βιομηχανικό σφαγείο της περιοχής και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη στους 4 °C εντός 30 λεπτών. Για την παρασκευή των «στείρων» δειγμάτων κρέατος χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Greer and Jones (1991). Έτσι οι μύες εμβαπτιζόνταν σε αιθανόλη 95% και καίγονταν εξωτερικά με

φλόγα. Ακολούθως το επιφανειακό στρώμα των μυών αφαιρούνταν κάτω από άσηπτες συνθήκες και το εσωτερικό τους γινόταν μυττωτός με τη χρήση μεταλλικής μηχανής κοπής του κρέατος, η οποία προηγουμένως είχε αποστειρωθεί σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121 °C για 15 λεπτά. Πριν τον ενοφθαλμισμό του κρέατος με τα στελέχη των παθογόνων μικροοργανισμών, την προσθήκη των αιθέριων ελαίων και / ή της νισίνης, ο μυττωτός που παρασκευαζόταν με την παραπάνω διαδικασία, εξεταζόταν για πιθανή επιμόλυνση από βακτήρια (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Ο.Μ.Χ.) ή την παρουσία των εξεταζόμενων παθογόνων.

Ομάδες μυττωτού βόειου κρέατος με την προσθήκη αιθέριων ελαίων και νισίνης

Τα δείγματα «στείρου» μυττωτού βόειου κρέατος (25 g) τοποθετούνταν σε σακούλες stomacher και ενοφθαλμιζόνταν με τα στελέχη ή το μίγμα στελεχών της *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, της *E. coli* 0157:H7 και της *S. enteritidis* ή/και *S. typhimurium* σε πληθυσμούς 4 log cfu/g. Τα ενοφθαλμισμένα δείγματα κρέατος ομογενοποιούνταν σε συσκευή stomacher 400 (Lab Blender 400, Seward Medical Ltd., London, UK) για 2 min. Μετά την ομογενοποίηση, στα ενοφθαλμισμένα με τα παθογόνα δείγματα γινόταν προσθήκη των αιθέριων ελαίων, της νισίνης ή του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη. Τα δείγματα μυττωτού βόειου κρέατος στα οποία δεν προστέθηκε αιθέριο έλαιο ή νισίνη, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυττωτού βόειου κρέατος με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9%, αιθέριου ελαίου θυμαριού σε συγκέντρωση 0.6%, αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 0.6%, μίγματος των αιθέριων ελαίων σε

συγκέντρωση 0.6% (0.2% ρίγανη, 0.2% θυμάρι και 0.2% δενδρολίβανο), νισίνης σε συγκέντρωσεις 500 IU και 1000 IU/g, αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9% με νισίνη (500 IU ή 1000 IU/g), αιθέριου ελαίου θυμαριού σε συγκέντρωση 0.6% με νισίνη (500 IU ή 1000 IU/g), αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 0.6% με νισίνη (500 IU ή 1000 IU/g) και μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκέντρωση 0.6% με νισίνη (500 IU ή 1000 IU/g).

Για να εξασφαλιστεί καλύτερη κατανομή των αιθέριων ελαίων και της νισίνης στη μάζα του κρέατος, τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν μετά την προσθήκη των αιθέριων ελαίων και της νισίνης στη συσκευή stomacher, για ακόμη 2 min. Οι σακούλες stomacher κλείστηκαν με αναδίπλωση και συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 4 ή 10 °C για 12 ημέρες, προσομοιάζοντας κατάλληλη και ακατάλληλη θερμοκρασία ψύξης, αντίστοιχα.

4.2.4. Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων για τους πληθυσμούς των παθογόνων πραγματοποιούνταν σε διαστήματα 2 ημερών μέχρι το τέλος της συντήρησής τους στους 4 ή 10 °C για 12 ημέρες. Μετά από κάθε δειγματοληψία, σε κάθε σακούλα stomacher η οποία περιείχε ένα δείγμα κρέατος (25 g), γινόταν προσθήκη 225 ml πεπτονόχου ύδατος 0.1%, ώστε να επιτευχθεί μια αρχική αραιώση 1:10. Τα δείγματα ομογενοποιούνταν στη συσκευή stomacher για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε στείρο πεπτονόχο ύδωρ (0.1%) και στη συνέχεια γινόταν ενοφθαλμισμός 0.1 ml στην επιφάνεια διπλών τριβλίων του αντίστοιχου εκλεκτικού υποστρώματος για το κάθε παθογόνο. Η καταμέτρηση των πληθυσμών του κάθε μικροοργανισμού γινόταν

στα ακόλουθα εκλεκτικά υποστρώματα: PALCAM (Merck) για τη *L. monocytogenes*, Baird Parker (Merck) για τον *S. aureus*, SMAC (Oxoid) για την *E. coli* O157:H7 και XLD (Merck) για τη *Salmonella*. Τα τριβλία στην συνέχεια επωάζονταν στους 37 °C για 24 ώρες.

Όταν οι πληθυσμοί των παθογόνων έπεφταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (10 cfu / g), η ανίχνευση των παθογόνων γίνονταν μετά από εμπλουτισμό ως ακολούθως:

L. monocytogenes: Σε κάθε σακούλα stomacher με δείγμα κρέατος 25 g, γινόταν προσθήκη 225 ml εμπλουτιστικού ζωμού για *Listeria* (*Listeria* enrichment broth, Merck). Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονταν στους 30 °C για 24 h και μετά την επώαση γινόταν επίστρωση όγκου 0.1 ml σε διπλά τριβλία με εκλεκτικό υπόστρωμα PALCAM και τα τελευταία επωάζονταν στους 37 °C 24 ώρες. Επακολουθούσε βιοχημική (api *Listeria*, bioMerieux) και ορολογική (O.B.I.S. *Listeria*, OXOID) επιβεβαίωση των αποικιών.

E. coli O157:H7: Εμπλουτισμός των δειγμάτων με 225 ml mTSB (modified Tryptic Soy Broth, Oxoid) ενισχυμένο με νοβοβιοσίνη (SR 181, Oxoid) και επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS) (Dynabeads®, Dynal, Norway), επίστρωση σε SMAC ενισχυμένο με cefixime-tellurite και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Τέλος, ακολουθούσε βιοχημική (API 20E, bioMerieux) και ορολογική (*E. coli* LATEX, Oxoid) επιβεβαίωση των αποικιών.

S. typhimurium και *S. enteritidis*: Εμπλουτισμός των δειγμάτων με ζωμό 225 ml Rappaport-Vassiliadis (Merck). Τα δείγματα, στη συνέχεια, επωάζονταν στους 42 °C για 24 ώρες και όγκος 0.1 ml επιστρωνόταν σε διπλά τριβλία που περιείχαν εκλεκτικό υπόστρωμα XLD (Merck). Ακολούθως, τα τριβλία επωάζονταν στους 37 °C για 24 ώρες. Επακολουθούσε βιοχημική (API 20E, bioMerieux) και ορολογική (*Salmonella* SERO-QUICK ID kit, Statens SI, Denmark) επιβεβαίωση των αποικιών.

S. aureus: Εμπλουτισμός των δειγμάτων με 225 ml BAIRD broth (Merck). Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες και μετά την επώαση όγκος 0.1 ml επιστρωνόταν σε διπλά τριβλία με εκλεκτικό υπόστρωμα Baird-Parker (Merck) και επακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 24 h. Τέλος ακολουθούσε βιοχημική (Bactident® Catalase, Merck) και ορολογική επιβεβαίωση των αποικιών (Bactident® Staph, Merck).

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) προδιορίζονταν σε Plate Count Agar (PCA) μετά από επώαση στους 25 °C για 72 ώρες.

4.2.5. Χημική ανάλυση

Η ανάλυση του μυττωτού βόειου κρέατος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες, λίπος και υγρασία έγινε κατά AOAC (1990). Το pH των δειγμάτων προσδιορίζονταν με πεχάμετρο (pH meter WTW, type 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Germany) σε διαστήματα 2 ημερών μέχρι το τέλος της συντήρησής τους στους 4 ή 10 °C.

4.2.6. Στατιστική επεξεργασία

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων και της νισίνης στο μυττωτό βοείου κρέατος διενεργήθηκε σε 3 χωριστά δείγματα (επαναλήψεις). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το test του Bartlett. Στις περιπτώσεις που υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις των επιμέρους χειρισμών σε κάθε χρονικό

διάστημα της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών του Duncan για τη διαπίστωση σημαντικών διαφορών μεταξύ τους. Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. Χημική ανάλυση

Η χημική ανάλυση του μutton βόειου κρέατος έδειξε ότι η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες, λίπος και υγρασία, ήταν: $21.8 \pm 0.2 \%$, $2.4 \pm 0.1 \%$ και $72.2 \pm 0.4 \%$, αντίστοιχα. Το αρχικό pH του κρέατος αυξήθηκε από 5.3 σε 5.75 και 5.97 στο τέλος της συντήρησής του στους 4 και 10 °C αντίστοιχα. Οι τιμές του pH που καταγράφηκαν στους μάρτυρες δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τις αντίστοιχες των δειγμάτων, στα οποία είχαν προστεθεί τα αιθέρια έλαια.

4.3.2. Συμπεριφορά των παθογόνων βακτηρίων στους μάρτυρες

Οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* στους μάρτυρες εμφάνισαν ανάπτυξη στη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C, επειδή το παθογόνο αυτό είναι ψυχρόφιλος μικροοργανισμός. Έτσι οι αρχικοί πληθυσμοί (10^4 cfu/g) όλων των στελεχών του βακτηρίου αναπτύχθηκαν και έφθασαν τους 6.1 και 8 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης στους 4 και 10 °C, αντίστοιχα.

Οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus*, της *Salmonella* και *E. coli* 0157:H7 (10^4 cfu/g) δεν αναπτύχθηκαν και παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Αντίθετα στη συντήρηση στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus*, της *Salmonella* και *E. coli* 0157:H7 αναπτύχθηκαν και έφθασαν τους 6.7 – 6.9, 7-7.2 και 6.2 - 7 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα.

4.3.3. Αντιμικροβιακή δράση της νισίνης

L. monocytogenes

Με την προσθήκη 500 IU/g νισίνης, οι πληθυσμοί του στελεχούς Scott A και του μίγματος των στελεχών δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων, σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις δυο θερμοκρασίες. Οι αρχικοί πληθυσμοί του στελεχούς Lmk μειώθηκαν περίπου στους 3.1 log cfu/g τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια, οι πληθυσμοί του Lmk αναπτύχθηκαν χωρίς να διαφέρουν σημαντικά ($P>0.05$) σε σχέση με τους μάρτυρες από την 4^η και 2^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4 και 10 °C, αντίστοιχα.

Με την προσθήκη 1000 IU/g νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των εξετασθέντων στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν περίπου κατά 1.4 - 1.6 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν περίπου τους 4.4 log cfu/g για το στέλεχος Scott A και το μίγμα στελεχών και τους 3.8 log cfu/g για το στέλεχος Lmk στο τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών του μικροοργανισμού αυξήθηκαν μετά τη 2^η ημέρα φτάνοντας 5.2, 4.8 και 5.4 log cfu/g για τα στελέχη Scott A, Lmk και το μίγμα τους την 12^η ημέρα αντίστοιχα. Η προσθήκη της νισίνης (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης του μutton βόειου κρέατος στις δυο θερμοκρασίες ψύξης.

S. aureus

Με την προσθήκη 500 IU/g νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 0.7 – 1 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο

θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν τους 5.8 – 6.1 log cfu/g την 12^η ημέρα. Οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων τόσο στους 4 °C, όσο και στους 10 °C καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Με την προσθήκη 1000 IU/g νισίνης, οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 1.35 – 1.6 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 5.1 – 5.6 log cfu/g την 12^η ημέρα. Οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης στις 500 IU/g σε όλο το διάστημα συντήρησης και στις δύο θερμοκρασίες.

Salmonella

Η προσθήκη της νισίνης στις δύο συγκεντρώσεις (500 ή 1000 IU/g) δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου, αφού οι πληθυσμοί όλων των στελεχών δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια συντήρησής τους τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

***E. coli* O157:H7**

Η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου, αφού οι πληθυσμοί όλων των στελεχών δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια συντήρησής τους τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

4.3.4. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης

L. monocytogenes

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους της *L. monocytogenes*, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 9-11, αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.6% οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν κατά 1.9 – 2.1 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης, αυξήθηκαν και έφτασαν τους 2.9 – 3.1 και 3.5 – 3.7 log cfu/g τη 12^η ημέρα της συντήρησης στους 4 και 10 °C, αντίστοιχα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.6% παρουσίασε πληθυσμούς, οι οποίοι ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης στις 1000 IU/g καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί του στελέχους Scott A και του μίγματος στελεχών της *L. monocytogenes* μειώθηκαν περίπου κατά 3 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών

αυτών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 2 – 2.2 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί του στελέχους Scott A και του μίγματος των στελεχών αυξήθηκαν και έφτασαν τους 2.3 και 3 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης, αντίστοιχα. Αντίθετα η ανίχνευση του στελέχους Lmk της *L. monocytogenes* ήταν εφικτή μόνο μετά από εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου (0.6 %) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6 %) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes*, αφού η ανίχνευση όλων των στελεχών του παθογόνου ήταν εφικτή μόνο μετά από εμπλουτισμό καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 °C όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) η ανίχνευση όλων των στελεχών του παθογόνου ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C. Στους 10 °C, η ανίχνευση για το στέλεχος Lmk ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης, ενώ για το στέλεχος Scott A και το μίγμα των στελεχών ήταν εφικτή επίσης με εμπλουτισμό μέχρι την 8^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 10 °C, οι πληθυσμοί του στελέχους Scott A και του μίγματος των στελεχών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 1.8 και 2 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.9%) με τις δύο συγκεντρώσεις νισίνης (500 ή 1000 IU/g) παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση, αφού η

ανίχνευση όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* δεν ήταν εφικτή ούτε με εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης τόσο στους 4 °C όσο και στους 10 °C.

S. aureus

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά των στελεχών Sap, Sak και του μίγματός τους του *S. aureus* στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C φαίνεται στα σχήματα 12 – 14, αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά περίπου 2 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* δε μεταβλήθηκαν μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών Sap, Sak και του μίγματός τους αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4, 3.85 και 4.1 log cfu/g, αντίστοιχα (12^η ημέρα). Οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς με την προσθήκη της νισίνης (1000 IU/g).

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 2.5-2.8 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P > 0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.2 – 3.6 log cfu/g την 12^η ημέρα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σημαντικά χαμηλότερους ($P < 0.05$), σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της

μεμονωμένης προσθήκης του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g), η ανίχνευση των στελεχών του *S. aureus* ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό μέχρι και την 4^η ημέρα για το Sap και την 8^η ημέρα για το Sak ή το μίγμα τους, στους 4 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης η ανίχνευση όλων των στελεχών του βακτηρίου δεν ήταν εφικτή ούτε με εμπλουτισμό φανερώνοντας βακτηριοκτόνο δράση. Στους 10 °C, το στέλεχος Sak ανιχνευόταν καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Αντίθετα, το στέλεχος Sap και το μίγμα των στελεχών ανιχνεύονταν μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 6^η και 8^η ημέρα, αντίστοιχα. Στη συνέχεια η ανίχνευση των στελεχών αυτών δεν ήταν εφικτή ούτε με εμπλουτισμό.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%), η ανίχνευση των στελεχών του *S. aureus* ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 6^η ημέρα για το Sap, την 8^η ημέρα για το μίγμα τους και σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης για το Sak, στους 4 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης, η ανίχνευση του Sap και του μίγματος των στελεχών δεν ήταν εφικτή ούτε με εμπλουτισμό, ένδειξη βακτηριοκτόνου δράσης. Στους 10 °C, η ανίχνευση των στελεχών του παθογόνου ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 6^η ημέρα για το στέλεχος Sap και μέχρι την 8^η ημέρα για το στέλεχος Sak και το μίγμα τους. Στη συνέχεια, οι πληθυσμοί του στελέχους Sak και του μίγματος των στελεχών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 1.4 και 1.6 log cfu/g αντίστοιχα (12^η ημέρα), ενώ η ανίχνευση του Sap δεν ήταν εφικτή ούτε με εμπλουτισμό.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη τόσο στις 500 όσο και στις 1000 IU/g παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση, αφού

δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση, ούτε μετά από εμπλουτισμό, όλων των στελεχών του *S. aureus* καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης τόσο στους 4 όσο και 10 °C .

Salmonella

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά των στελεχών *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 15 - 17 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.6% οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών μειώθηκαν κατά 1.3, 1.7 και 1.6 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες, αντίστοιχα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P<0.05$). Στους 10 °C, πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4.82, 4.1 και 3.99 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου, σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του κρέατος στους 4 και 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών μειώθηκαν κατά 1.3 – 1.8 log cfu/g τη 2η ημέρα συντήρησης στους 4 και 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης του κρέατος στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P<0.05$). Αντίθετα στους 10 °C, όλα τα στελέχη της *Salmonella* αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 3.25 – 3.7 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Οι πληθυσμοί όλων των

στελεχών της *Salmonella* που παρουσίασε η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης είτε του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g).

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε την ακόλουθη αντιμικροβιακή δράση κατά των στελεχών του παθογόνου: Οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium* μειώθηκαν κατά 2.8 log cfu/g τη 2^η ημέρα της συντήρησης του κρέατος στην ψύξη. Στη συνέχεια οι πληθυσμοί του παθογόνου δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$) στους 4 °C, ενώ στους 10 °C αυξήθηκαν μετά την 4^η ημέρα φτάνοντας περίπου τους 2.8 log cfu/g, στο τέλος της συντήρησης. Η ανίχνευση της *S. enteritidis* ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C. Στους 10 °C, η ανίχνευση της *S. enteritidis* γίνονταν μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 8^η ημέρα συντήρησης, ενώ στη συνέχεια οι πληθυσμοί του στελέχους αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 1.4 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Η ανίχνευση του μίγματος των στελεχών της *Salmonella* ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό σε όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σε σχέση με τους αντίστοιχους της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g).

Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου σε συγκέντρωση 0.9% παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των στελεχών του μικροοργανισμού, αφού η ανίχνευσή τους ήταν δυνατή μόνο μετά από εμπλουτισμό καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησής και στις δύο θερμοκρασίες.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) με τις δύο συγκεντρώσεις νισίνης (500 και 1000 IU/g) παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση, αφού δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση όλων των στελεχών της *Salmonella* καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης τόσο στους 4 °C όσο και στους 10 °C.

***E. coli* O157:H7**

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά των στελεχών EDL 932 και EDL 933 της *E. coli* O157:H7, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C παρουσιάζεται στα σχήματα 18 - 20 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.6% οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών μειώθηκαν κατά 0.6 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών EDL 932, EDL 933 και του μίγματός τους αυξήθηκαν και έφτασαν τους 5.6, 5.4 και 5.1 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων.

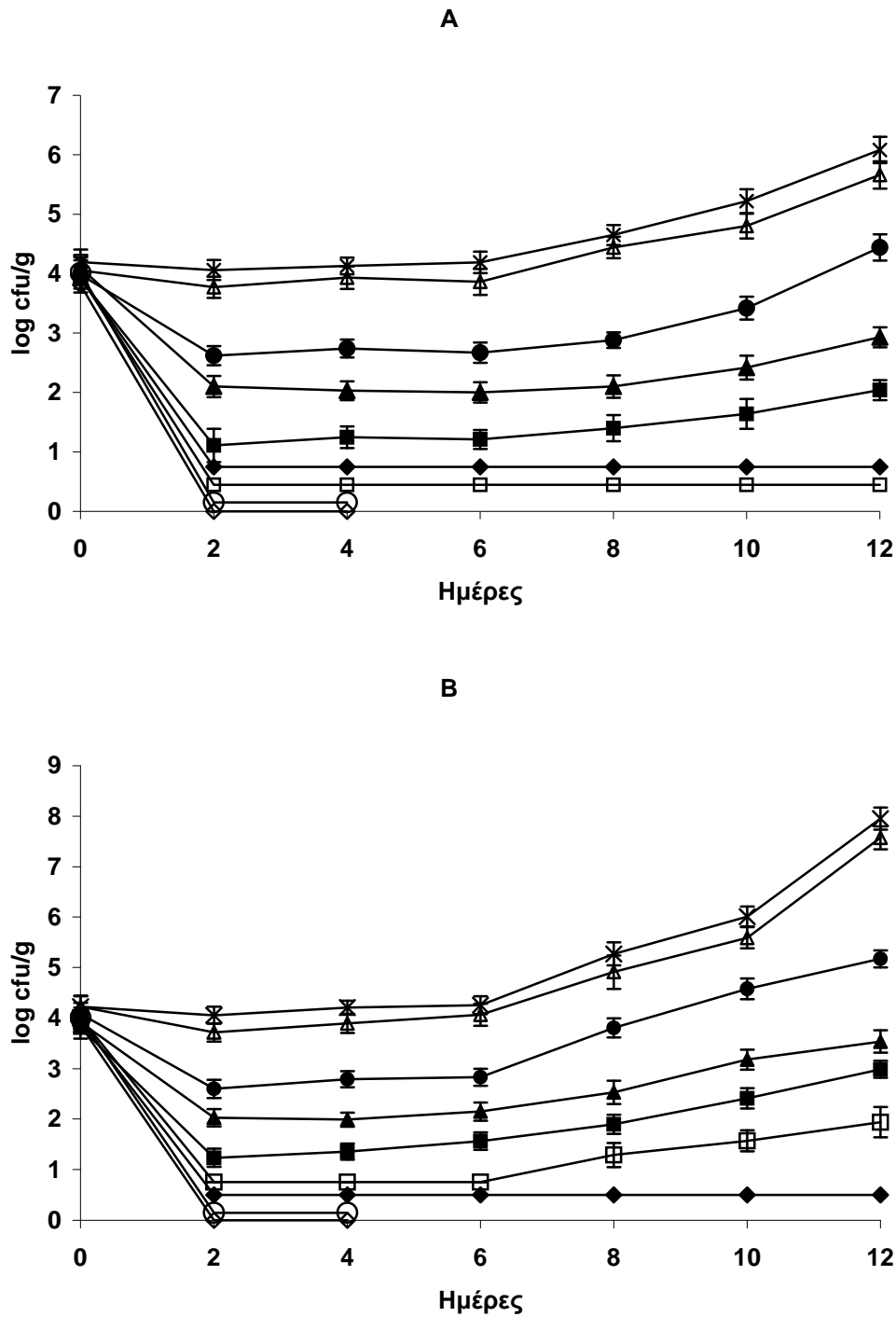
Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 μειώθηκαν κατά περίπου 1.7 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου παρέμειναν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4 - 4.2 log cfu/g την 12^η ημέρα. Η

προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς από τη μεμονωμένη προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g), τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

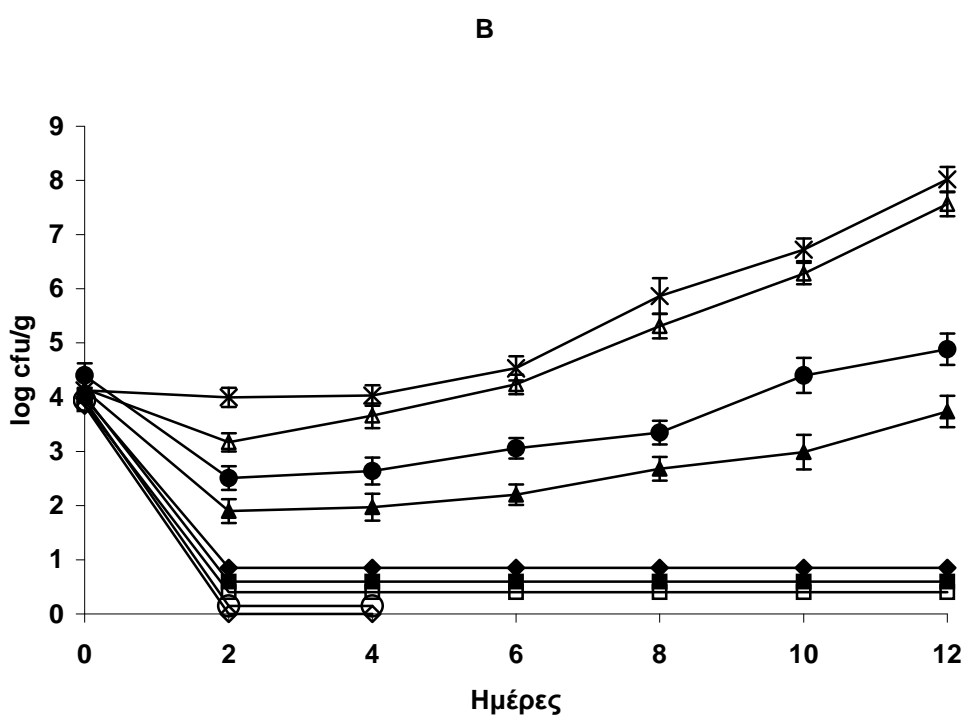
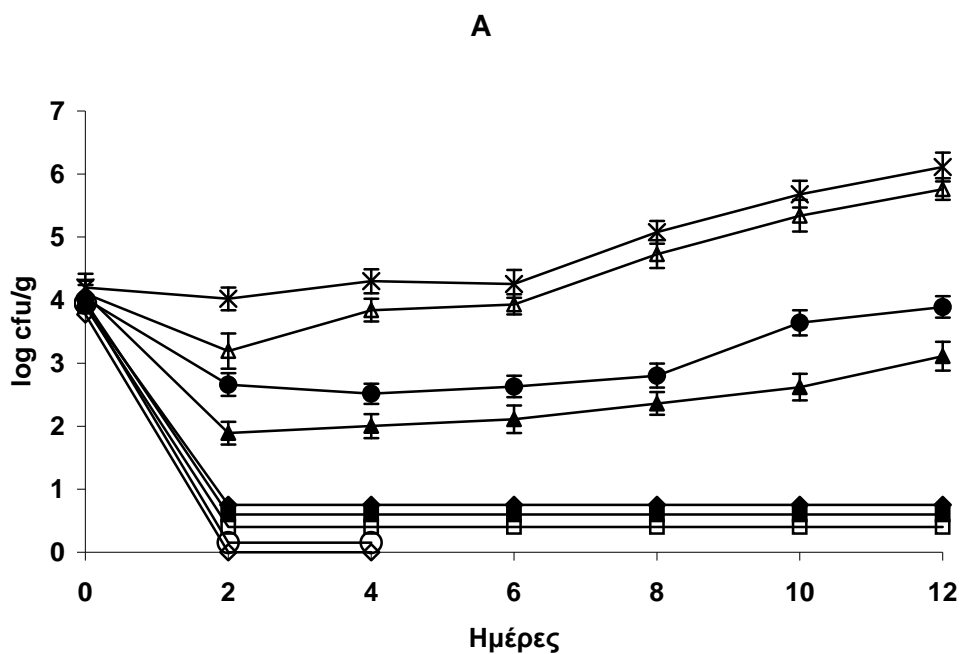
Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) και της νισίνης (1000 IU/g) και η προσθήκη του αιθέριου ελαίου σε συγκέντρωση 0.9% παρουσίασαν πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) συγκρινόμενοι μεταξύ τους αλλά και σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στις 2 θερμοκρασίες.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) και της νισίνης (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 μειώθηκαν κατά 2 – 2.7 log cfu/g την 2^η ημέρα και στους 4 και 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, αναπτύχθηκαν και έφτασαν περίπου τους 3.2 log cfu/g για τα στελέχη 932, 933 του παθογόνου και τους 2.3 log cfu/g για το μίγμα των στελεχών την 12^η ημέρα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) και της νισίνης (500 IU/g) εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερους πληθυσμούς ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%).

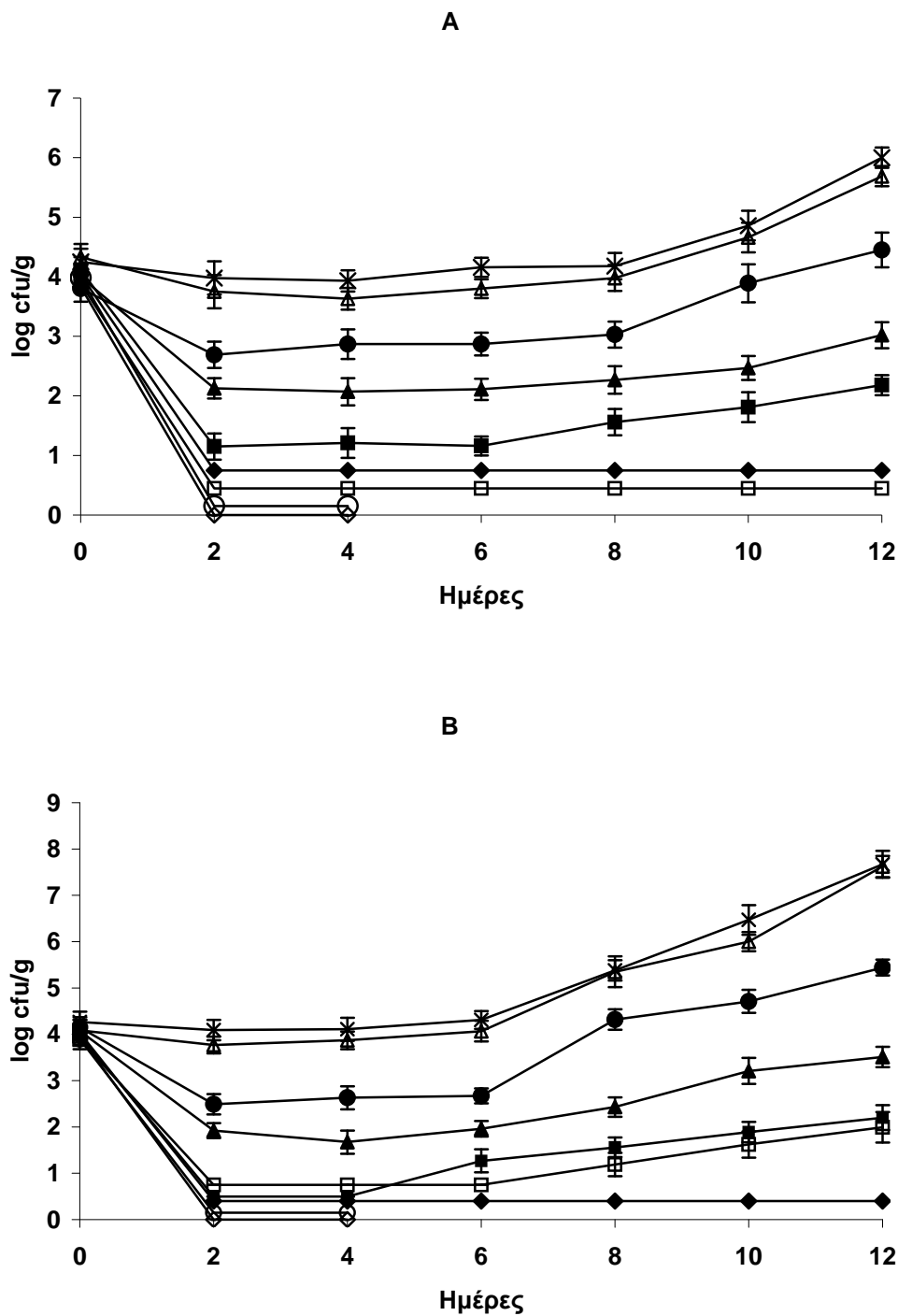
Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) με τις 1000 IU/g νισίνης παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, αφού η ανίχνευση όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 ήταν εφικτή μόνο μετά από εμπλουτισμό καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης τόσο στους 4 °C όσο και στους 10 °C.



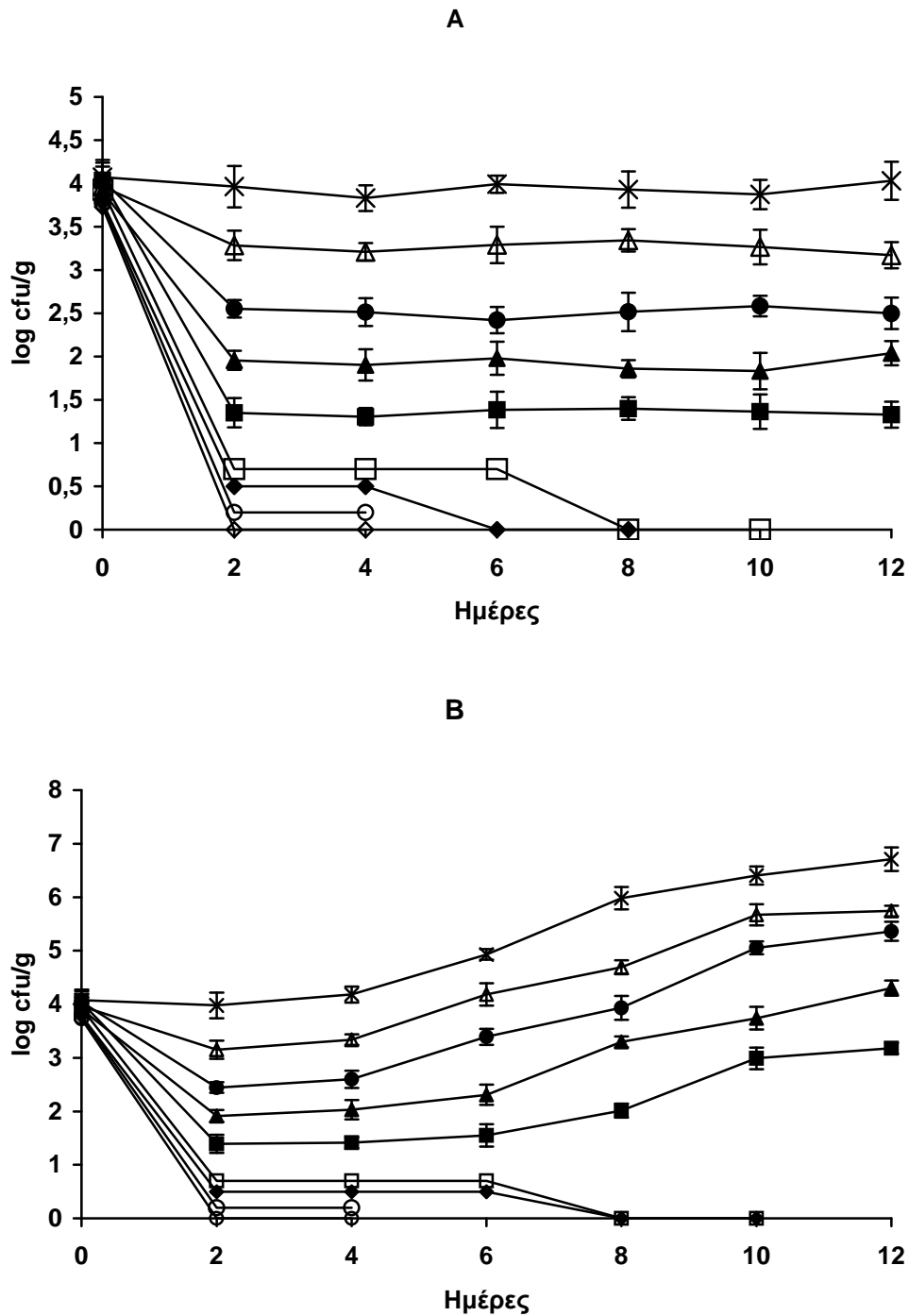
Σχήμα 9. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *L. monocytogenes* (Scott A) σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



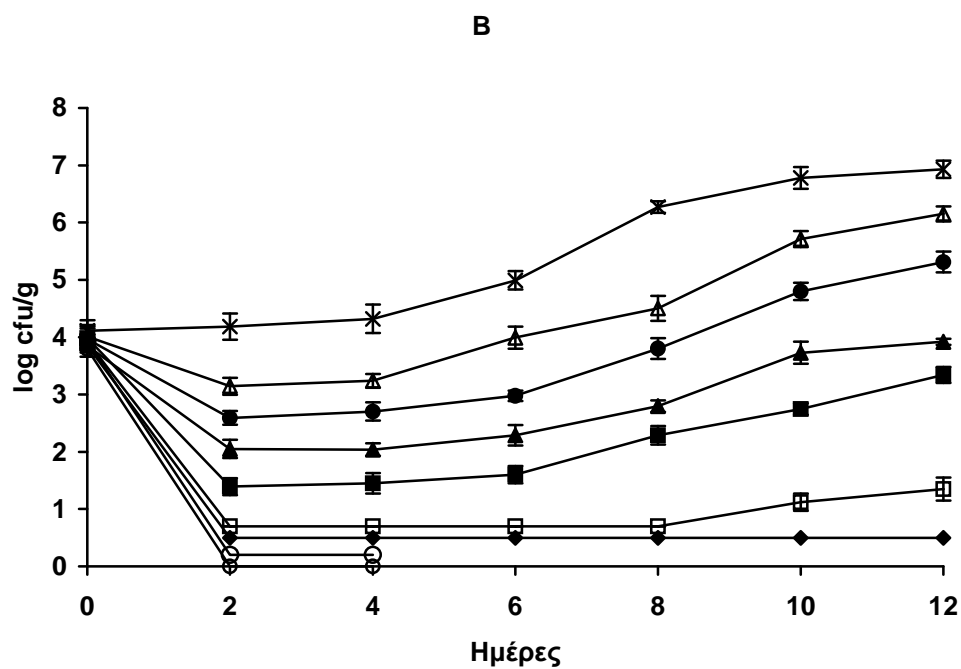
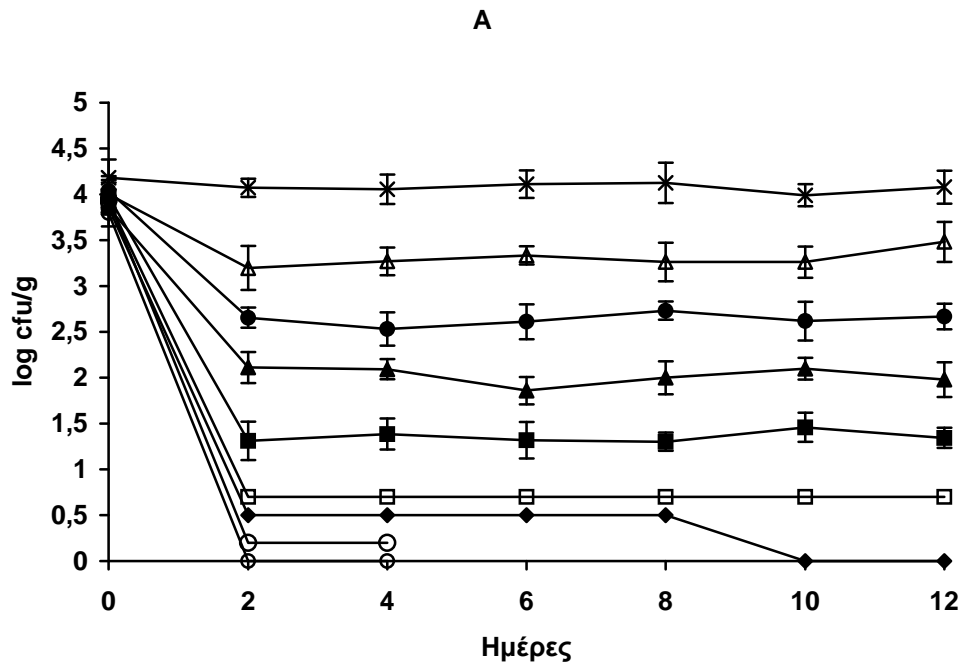
Σχήμα 10. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *L. monocytogenes* (Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-♦-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◊-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



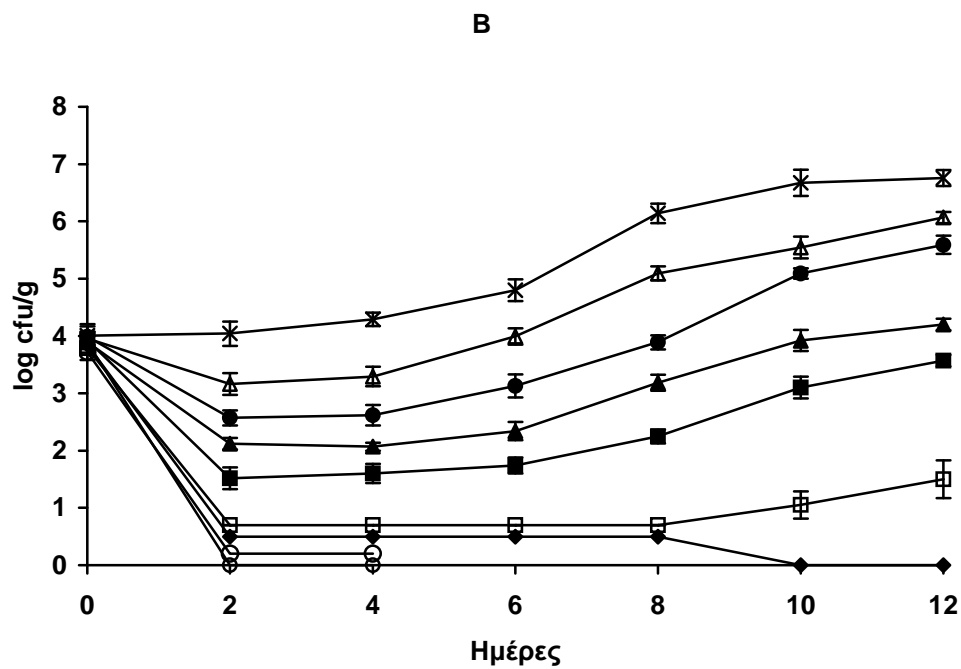
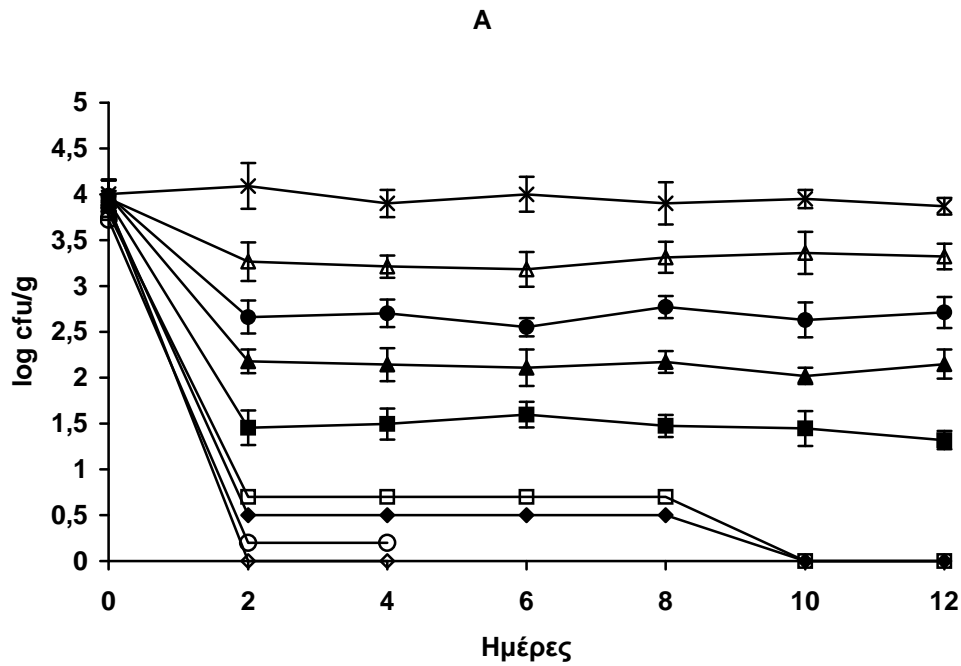
Σχήμα 11. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά μίγματος στελεχών *L. monocytogenes* (Scott A-Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



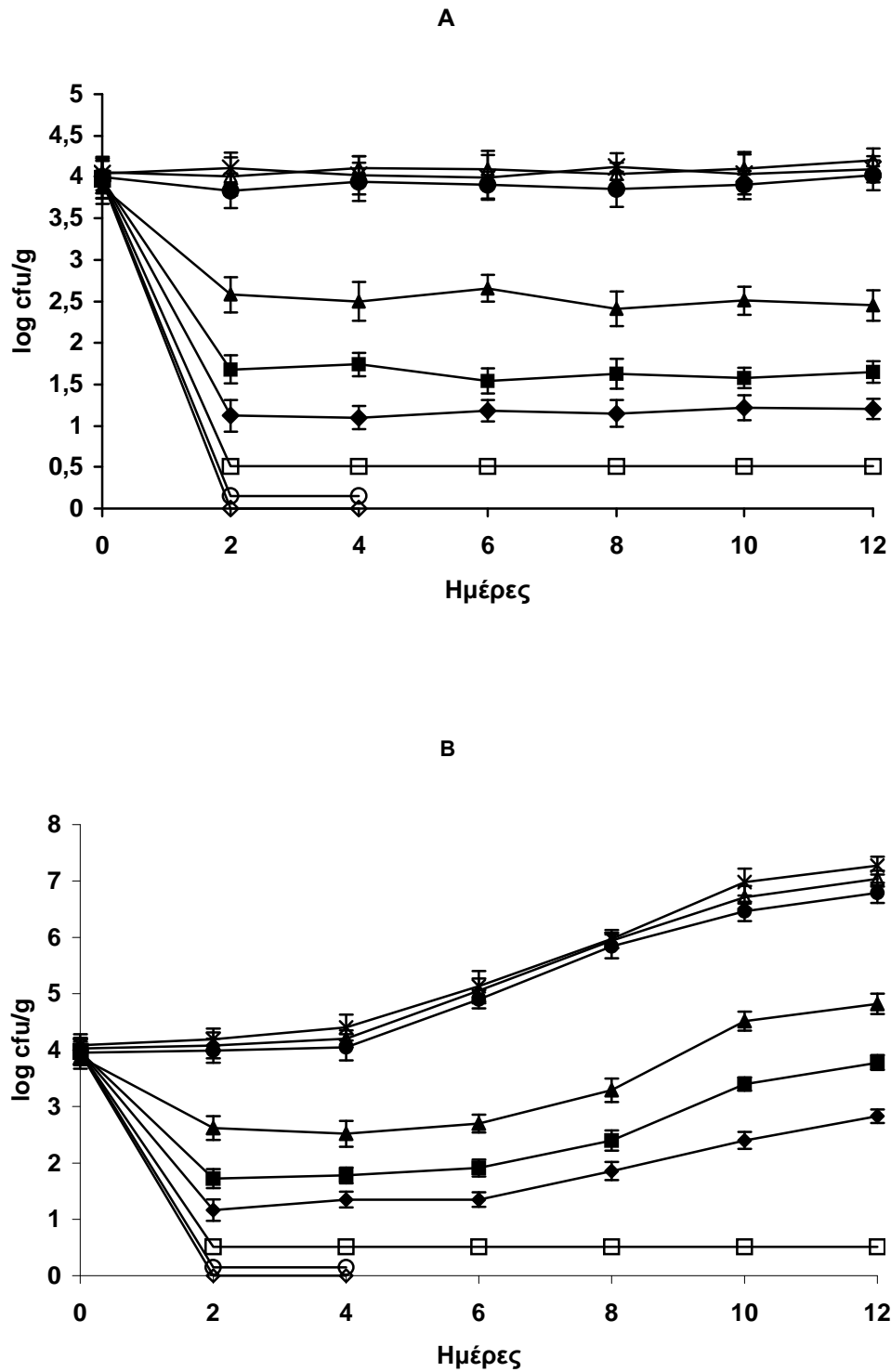
Σχήμα 12. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *S. aureus* (Sap) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



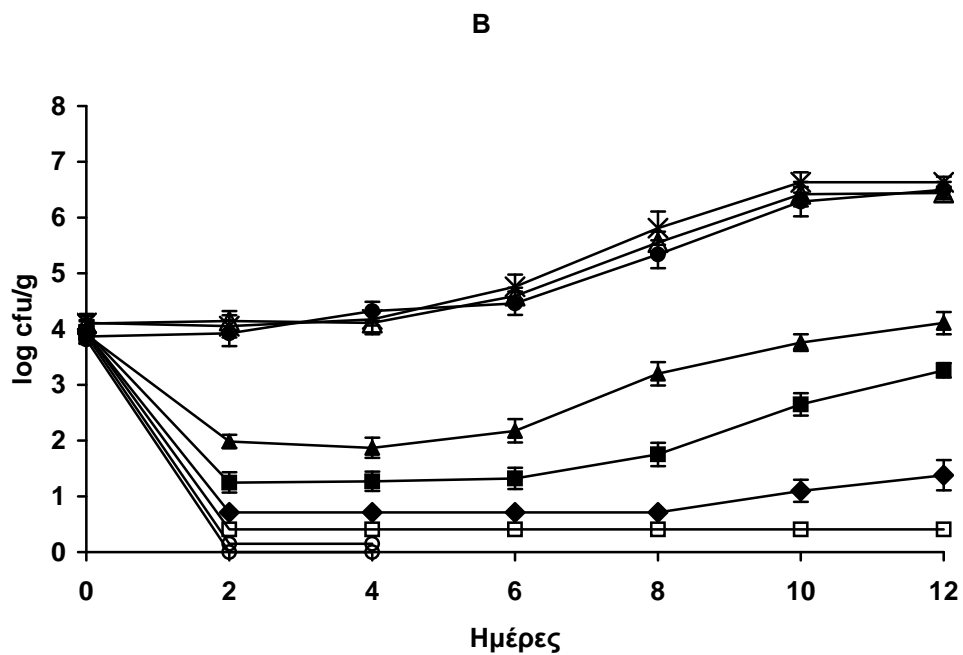
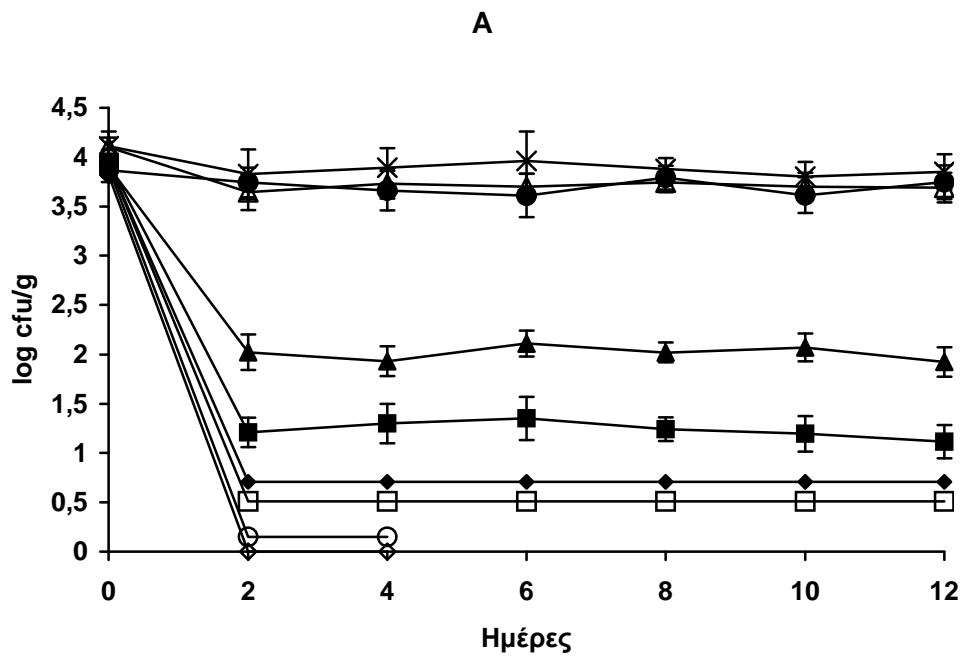
Σχήμα 13. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *S. aureus* (Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-∅-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



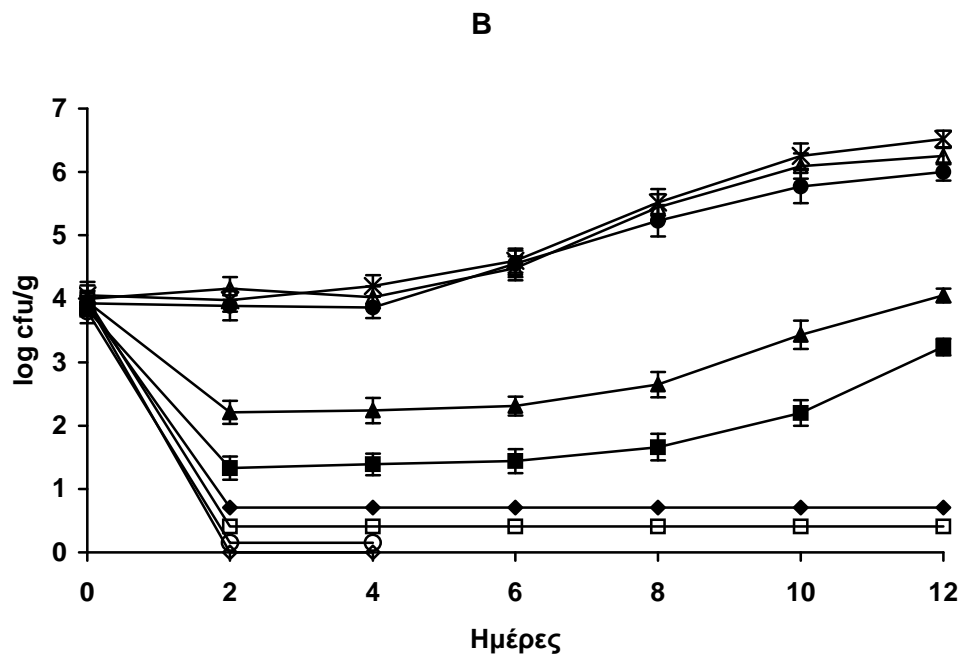
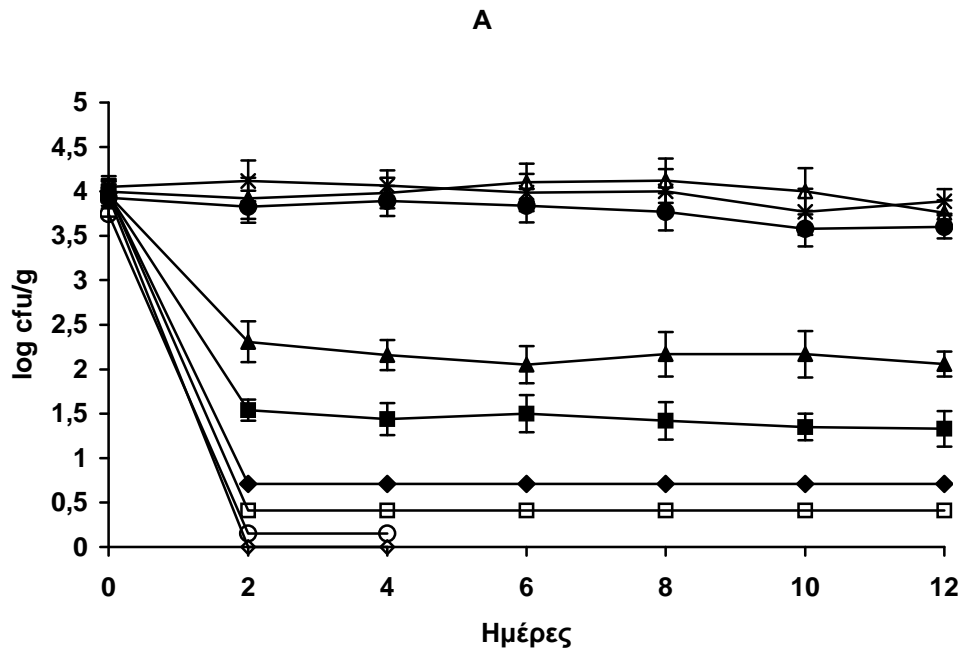
Σχήμα 14. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά μίγματος στελεχών *S. aureus* (Sap-Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



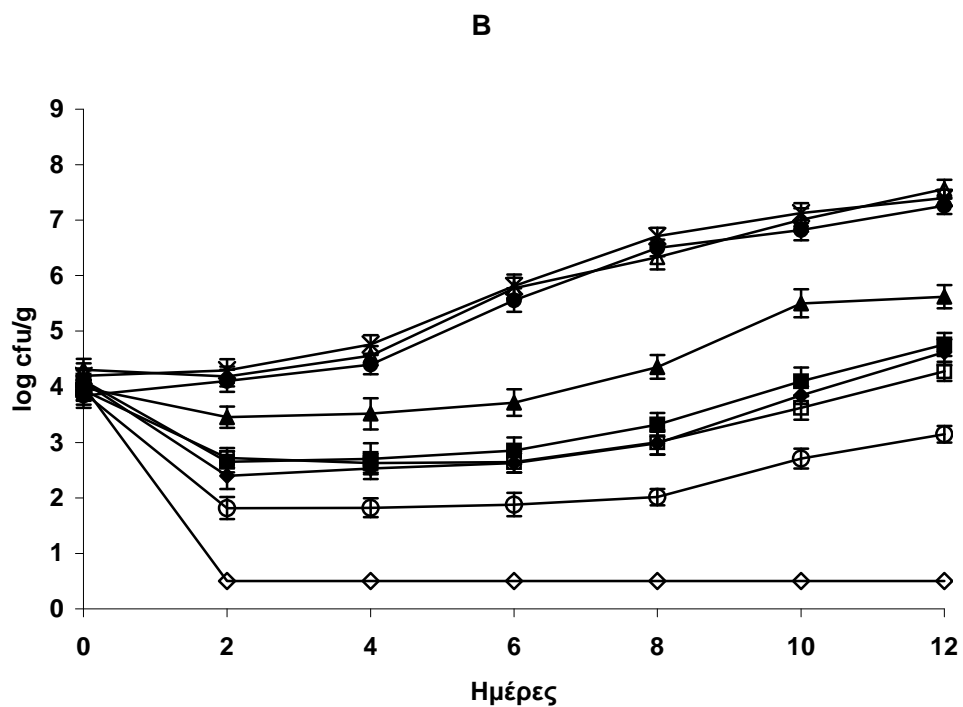
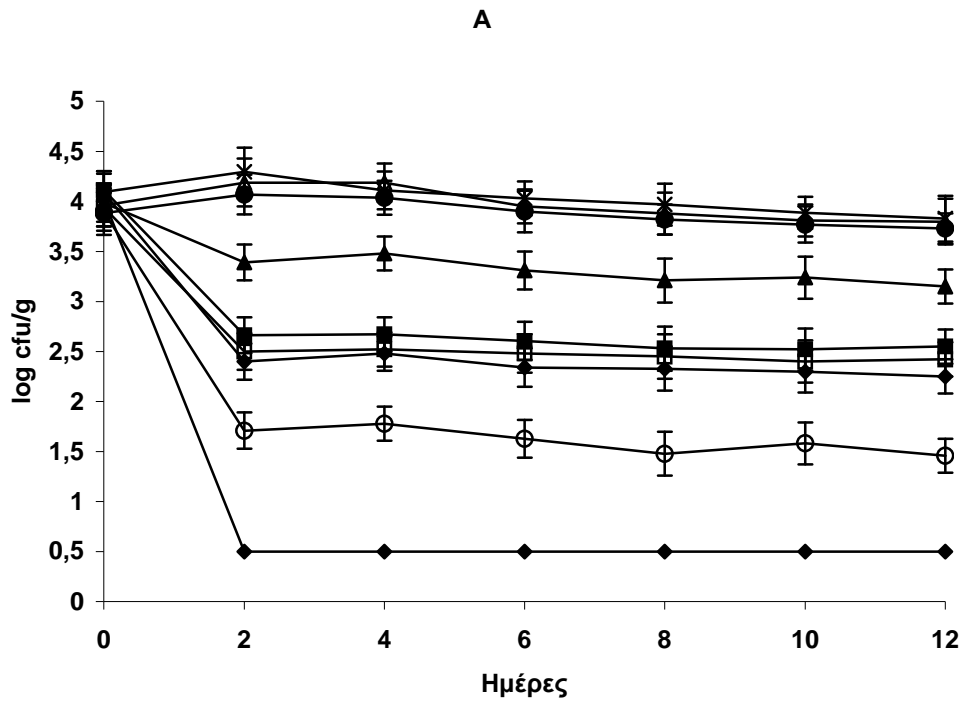
Σχήμα 15. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *S. typhimurium* σε μντωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



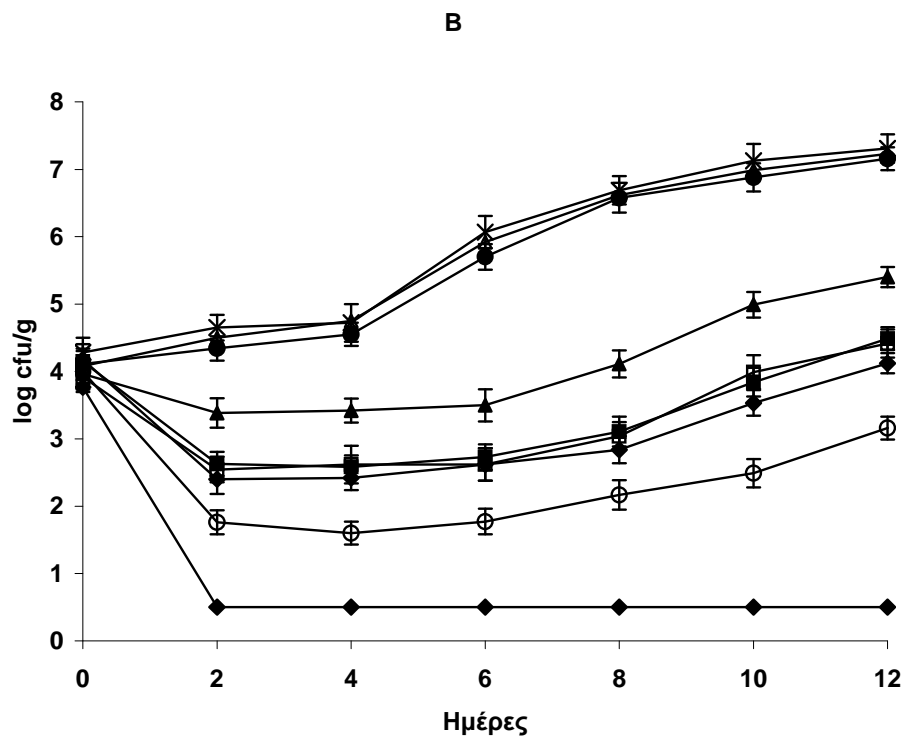
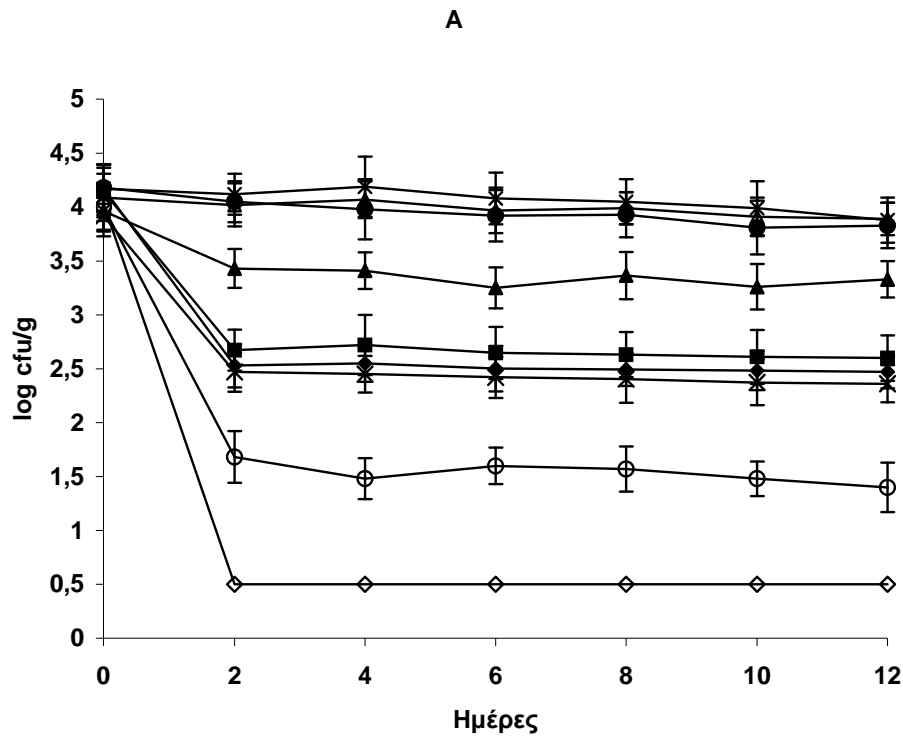
Σχήμα 16. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *S. enteritidis* σε μωττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



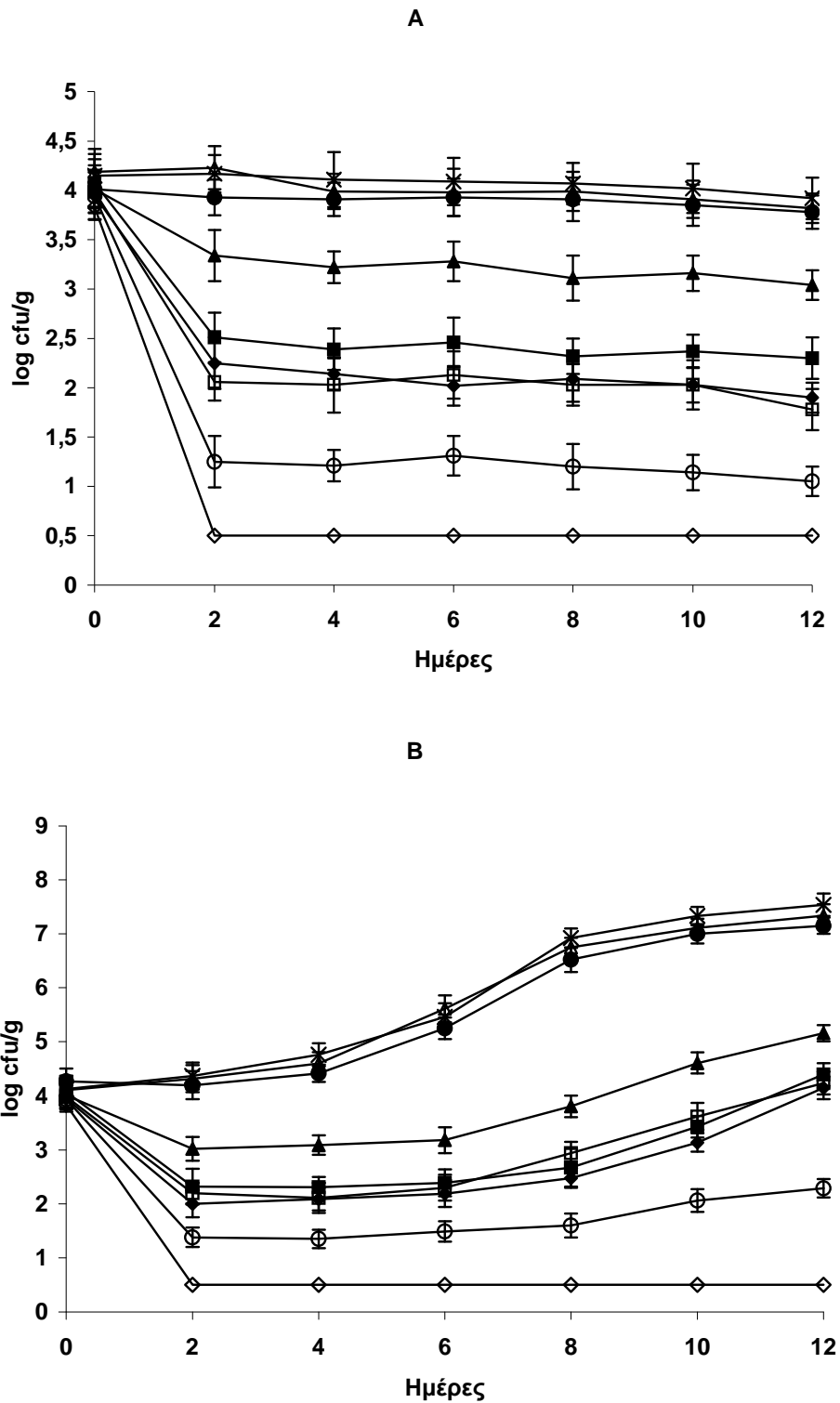
Σχήμα 17. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά μίγματος στελεχών *Salmonella (typhimurium-enteritidis)* σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 18. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *E. coli* O157:H7 EDL 932 σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 19. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *E. coli* O157:H7 EDL 933 σε μπτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 20. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά μίγματος στελεχών *E. coli* O157:H7 (EDL 932-933) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-▲-) ρίγανη 0.6% (v/wt), (■) ρίγανη 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-◆-) ρίγανη 0.6% και νισίνη 1000 IU/g, (-□-) ρίγανη 0.9%, (-○-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 500 IU/g, (-◇-) ρίγανη 0.9% και νισίνη 1000 IU/g.

4.3.5. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού

L. monocytogenes

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους της *L. monocytogenes*, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 21-23 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου μειώθηκαν κατά 1.7-1.9 log cfu/g τη 2^η ημέρα στους 4 και 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.2 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν περίπου τους 3.8 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P < 0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών της *L. monocytogenes*, σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς είτε των μαρτύρων ή της προσθήκης της νισίνης στις 500 ή στις 1000 IU/g καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί του στελέχους Scott A και του μίγματος των στελεχών της *L. monocytogenes* μειώθηκαν κατά 2.5 – 2.7 log cfu/g τη 2^η ημέρα στους 4 και 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης, οι πληθυσμοί τόσο του στελέχους Scott A όσο και του μίγματος των στελεχών αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.2 και 3.9 log cfu/g τη 12^η ημέρα στους 4 °C και 10 °C, αντίστοιχα. Η ανίχνευση του στελέχους Lmk του παθογόνου γινόταν μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 6^η στους 4 °C και την 8^η στους 10 °C ημέρα. Στη συνέχεια οι πληθυσμοί του Lmk αυξήθηκαν και έφτασαν

τους 1.8 και 2.3 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης στους 4 °C και 10 °C, αντίστοιχα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου σε σχέση με τη μεμονωμένη προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) η ανίχνευση του Scott A και του μίγματος των στελεχών ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Στους 10 °C η ανίχνευση του Scott A και του μίγματος των στελεχών ήταν εφικτή μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 6^η και 8^η ημέρα και στη συνέχεια οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 1.5 και 2 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης, αντίστοιχα. Η ανίχνευση του στελέχους Lmk του παθογόνου γινόταν μόνο με εμπλουτισμό για όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων και στις δύο θερμοκρασίες. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς σε σχέση με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g).

S. aureus

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά των στελεχών Sap, Sak και του μίγματός τους του *S. aureus* στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 24-26 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 1.6-1.9 log cfu/g τη 2^η ημέρα τόσο

στους 4 όσο και στους 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P<0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.6 - 4.3 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του *S. aureus* σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης στις δύο συγκεντρώσεις (500 ή 1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 2 – 2.5 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.7, 4 και 4.5 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης για τα στελέχη Sap, Sak και το μίγμα τους, αντίστοιχα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς σε σχέση με εκείνους από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g).

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί για το στέλεχος Sak και το μίγμα στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν κατά 2.5 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί του στελέχους Sak και του μίγματος των στελεχών αναπτύχθηκαν και

έφτασαν τους 3-3.2 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Το στέλεχος Sap του παθογόνου ανιχνευόταν μόνο με εμπλουτισμό μέχρι την 4^η ημέρα στους 4 °C και την 8^η ημέρα στους 10 °C. Στη συνέχεια δεν ανιχνευόταν ούτε με εμπλουτισμό μέχρι το τέλος της συντήρησης και στις 2 θερμοκρασίες. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με εκείνους από την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) και στις δύο θερμοκρασίες καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Salmonella

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά των στελεχών *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C παρουσιάζεται στα σχήματα 27-29 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν κατά 0.6, 1.2 και 0.5 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες, αντίστοιχα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του μικροοργανισμού δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C οι πληθυσμοί όλων των στελεχών αυξήθηκαν και έφτασαν τους 5-5.3 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών της *Salmonella* σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματός τους μειώθηκαν κατά 1, 2, 1.2 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *Salmonella* παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματός τους αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4.3, 4.1, 4.5 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης, αντίστοιχα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g).

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματός τους μειώθηκαν κατά 1.7, 2.7 και 1.7 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματός τους αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 3.6, 3.7 και 4 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g).

***E. coli* O157:H7**

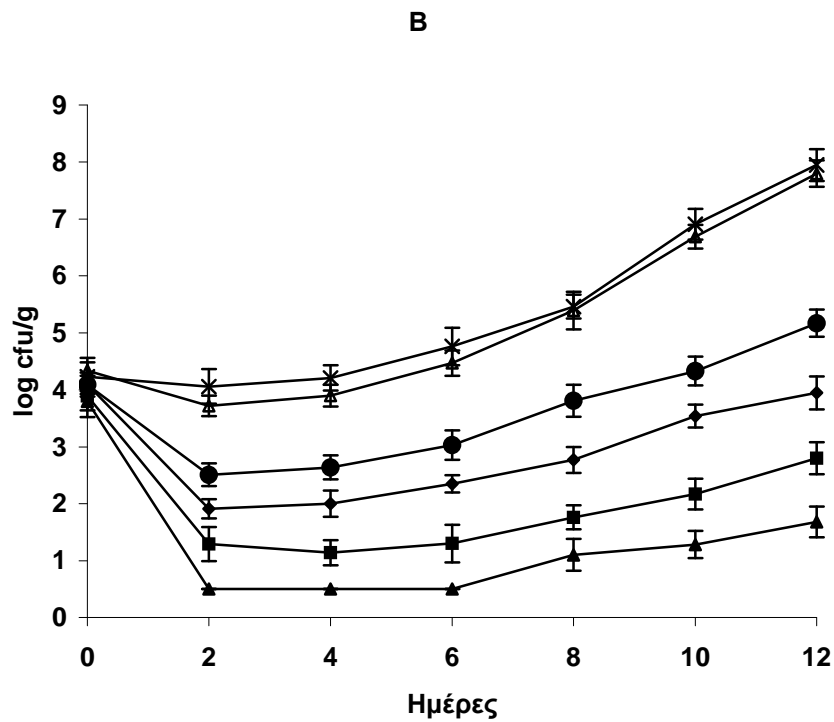
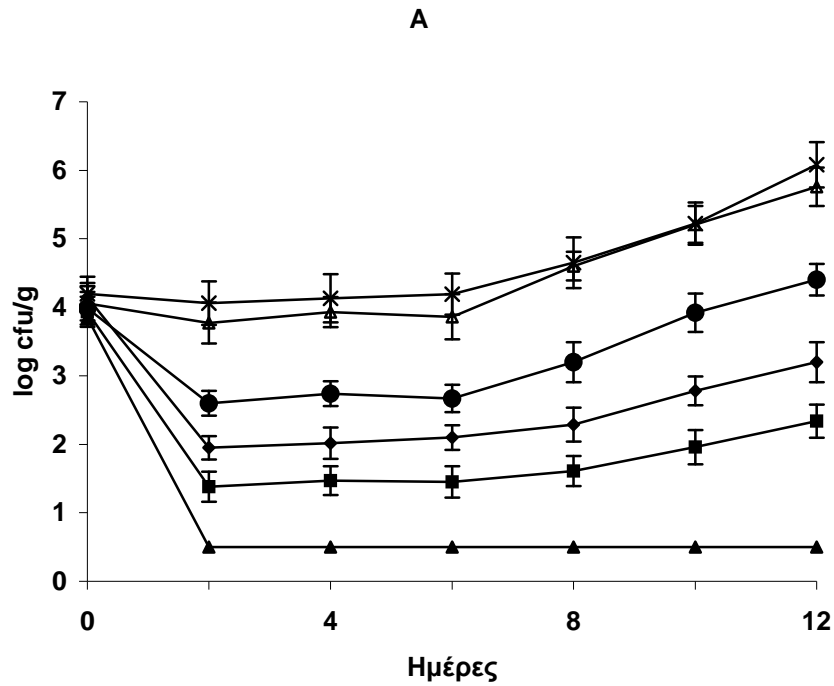
Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου κατά των στελεχών EDL 932 και EDL 933 της *E. coli* O157:H7, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου

κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 22-24 αντίστοιχα.

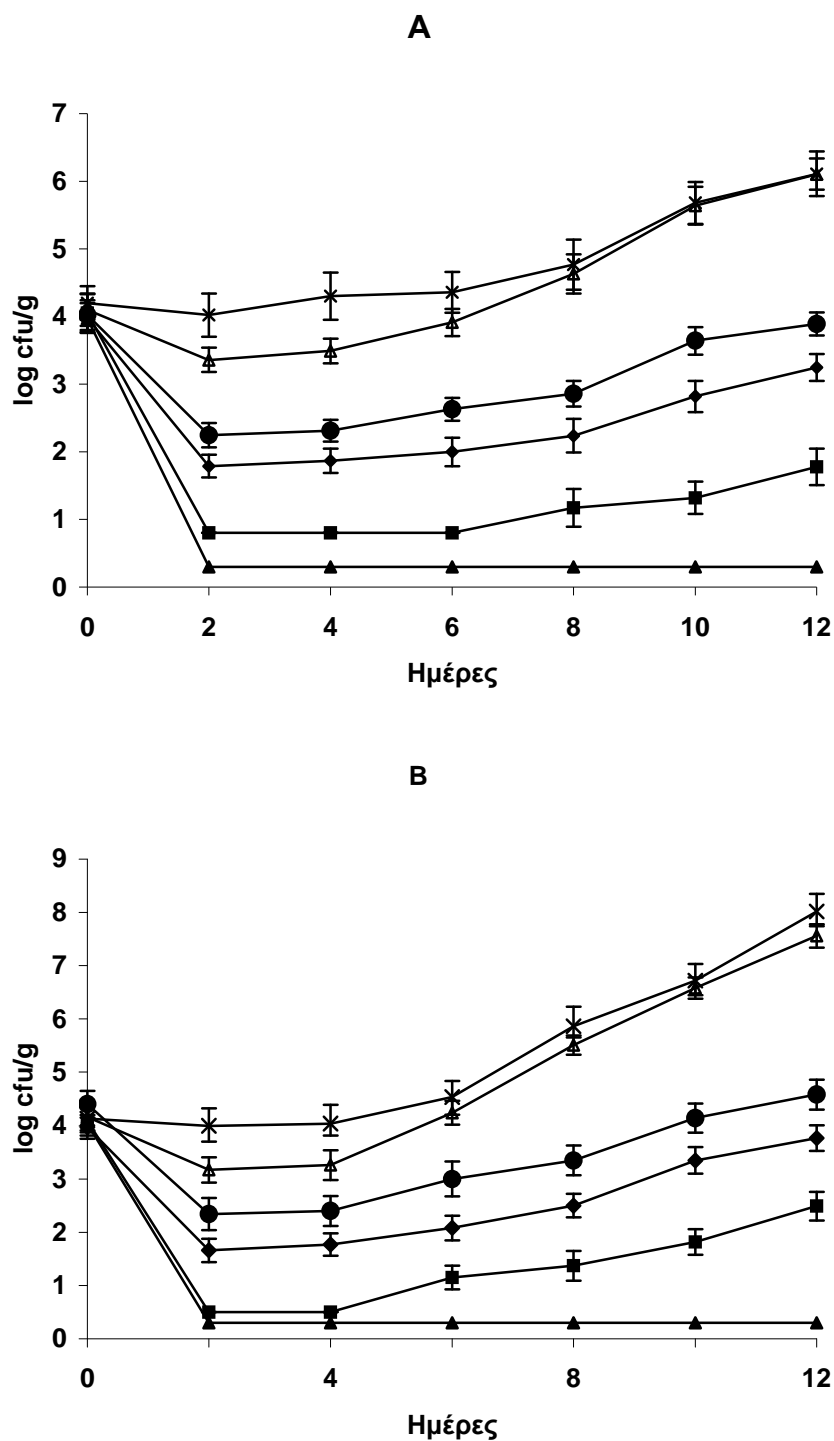
Η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού σε συγκέντρωση 0.6% παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων ή με την προσθήκη της νισίνης (500 ή 1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C. Αντίθετα στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4.8 log cfu/g την 12^η ημέρα, παραμένοντας όμως σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων ή από την προσθήκη της νισίνης (500 ή 1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 μειώθηκαν κατά 2.9 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν περίπου τους 4.1 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς σε σχέση με τη μεμονωμένη προσθήκη του αιθέριου ελαίου(0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης.

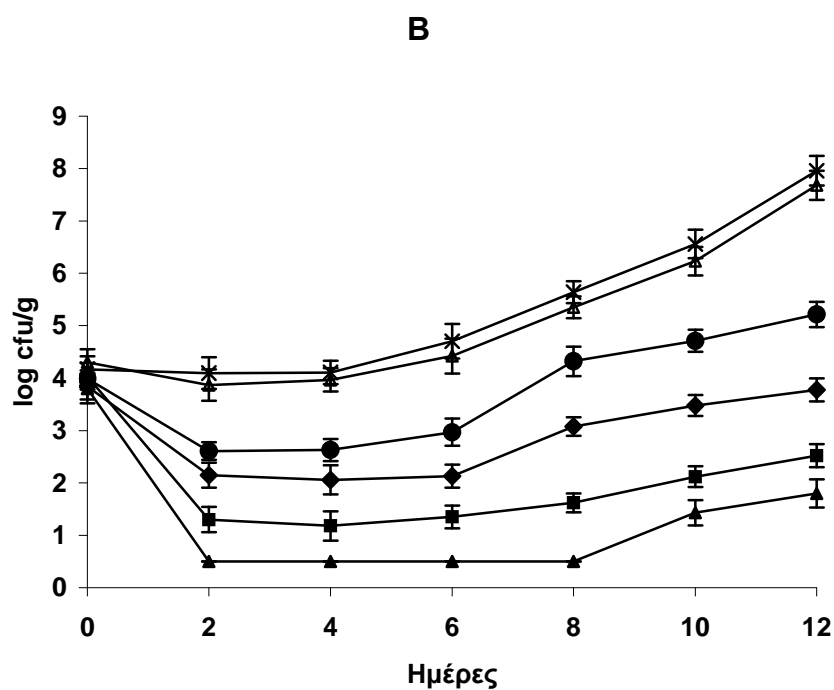
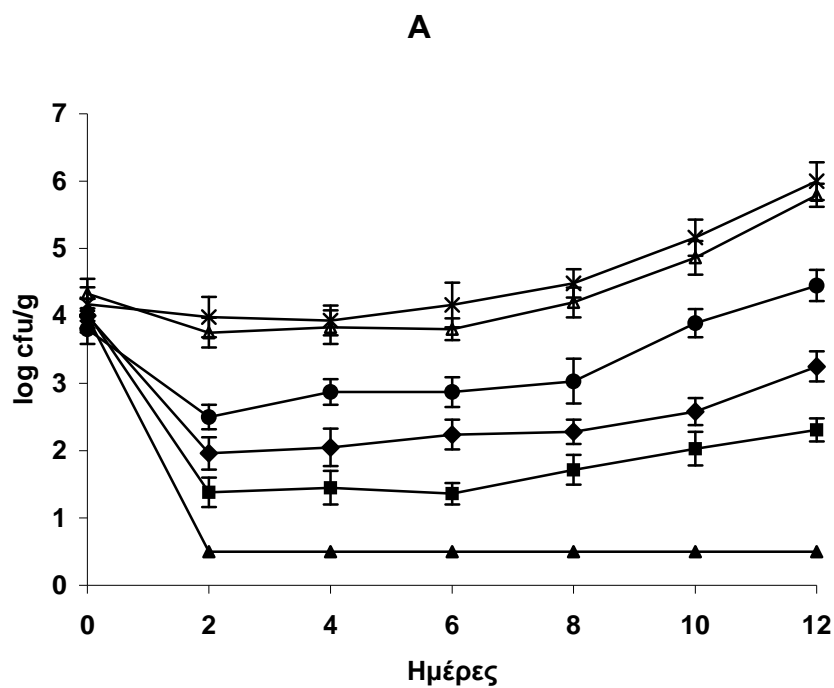
Ο συνδυασμός του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g).



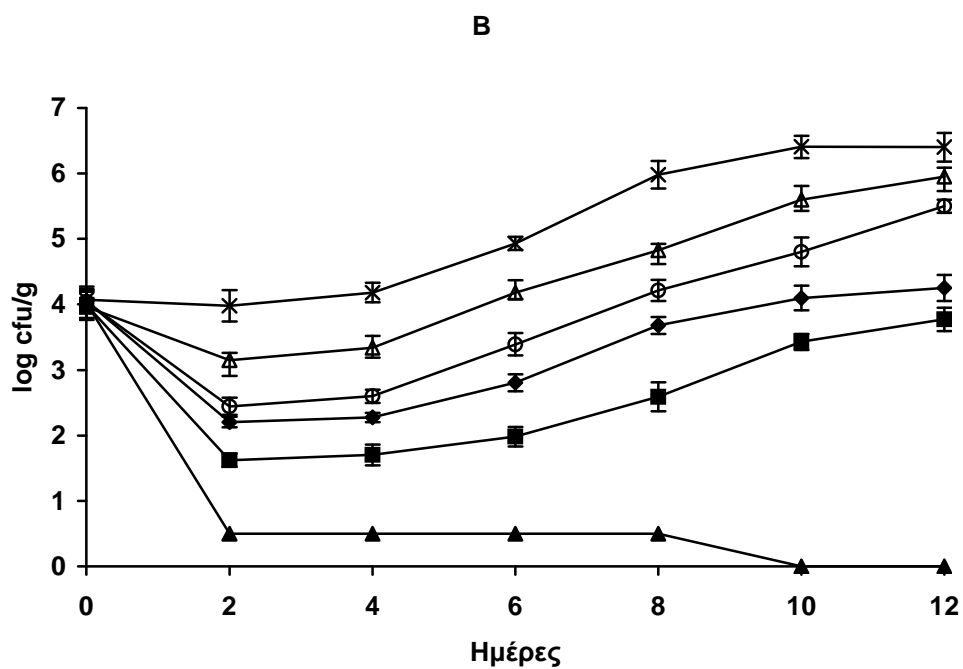
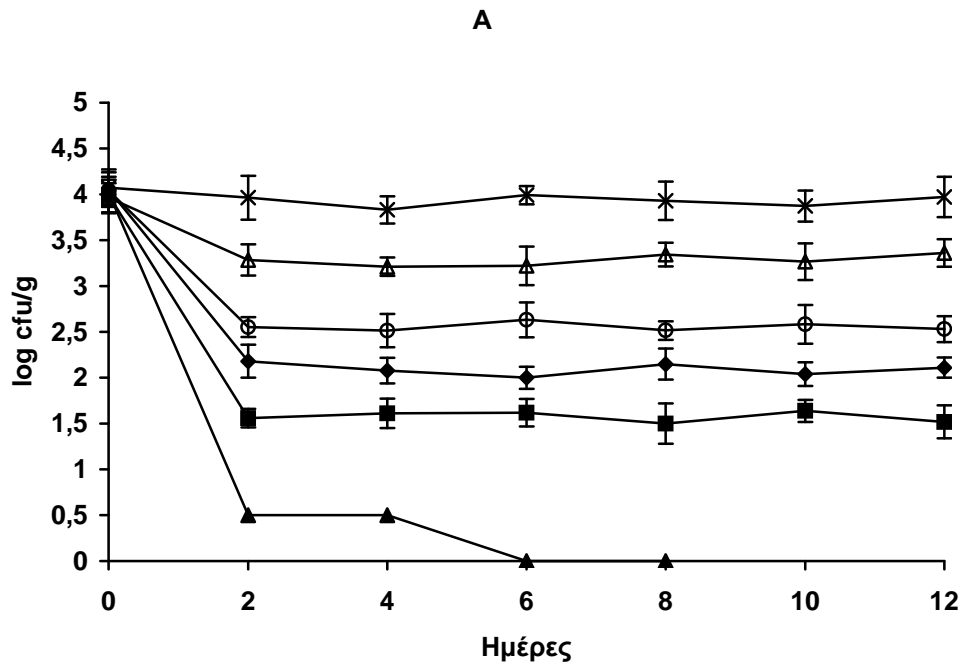
Σχήμα 21. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *L. monocytogenes* (Scott A) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



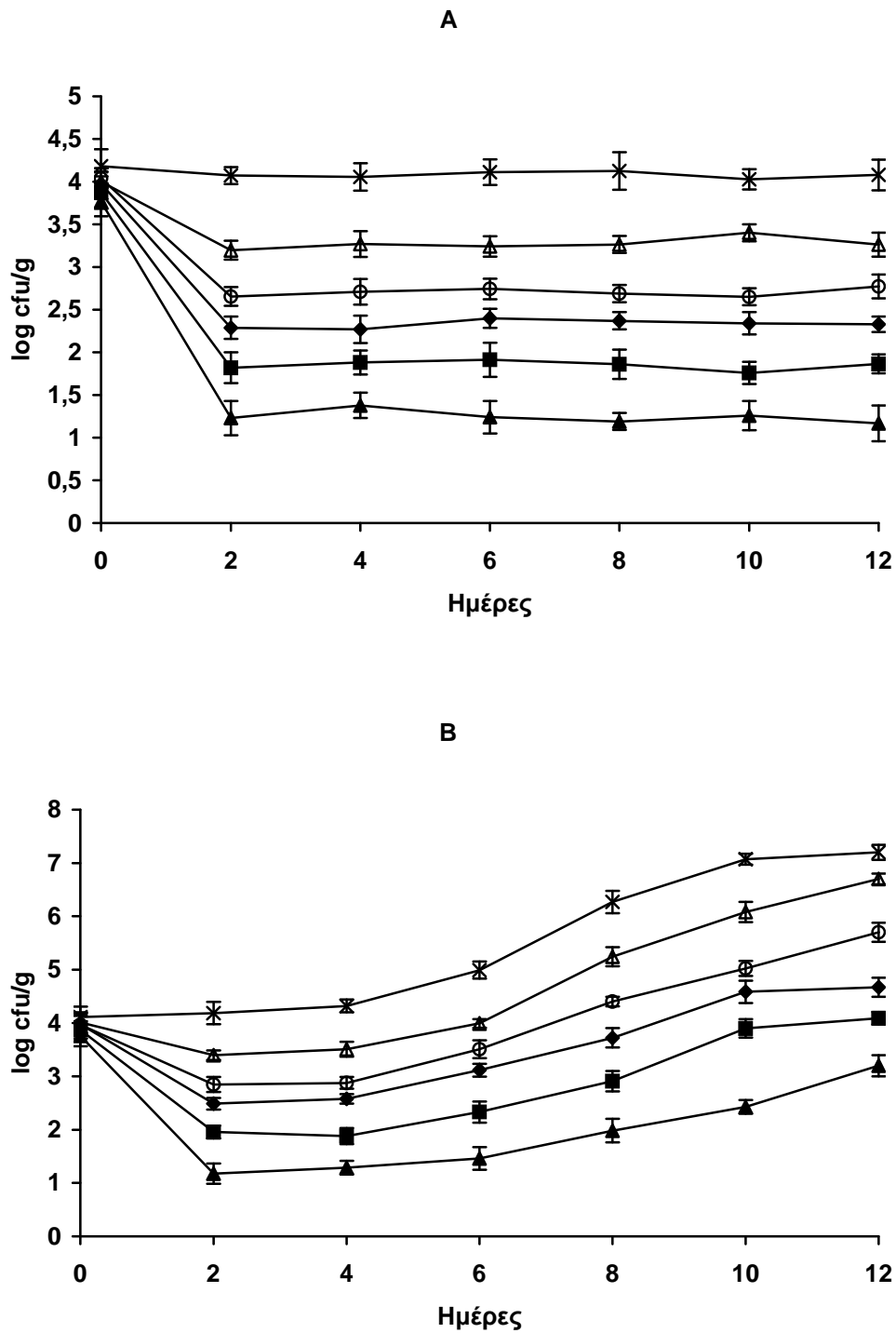
Σχήμα 22. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *L. monocytogenes* (Lmk) σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



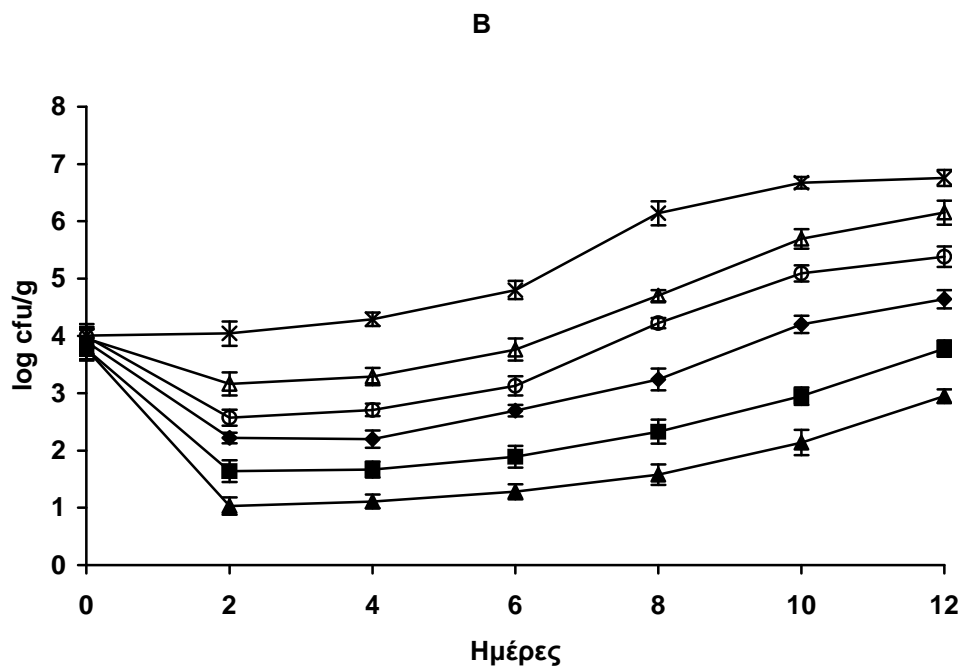
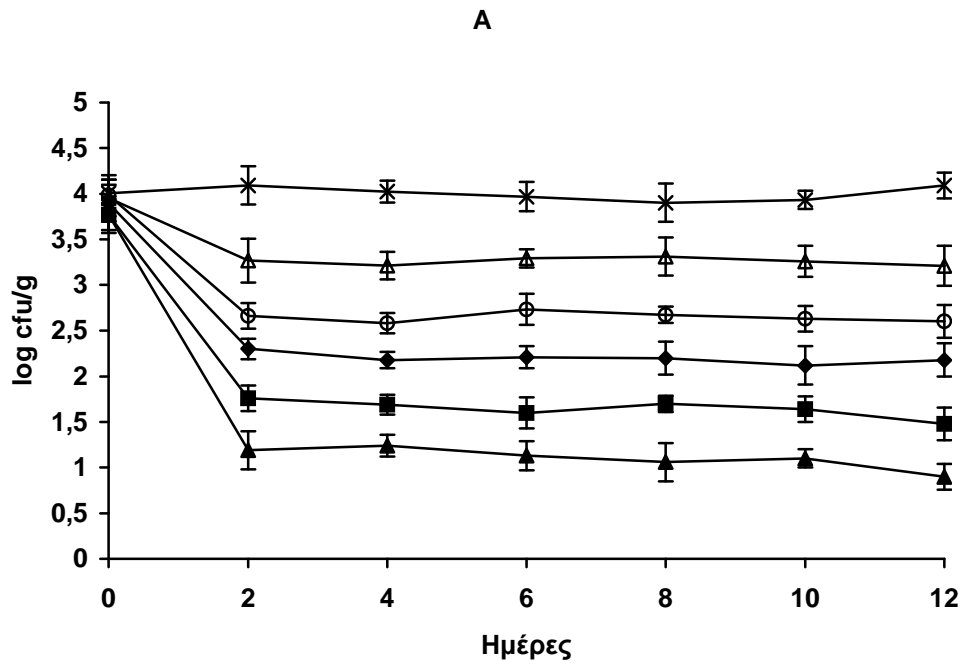
Σχήμα 23. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά μίγματος στελεχών *L. monocytogenes* (Scott A-Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



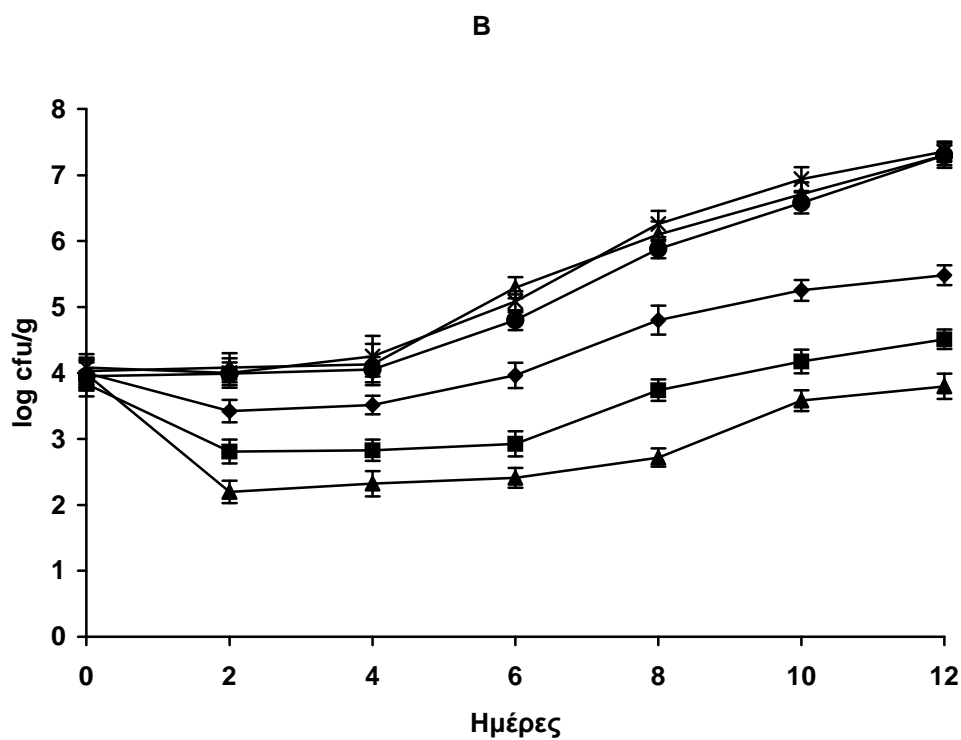
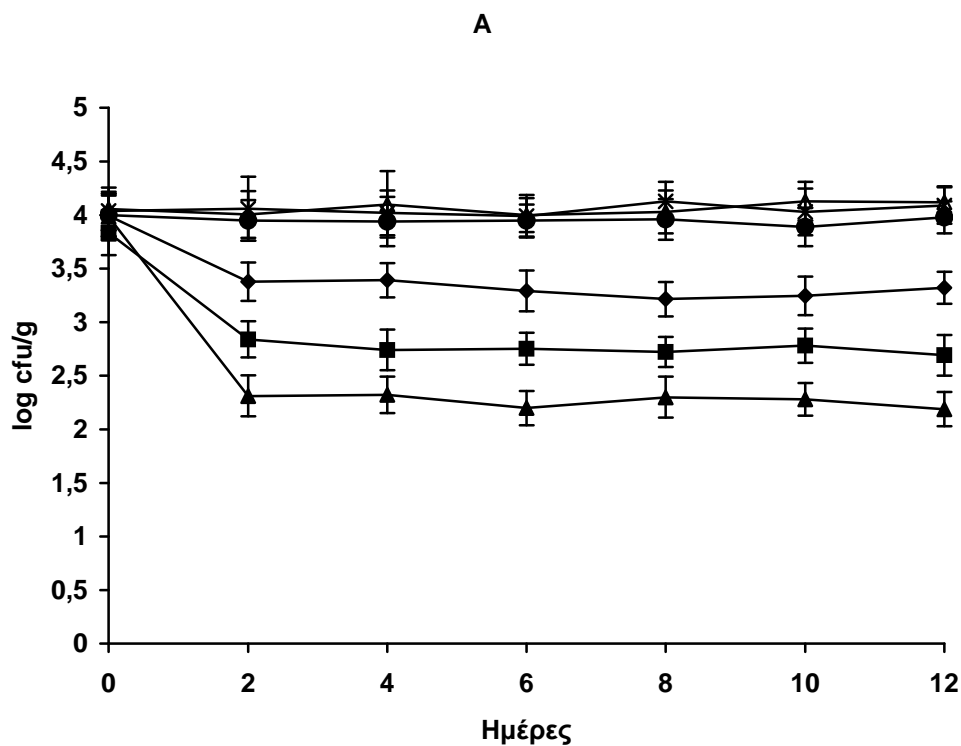
Σχήμα 24. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *S. aureus* (Sap) σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



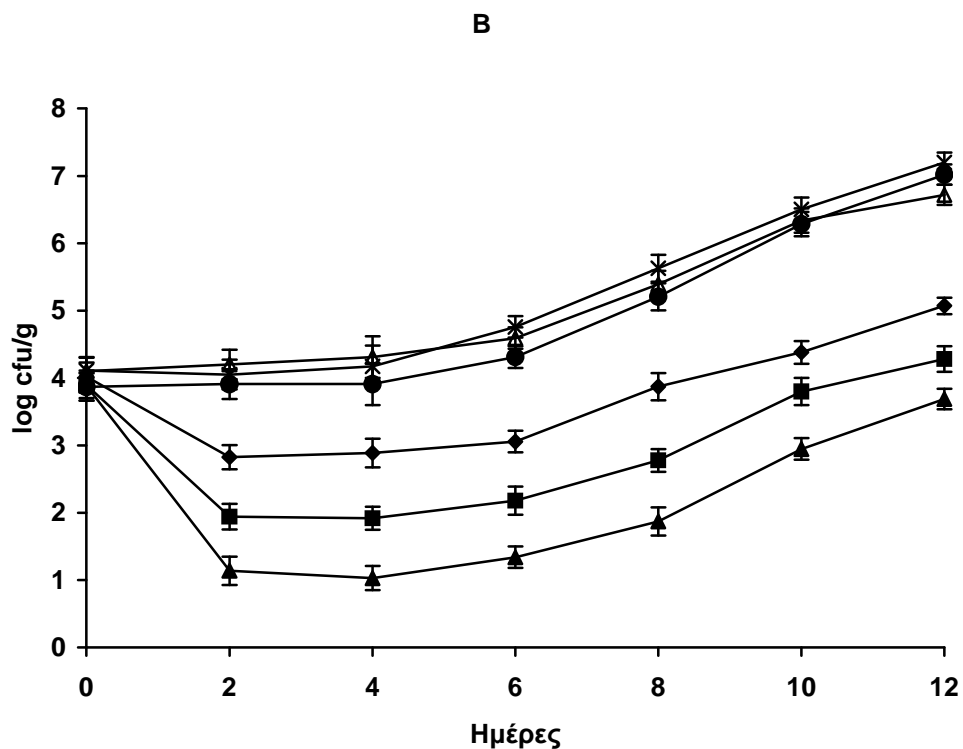
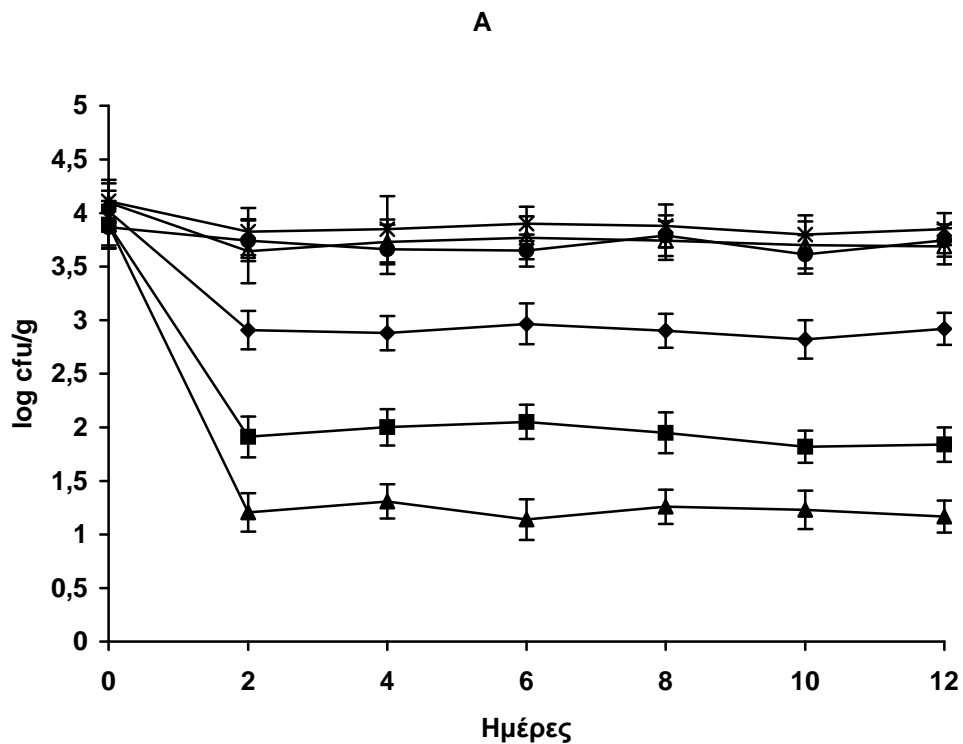
Σχήμα 25. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *S. aureus* (Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-♦-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



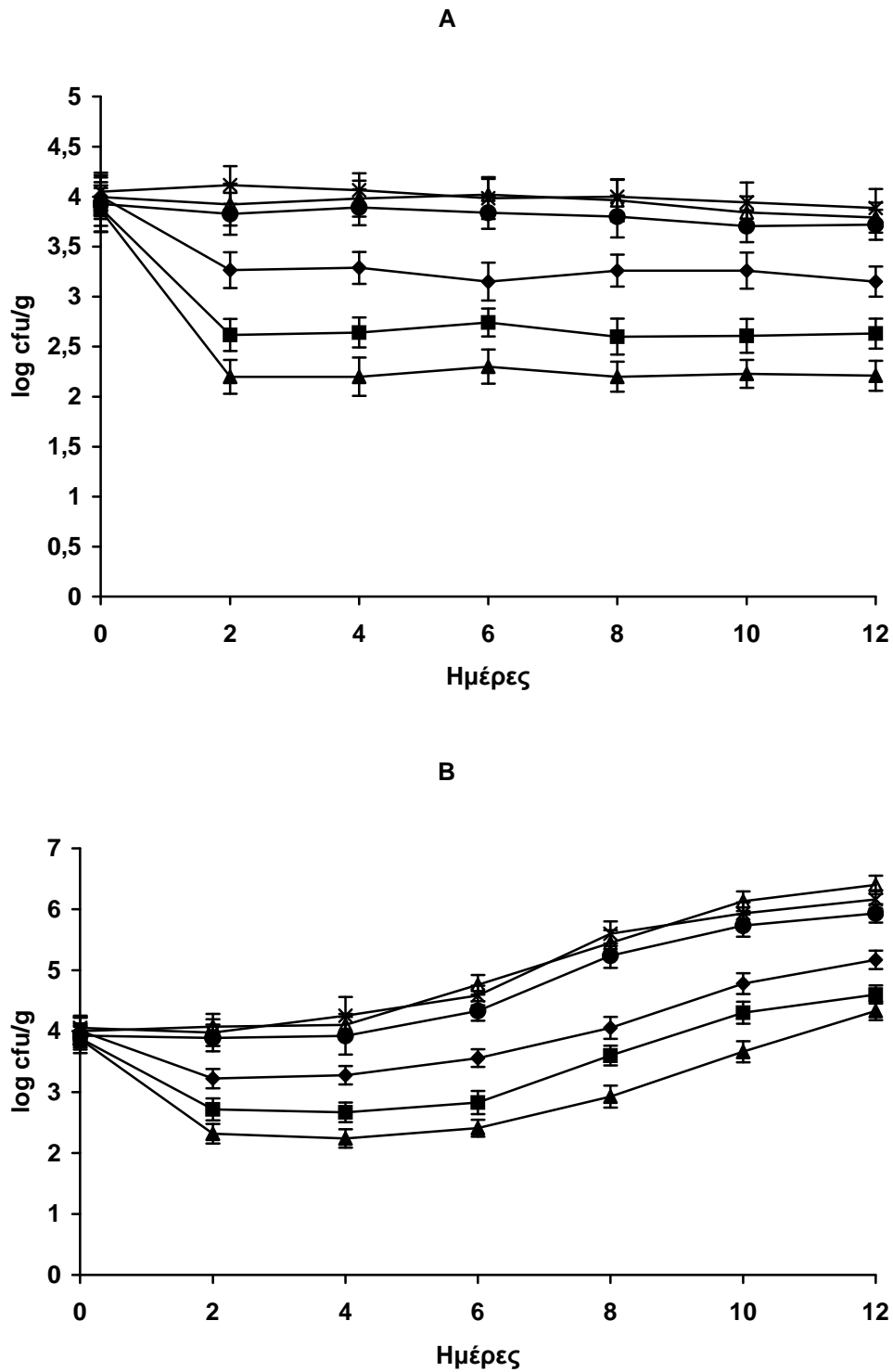
Σχήμα 26. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά μίγματος στελεχών *S. aureus* (Sap-Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-o-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



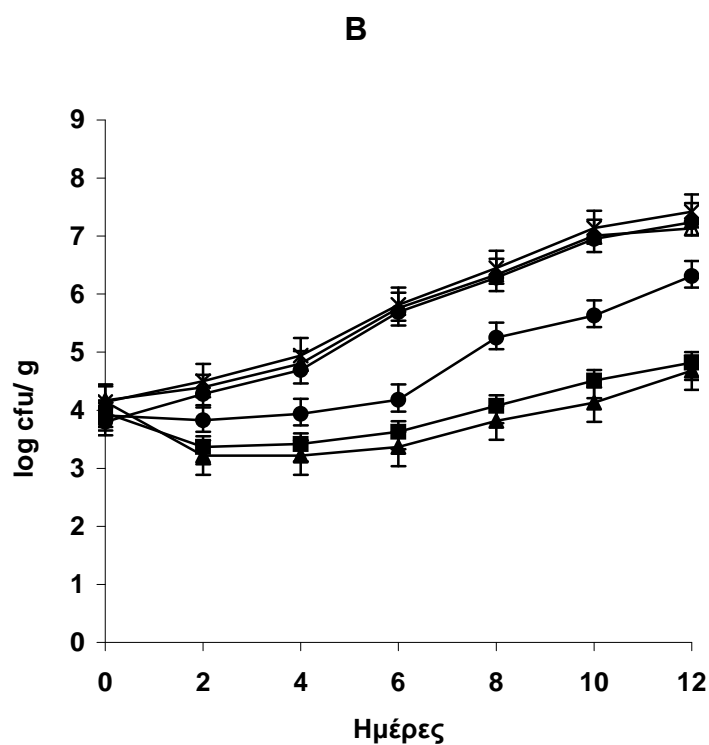
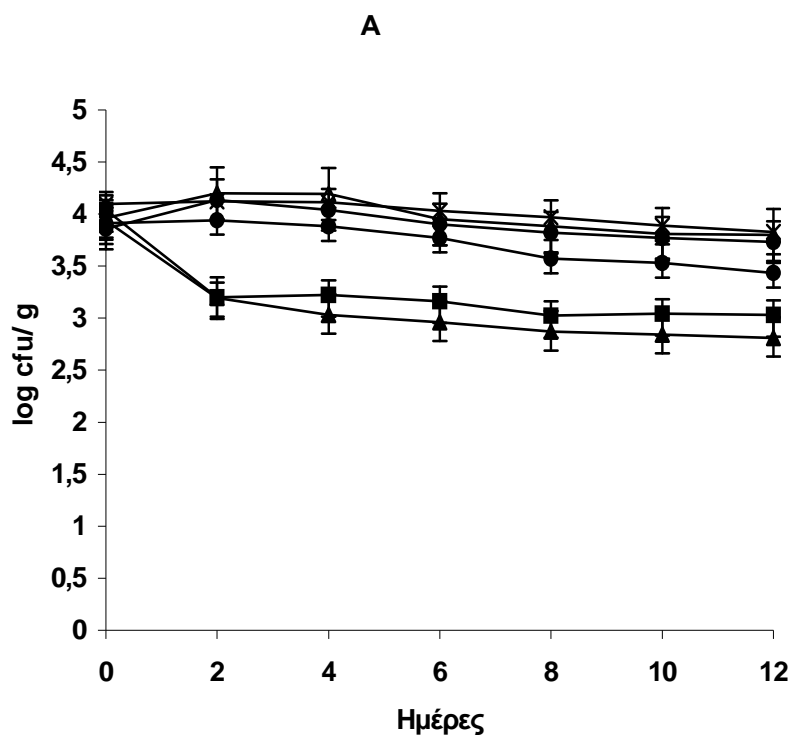
Σχήμα 27. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *S. typhimurium* σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-♦-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



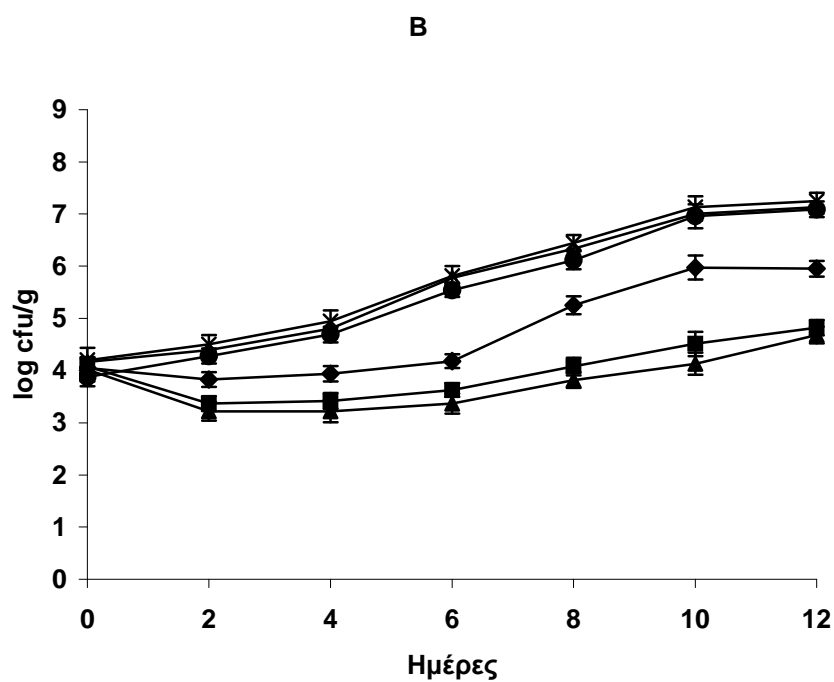
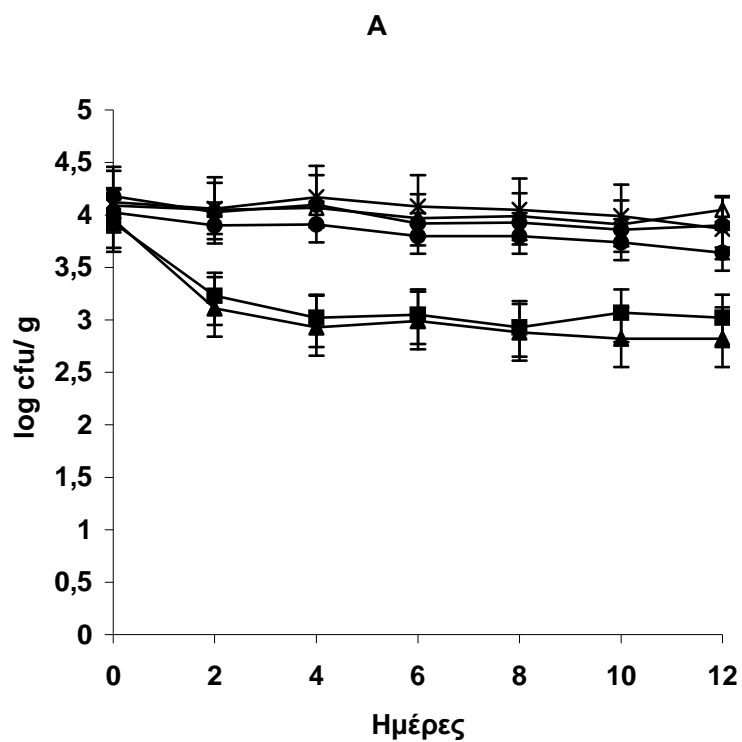
Σχήμα 28. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *S. enteritidis* σε μπτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



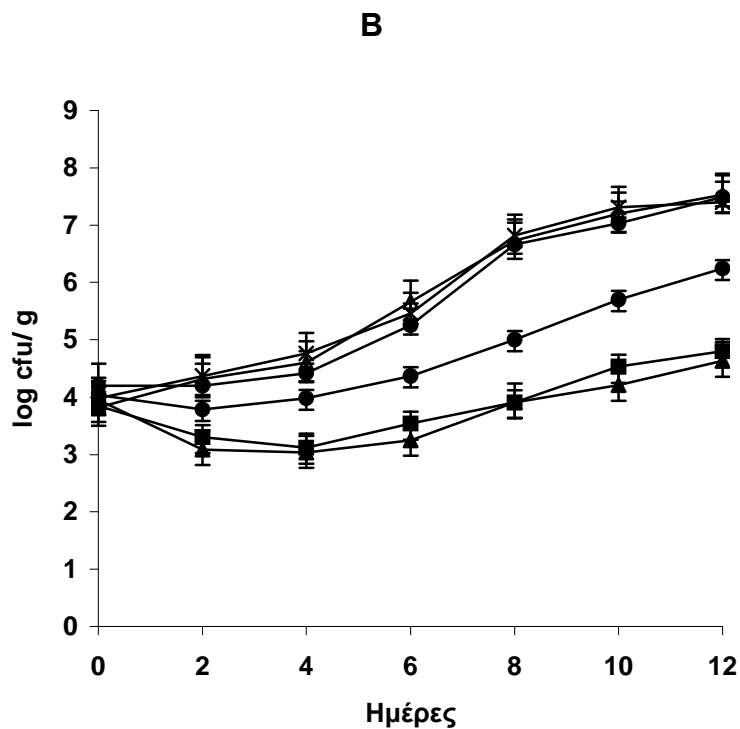
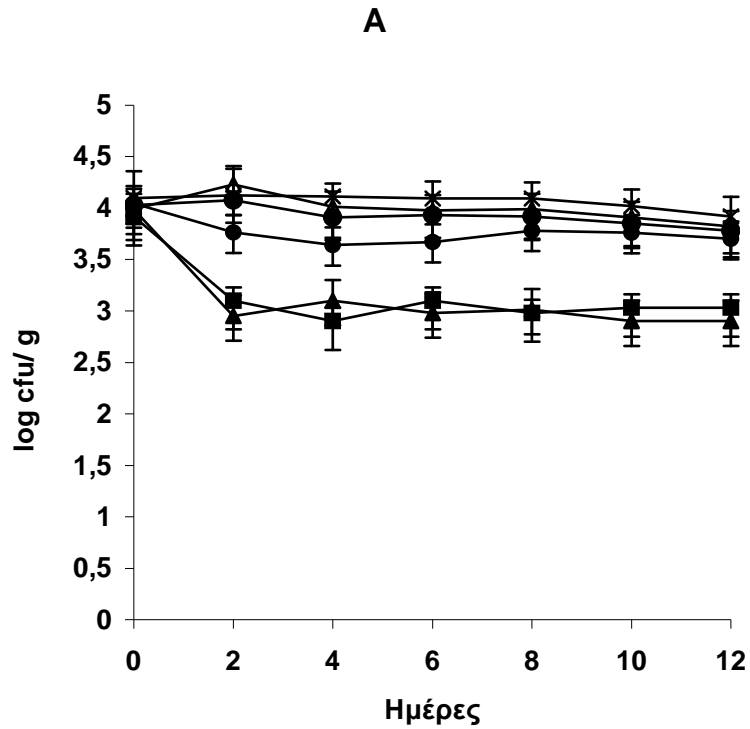
Σχήμα 29. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά μίγματος στελεχών *Salmonella (typhimurium-enteritidis)* σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 30. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *E. coli* O157:H7 EDL 932 σε μυτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 31. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά *E. coli* O157:H7 EDL 933 σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 32. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά μίγματος στελεχών *E. coli* O157:H7 (EDL 932-933) σε μπττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) θυμάρι 0.6% (v/wt), (-■-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) θυμάρι 0.6% και νισίνη 1000 IU/g

4.3.6. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου

L. monocytogenes

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους της *L. monocytogenes*, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 33-35 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου μειώθηκαν κατά 0.5 – 0.7 log cfu/g την 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4.6 – 5 και 5.7 - 5.9 log cfu/g τη 12^η ημέρα στους 4 και 10 °C, αντίστοιχα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου, τόσο από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων, όσο και από την προσθήκη της νισίνης (500 IU/g), ενώ δεν είχαν σημαντική διαφορά ($P>0.05$) συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους πληθυσμούς από την προσθήκης της νισίνης (1000 IU/g).

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) και της νισίνης (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* μειώθηκαν κατά 1.3 – 1.5 log cfu/g την 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους αυξήθηκαν και έφτασαν τους 3.9, 4.4 και 4.6 log cfu/g την 12^η ημέρα, αντίστοιχα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4.7-5.2 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών

του παθογόνου, οι οποίοι ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων και από τη μεμονωμένη προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) και της νισίνης (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *L. monocytogenes*, οι οποίοι δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g), καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

S. aureus

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά των στελεχών Sap, Sak και του μίγματός τους του *S. aureus* στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 36-38 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν κατά 0.6-0.8 log cfu/g τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών αυτών δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 5.5 – 5.9 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του παθογόνου, οι οποίοι παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων ($P<0.05$), δε διέφεραν ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους της προσθήκης της νισίνης (500 IU/g) και ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους της προσθήκης της νισίνης (1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν κατά $1 - 1.5 \log \text{ cfu/g}$ τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους $4.8 - 5.2 \log \text{ cfu/g}$ στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του *S. aureus*, οι οποίοι ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του *S. aureus*, οι οποίοι δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C,.

***E. coli* O157:H7**

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου κατά των στελεχών EDL 932 και EDL 933 της *E. coli* O157:H7, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 39-41 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου δε μεταβλήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους $7.1 - 7.5 \log \text{ cfu/g}$ στο τέλος της

συντήρησης. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου οι οποίοι δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους των μαρτύρων και της προσθήκης της νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C. Αντίθετα στους 10 °C, η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου, οι οποίοι παρέμειναν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων και της προσθήκης της νισίνης (500 και 1000 IU/g) από την 4^η ημέρα και μέχρι το τέλος της συντήρησης.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 ή 1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του αιθέριου ελαίου (0.6%) καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 και 10 °C.

Salmonella

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά των στελεχών *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 42-44 αντίστοιχα.

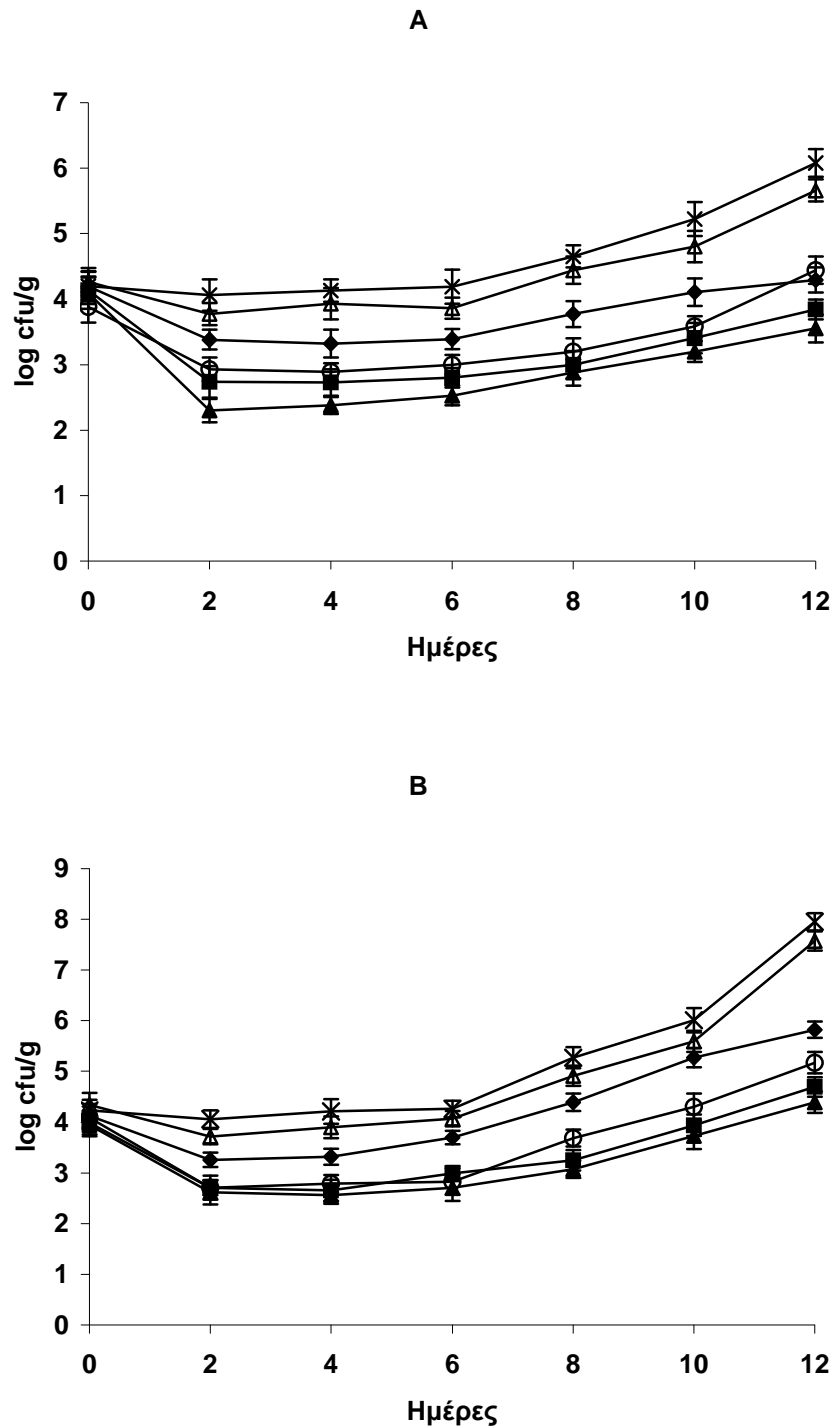
Με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών μειώθηκαν κατά 0.8 και 0.6 log cfu την 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες, αντίστοιχα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$) μέχρι τη 12^η ημέρα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 6 και 5.8 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης, αντίστοιχα. Η προσθήκη του αιθέριου

ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών, οι οποίοι ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων και της προσθήκης της νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C. Αντίθετα η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς της *S. typhimurium* που δε διέφεραν ($P > 0.05$) τόσο από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων και της προσθήκης της νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στις 2 θερμοκρασίες.

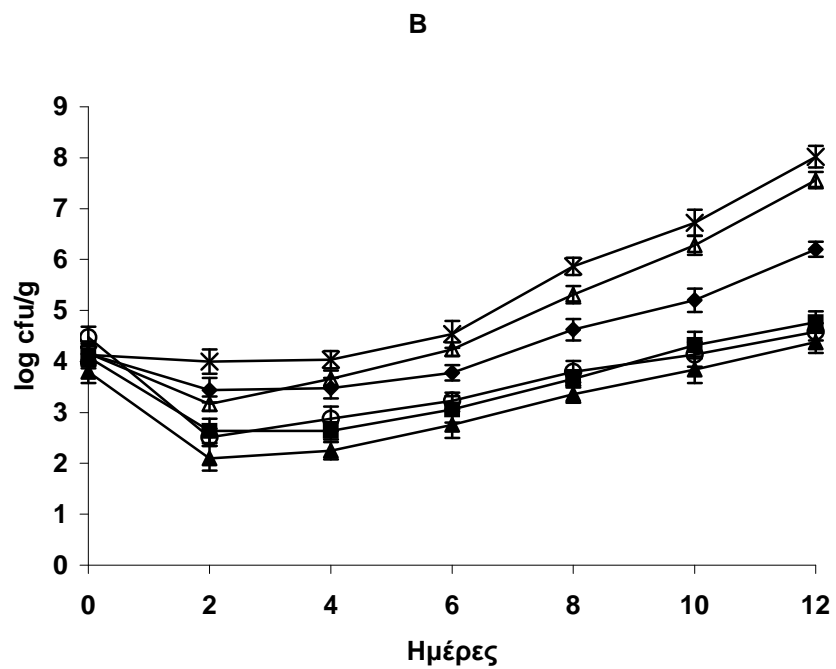
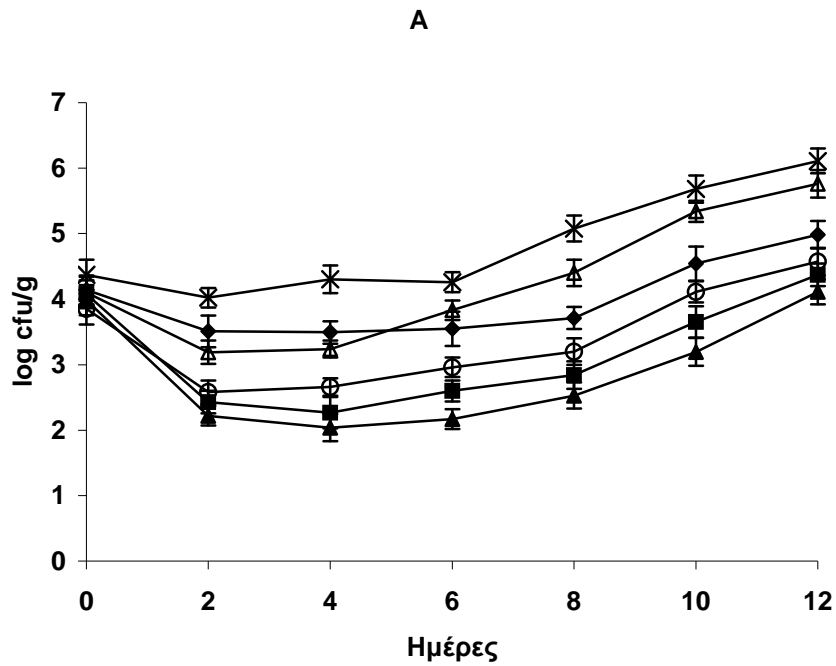
Με την προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών μειώθηκαν κατά 1-1.4 log cfu την 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P > 0.05$) μέχρι τη 12^η ημέρα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 5.3-5.7 στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g παρουσίασε πληθυσμούς της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών σημαντικά χαμηλότερους ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης είτε του αιθέριου ελαίου (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g παρουσίασε πληθυσμούς της *S. typhimurium*, οι οποίοι δε διέφεραν ($P > 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του αιθέριου ελαίου (0.6%) καθ' όλη τη συντήρηση στους 4 και 10 °C.

Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *Salmonella* που δε διέφεραν από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου

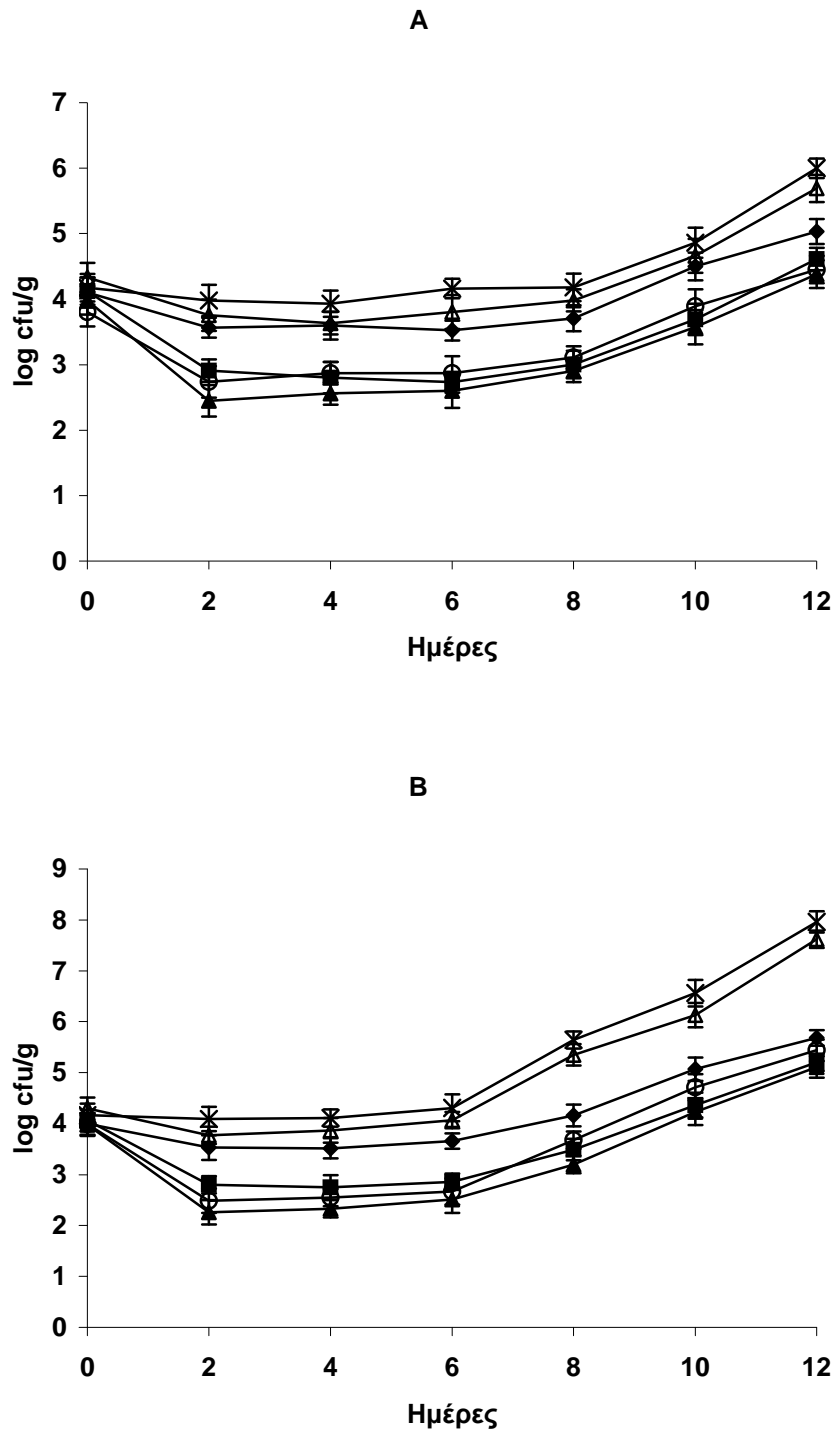
ελαίου (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στις 2 θερμοκρασίες.



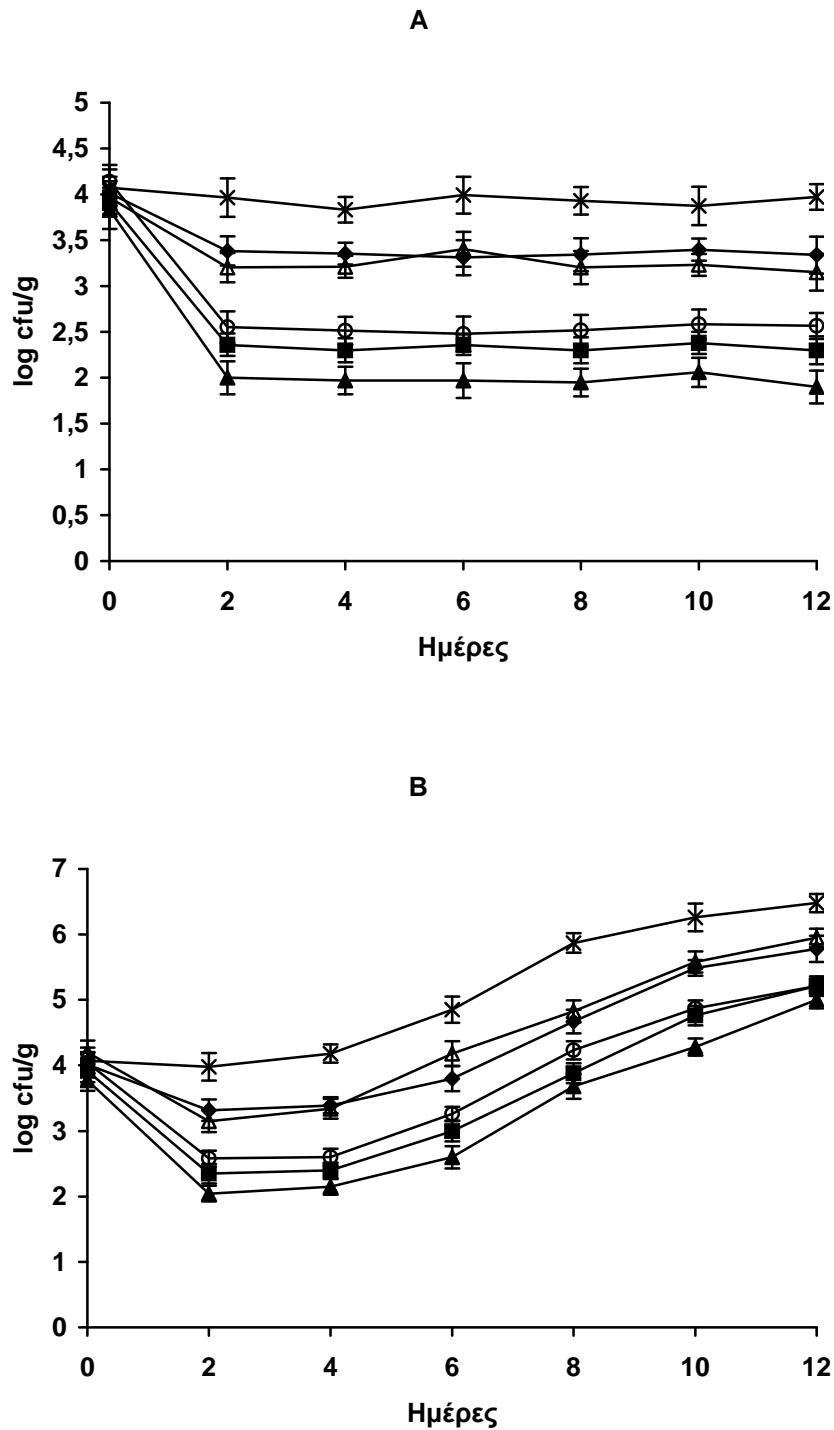
Σχήμα 33. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *L. monocytogenes* (Scott A) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



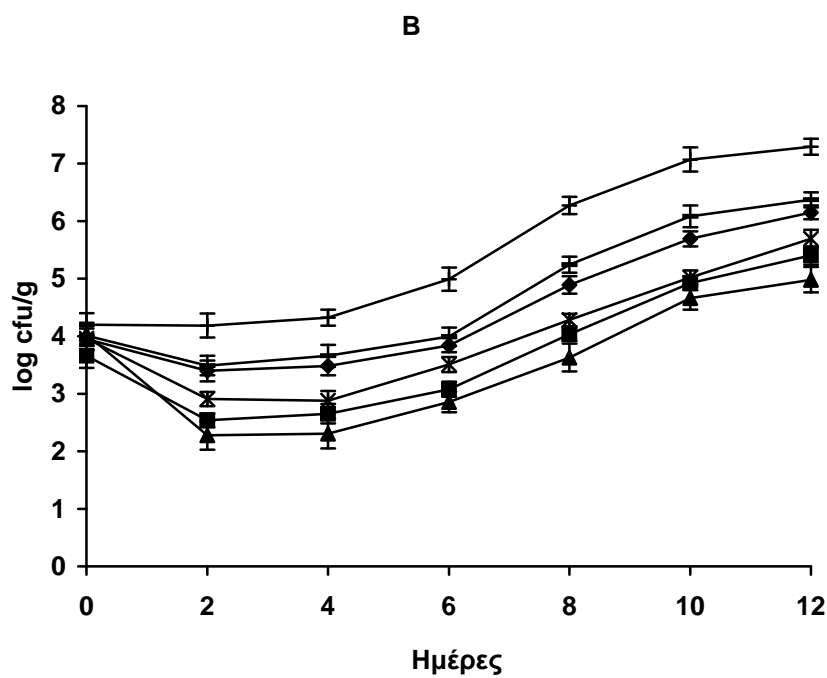
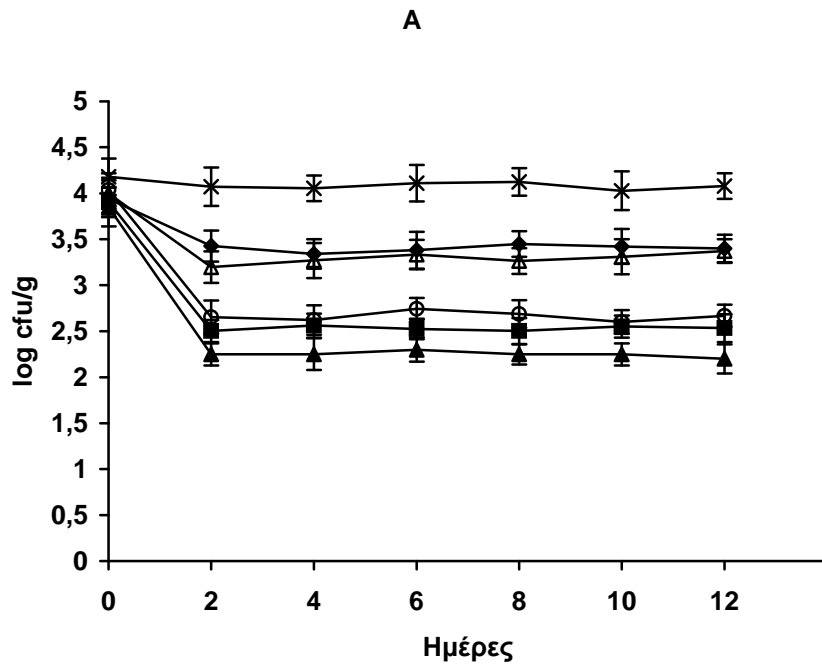
Σχήμα 34. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *L. monocytogenes* (Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-o-) νισίνη 1000 IU/g, (-♦-) δενδρολίβανο (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



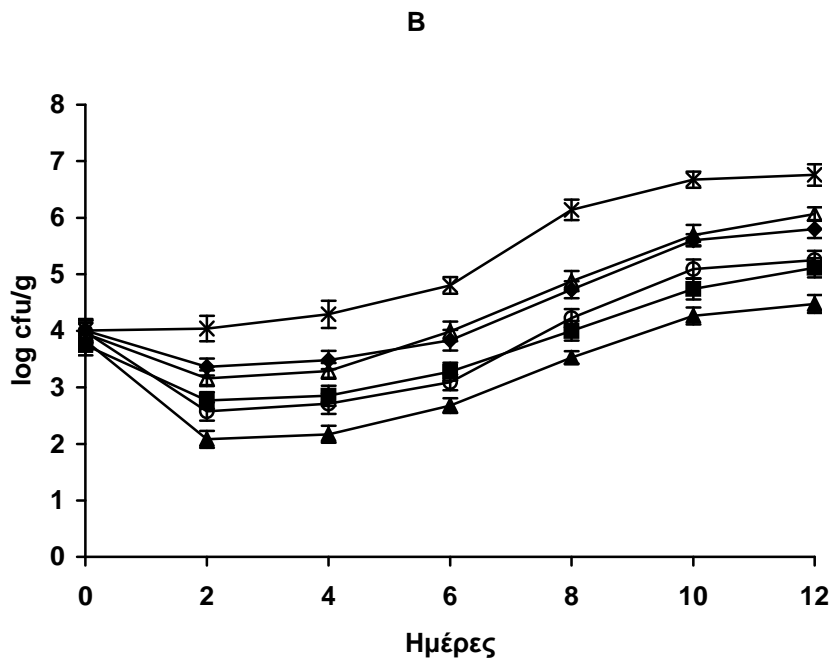
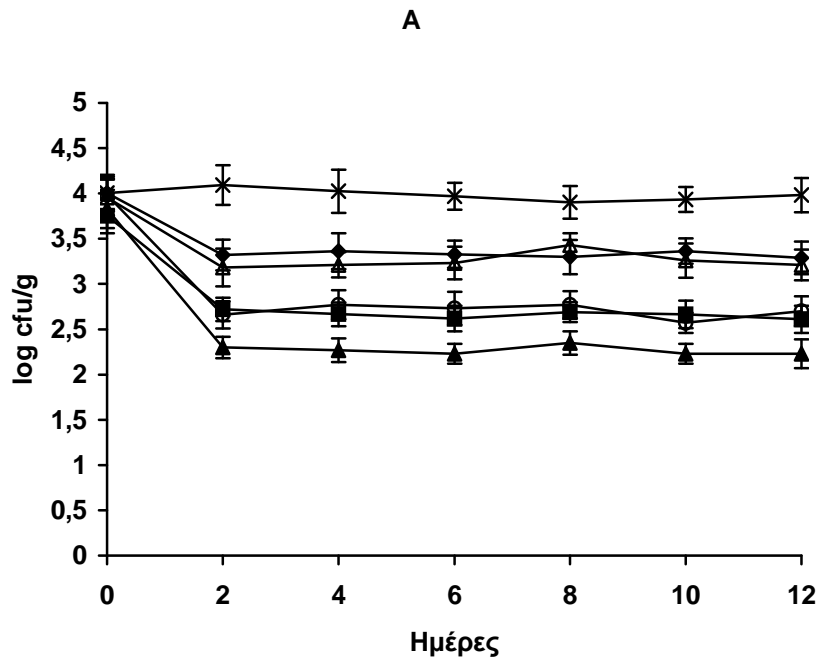
Σχήμα 35. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά μίγματος στελεχών *L. monocytogenes* (Scott A-Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



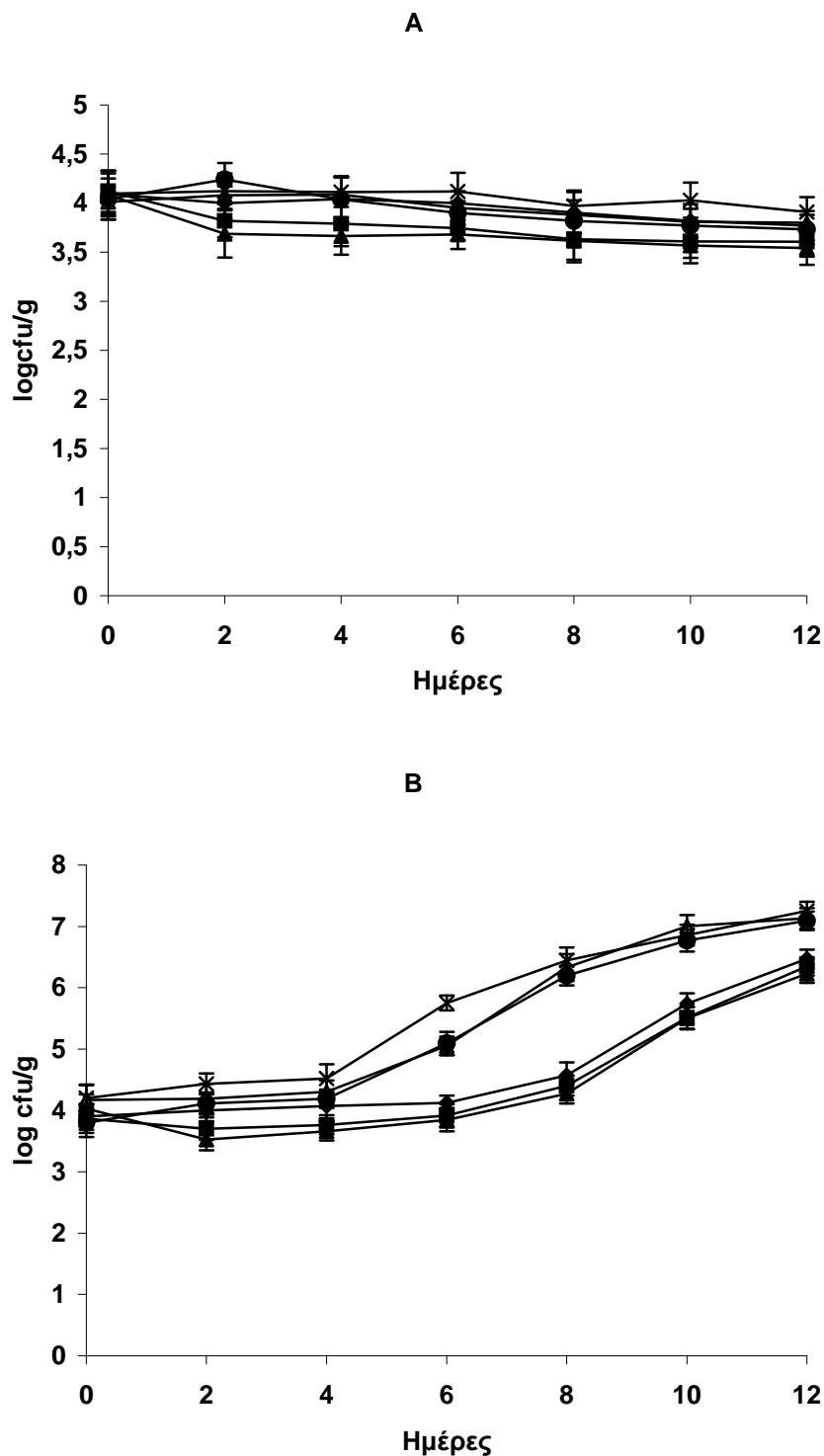
Σχήμα 36. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *S. aureus* (Sap) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-ο-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



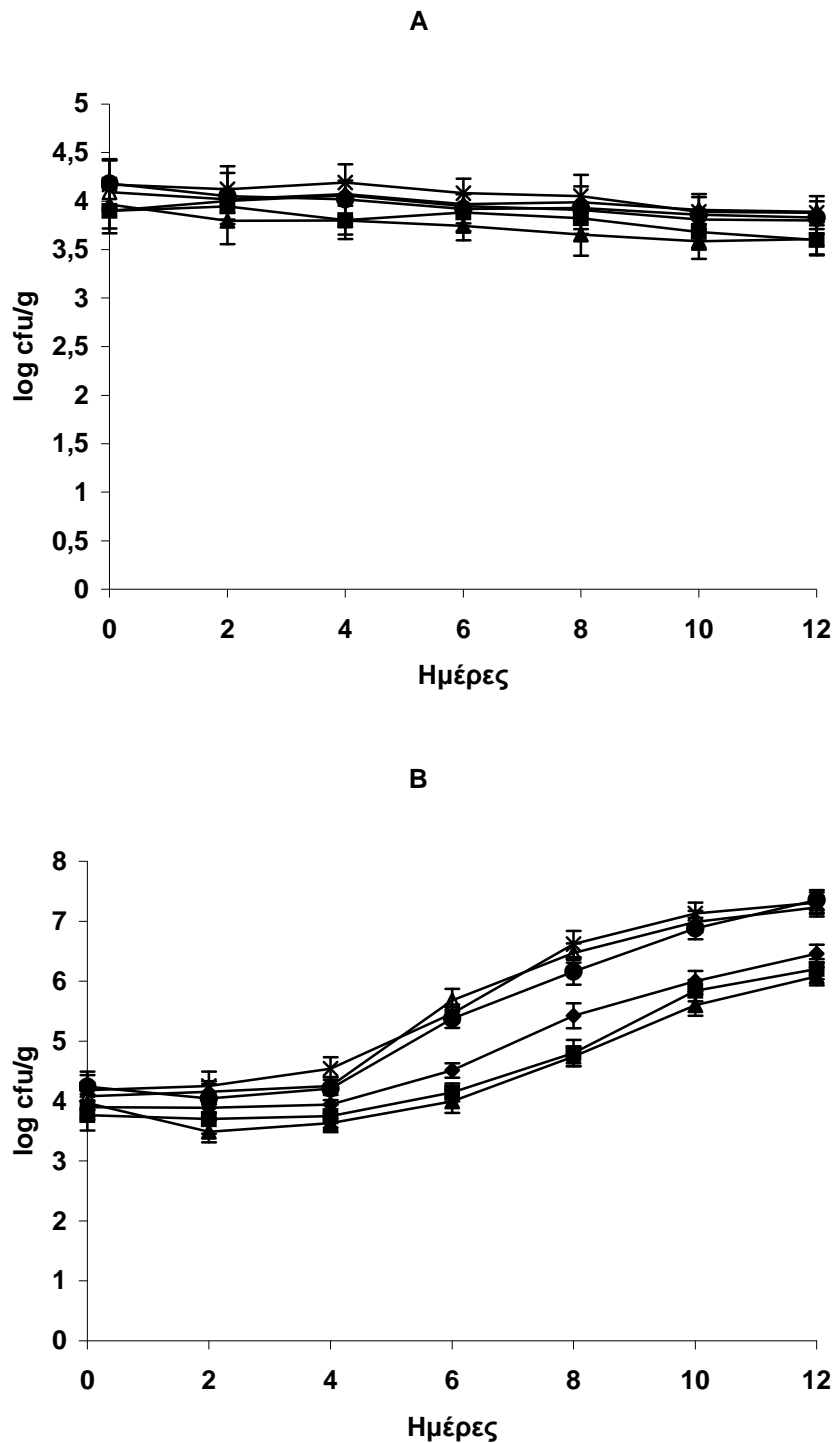
Σχήμα 37. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *S. aureus* (Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-♦-) δενδρολίβανο (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



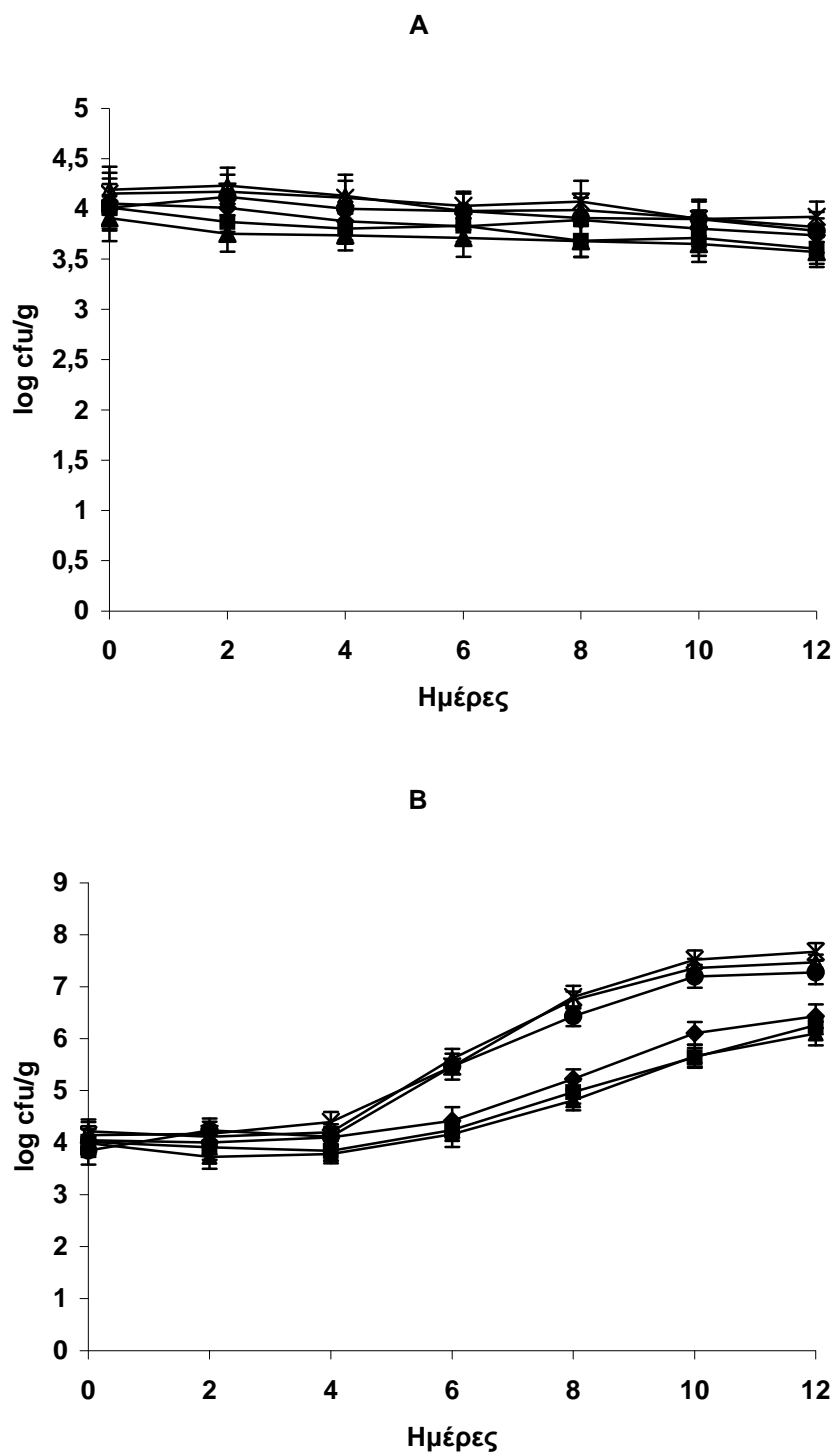
Σχήμα 38. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά μίγματος στελεχών *S. aureus* (Sap-Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-o-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



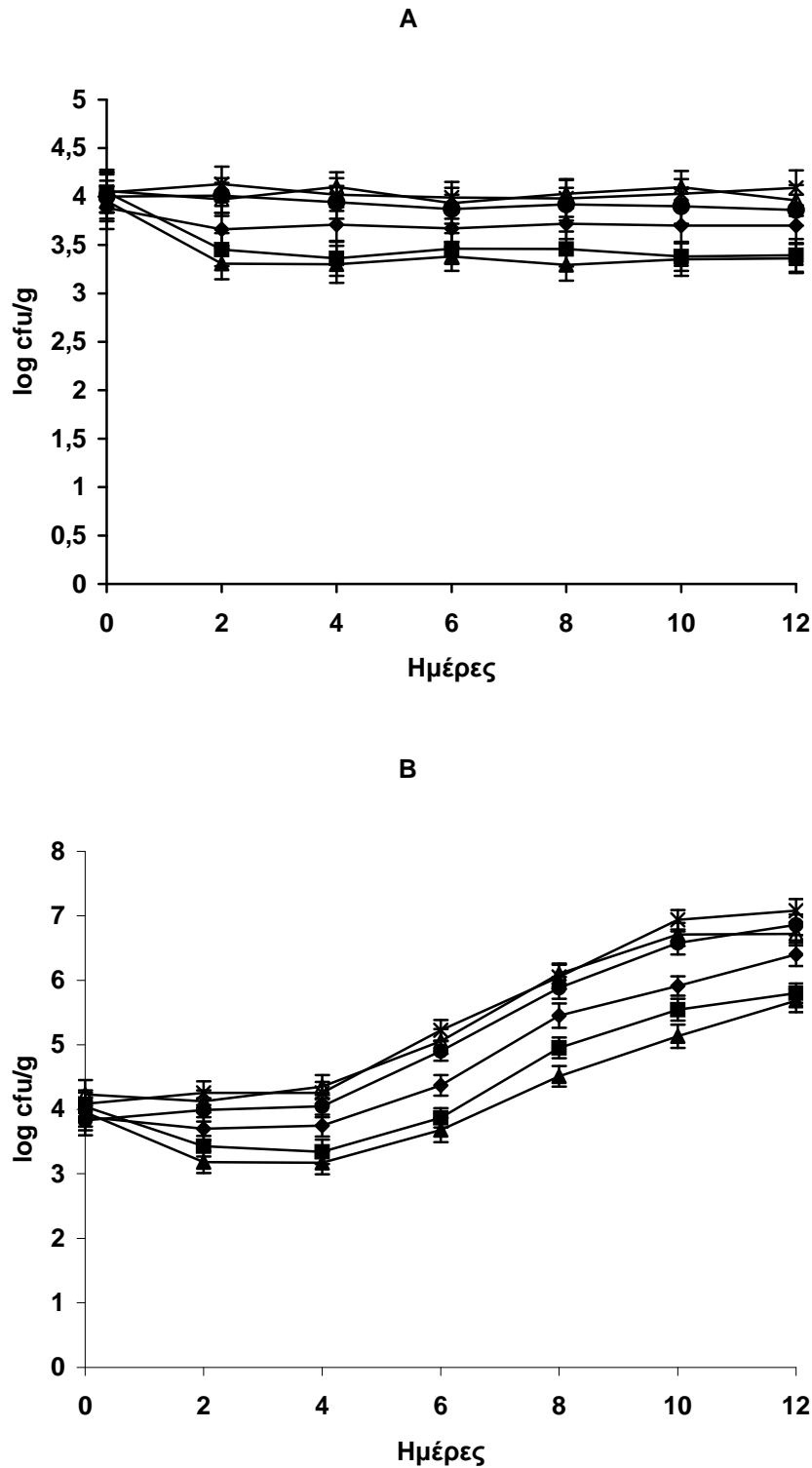
Σχήμα 39. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *E. coli* O157:H7 EDL 932 σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-♦-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



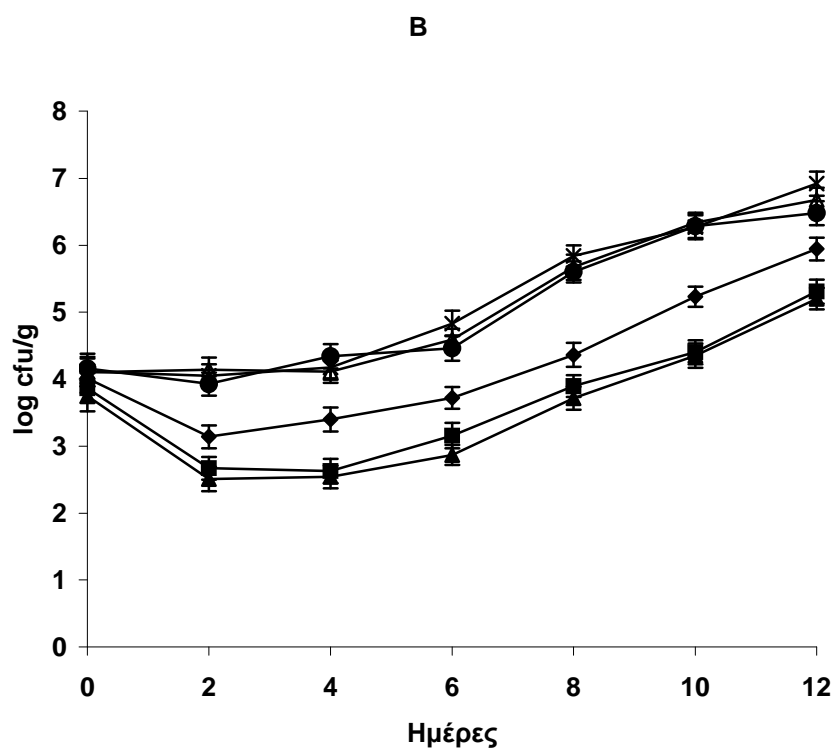
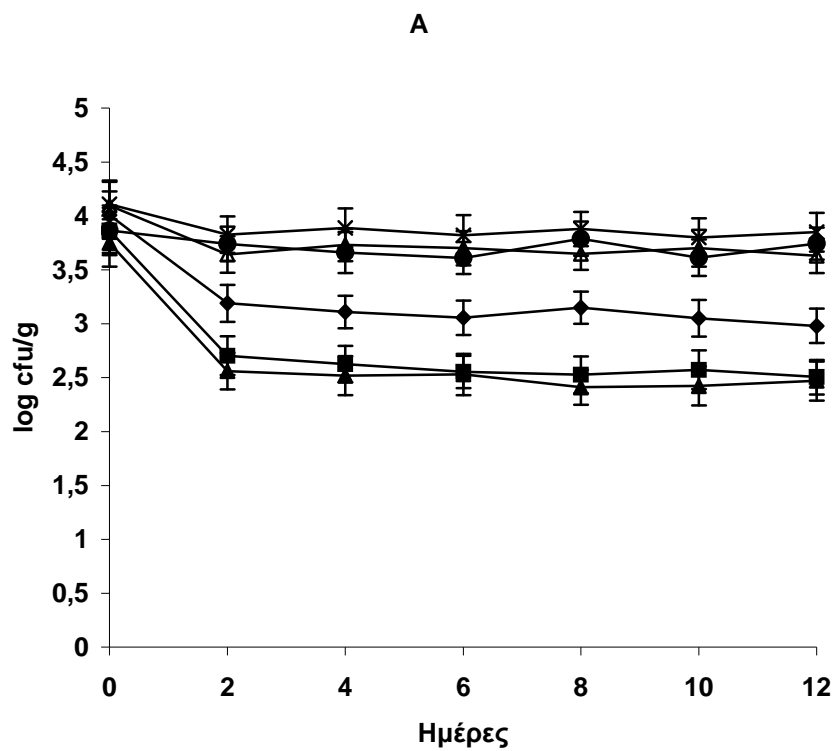
Σχήμα 40. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *E. coli* O157:H7 EDL 933 σε μπτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt),(-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



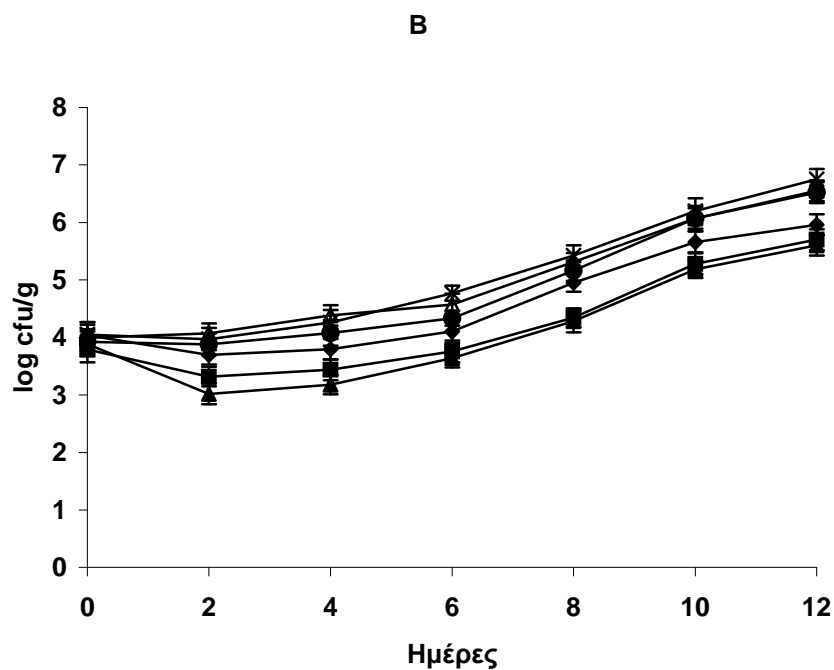
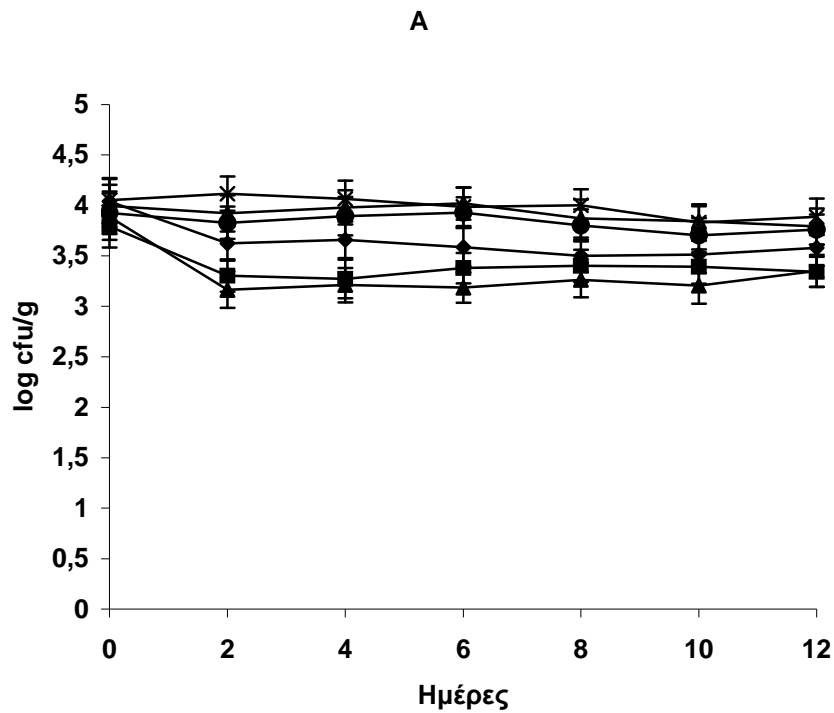
Σχήμα 41. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά μίγματος στελεχών *E. coli* O157:H7 (EDL 932-933) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 42. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *S. typhimurium* σε μυττωτό βόειο κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 43. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά *S. enteritidis* σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 44. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου κατά μίγματος στελεχών *Salmonella (typhimurium-enteritidis)* σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) δενδρολίβανο 0.6% (v/wt), (-■-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) δενδρολίβανο 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.

4.3.7. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού και δενδρολίβανου

L. monocytogenes

Η αντιμικροβιακή δράση του μίγματος των αιθέριων ελαίων κατά των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους της *L. monocytogenes*, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, φαίνεται στα σχήματα 45-47 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματος αυτών του βακτηρίου μειώθηκαν κατά 1.4, 1.1 και 1 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4 - 4.6 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών Scott A, Lmk και του μίγματός τους αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4.9, 5.5, 5.6 log cfu/g τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων και από την προσθήκη της νισίνης (500 IU/g), ενώ δεν διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης (1000 IU/g).

Με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου μειώθηκαν τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 3.5 – 3.8 log cfu/g τη 12^η ημέρα. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 4.4 - 4.9 log cfu/g

στο τέλος της συντήρησης. για τις 500 και τις 1000 IU νισίνης αντίστοιχα. Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου, οι οποίοι ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς τόσο των μαρτύρων όσο και της μεμονωμένης προσθήκης είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις 2 θερμοκρασίες.

Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* που δε διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g).

S. aureus

Η αντιμικροβιακή δράση του μίγματος των αιθέριων ελαίων κατά των στελεχών Sap, Sak και του μίγματός τους του *S. aureus* στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C φαίνεται, στα σχήματα 48-50 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν κατά 1-1.3 log cfu/g τη 2^η ημέρα τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P > 0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν τους 5.3 – 5.9 log cfu/g την 12^η ημέρα. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του *S. aureus* που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς τόσο των μαρτύρων όσο και από την

προσθήκη της νισίνης (500 IU/g), ενώ δε διέφεραν ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου μειώθηκαν φτάνοντας τους 2.5 – 2.7 τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν τους 4.8 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) τόσο από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων, όσο και από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του *S. aureus* μειώθηκαν στους 2 – 2.2 log cfu/g τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P>0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του παθογόνου αυξήθηκαν και έφτασαν περίπου τους 4.5 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P<0.05$) τόσο από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων, όσο και από τη μεμονωμένη προσθήκη είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) ή της νισίνης (1000 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Salmonella

Η αντιμικροβιακή δράση του μίγματος των αιθέριων ελαίων κατά των στελεχών *S. typhimurium* και *S. enteritidis*, καθώς και του μίγματός τους, στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 51-53 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου μειώθηκαν κατά 0.8 – 1.2 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, κανένα στέλεχος του μικροοργανισμού δεν αναπτύχθηκε. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί της *S. typhimurium*, της *S. enteritidis* και του μίγματός τους αυξήθηκαν και έφτασαν τους 5.1, 5.3 και 5.4 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης, αντίστοιχα. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *Salmonella* που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) τόσο από τους αντίστοιχους πληθυσμούς των μαρτύρων, όσο και από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης της νισίνης στις 500 ή στις 1000 IU/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη (500 IU/g) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου μειώθηκαν κατά περίπου 1.2 log cfu/g τη 2^η ημέρα. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *Salmonella* παρέμειναν χωρίς σημαντική μεταβολή ($P > 0.05$). Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών αυξήθηκαν και έφτασαν περίπου τους 4.8 log cfu/g στο τέλος της διάρκειας συντήρησης. Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών του βακτηρίου που ήταν σημαντικά χαμηλότεροι ($P < 0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της

μεμονωμένης προσθήκης είτε του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) ή της νισίνης (500 IU/g) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *Salmonella* που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη (500 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 όσο και στους 10 °C.

***E. coli* O157:H7**

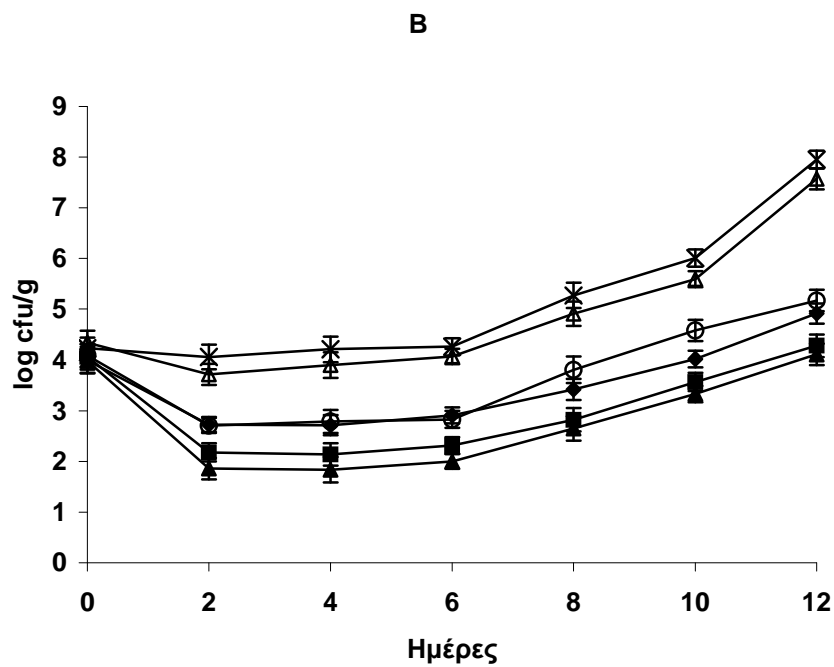
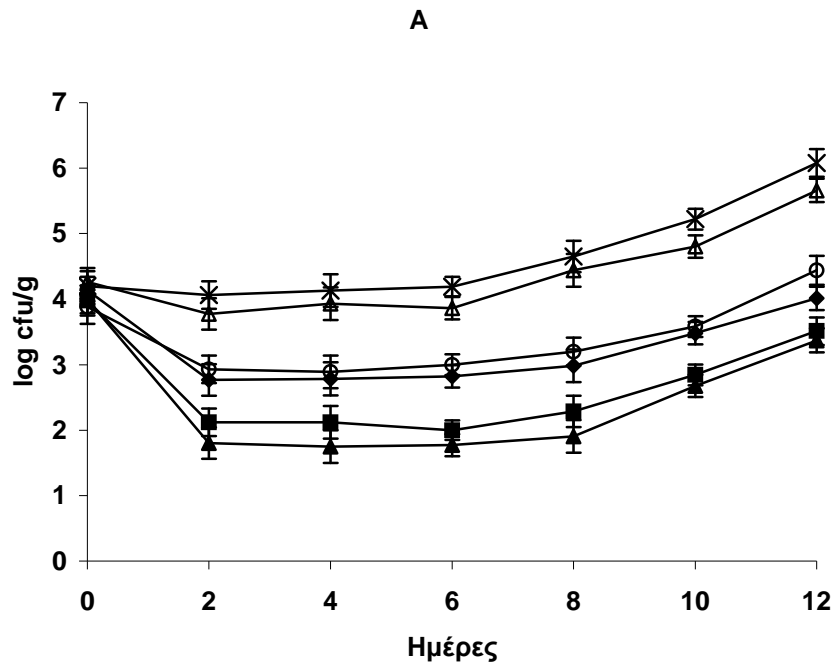
Η αντιμικροβιακή δράση του μίγματος των αιθέριων ελαίων κατά των στελεχών EDL 932 και EDL 933 και του μίγματος των στελεχών της *E. coli* O157:H7 στο μυττωτό βόειου κρέατος που συντηρήθηκε στους 4 και 10 °C, παρουσιάζεται στα σχήματα 54-56 αντίστοιχα.

Με την προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) οι αρχικοί πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 μειώθηκαν κατά 0.3 – 0.4 log cfu/g τη 2^η ημέρα και στις 2 θερμοκρασίες. Στη συνέχεια της συντήρησης στους 4 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών του βακτηρίου παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 αυξήθηκαν και έφτασαν τους 6.2 – 6.5 log cfu/g στο τέλος της συντήρησης. Η προσθήκη του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7 που ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P<0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς τόσο των μαρτύρων όσο και της προσθήκης της νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις δύο θερμοκρασίες.

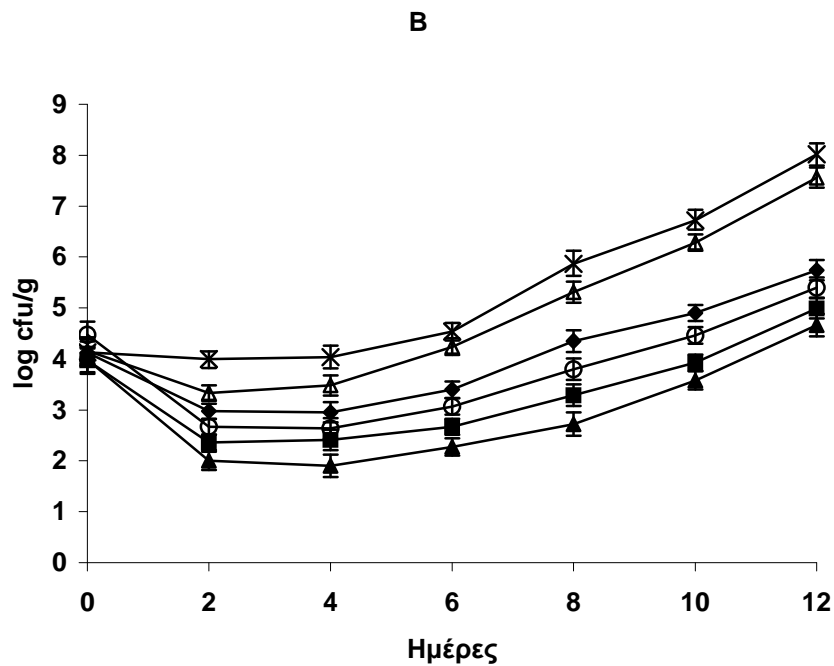
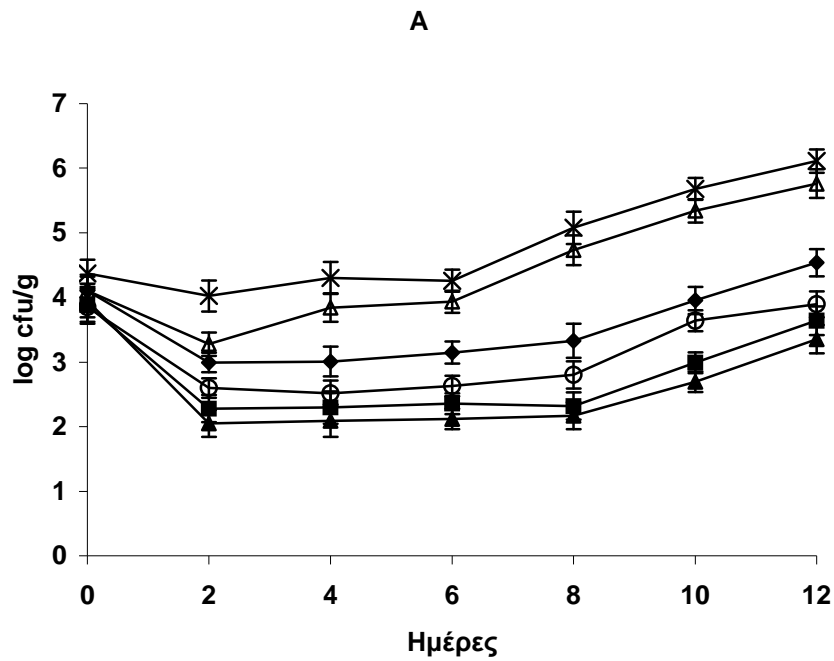
Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7

που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) σε όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C. Στους 10 °C, οι πληθυσμοί των στελεχών του παθογόνου με την προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της μεμονωμένης προσθήκης του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) μέχρι τη 10^η ημέρα για τα στελέχη EDL 932 και EDL 933 και μέχρι την 6^η ημέρα για το μίγμα των στελεχών και στη συνέχεια ήταν σημαντικά μικρότεροι ($P<0.05$) μέχρι το τέλος της συντήρησης.

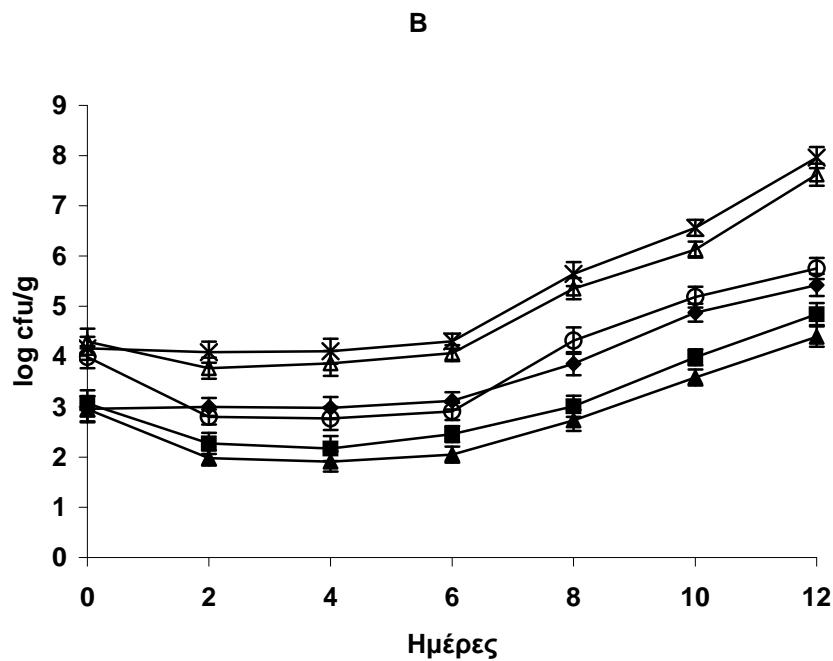
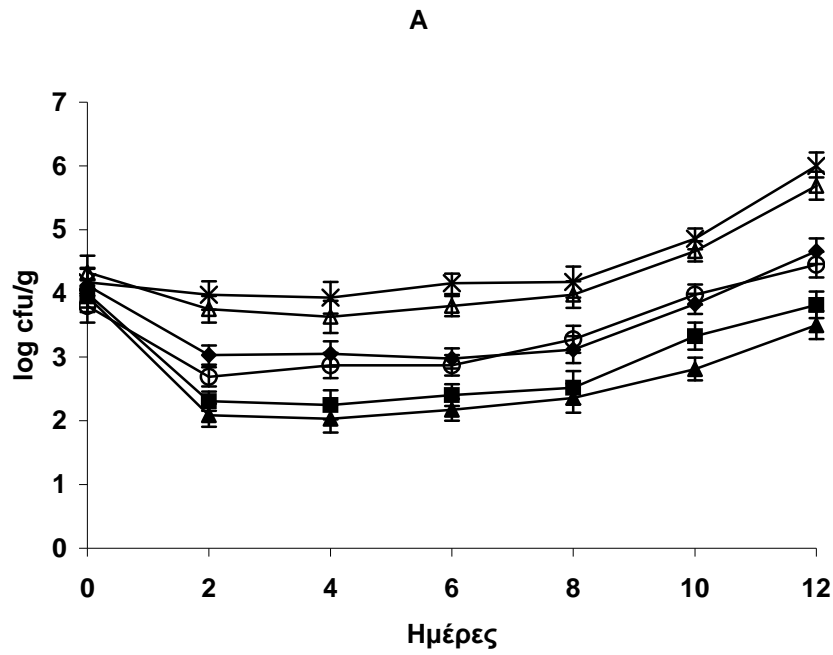
Η προσθήκη του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 που δε διέφεραν σημαντικά ($P>0.05$) από τους αντίστοιχους πληθυσμούς της προσθήκης του συνδυασμού του μίγματος των αιθέριων ελαίων (0.6%) με τη νισίνη στις 500 IU/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις 2 θερμοκρασίες



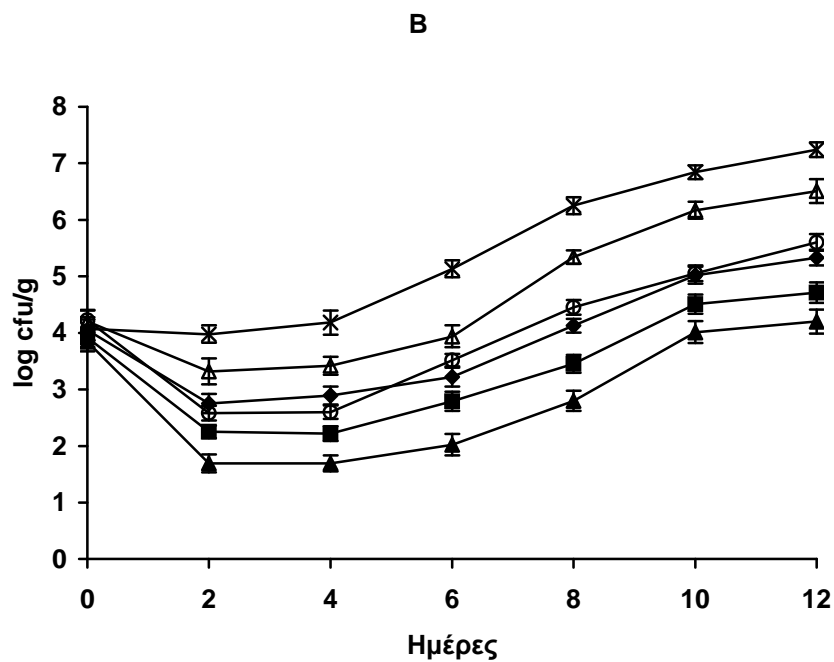
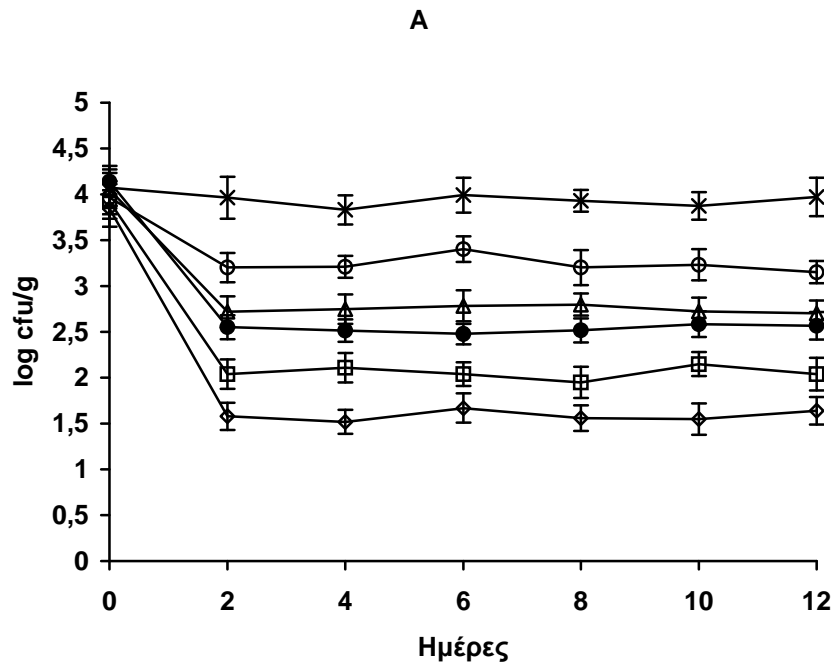
Σχήμα 45. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *L. monocytogenes* (Scott A) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



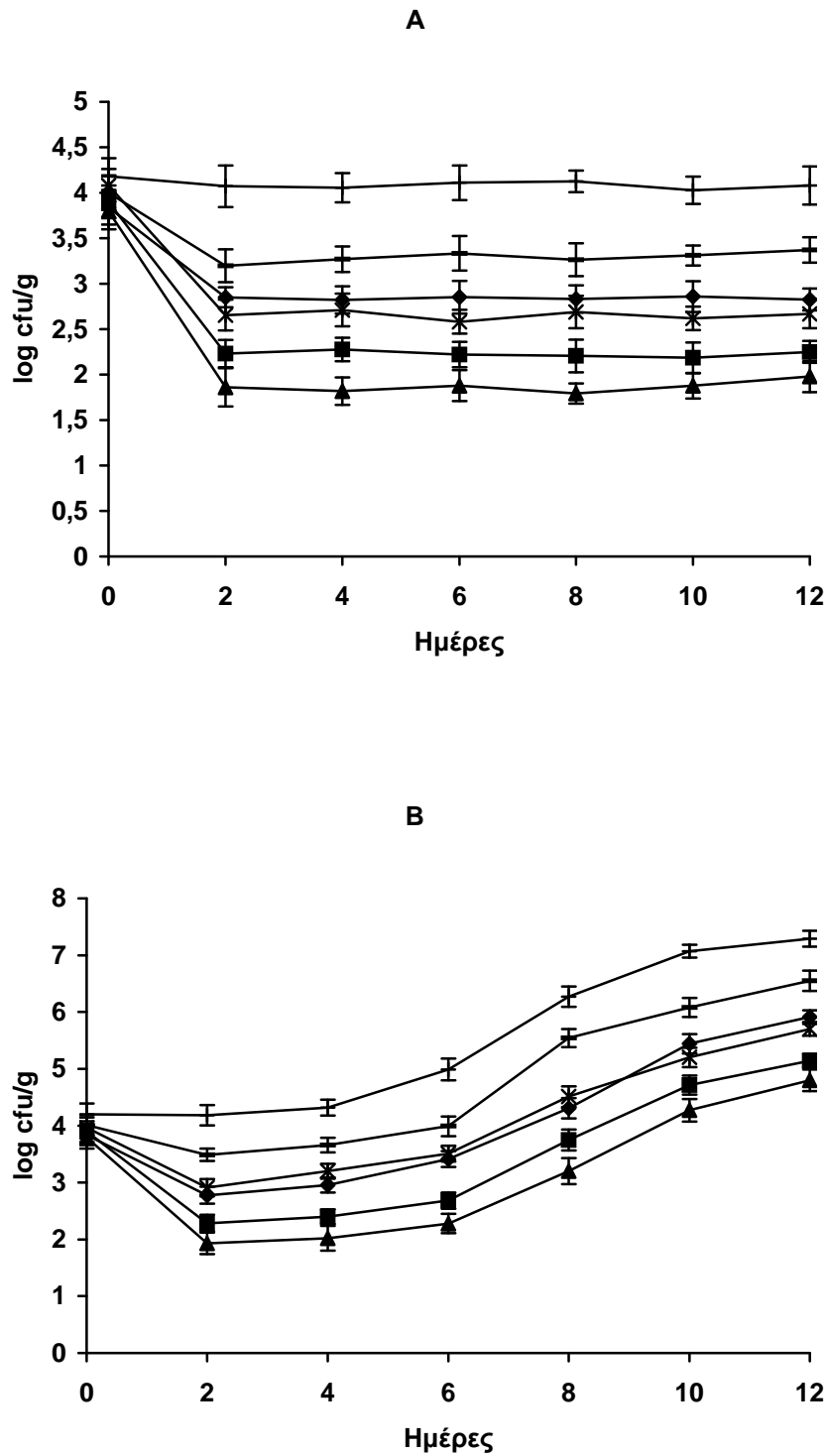
Σχήμα 46. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *L. monocytogenes* (Lmk) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



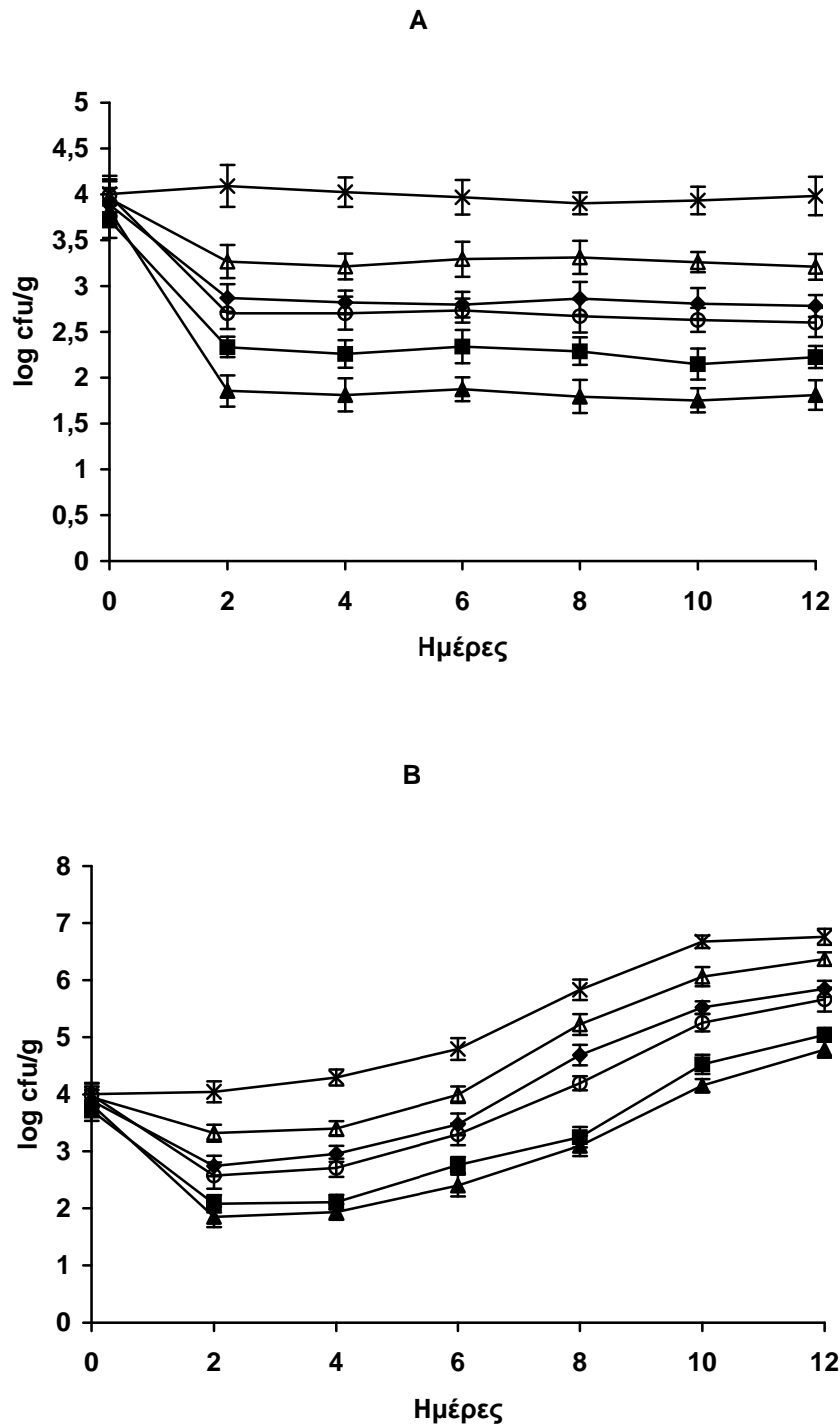
Σχήμα 47. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά μίγματος στελεχών *L. monocytogenes* (Scott A-Lmk) σε μττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



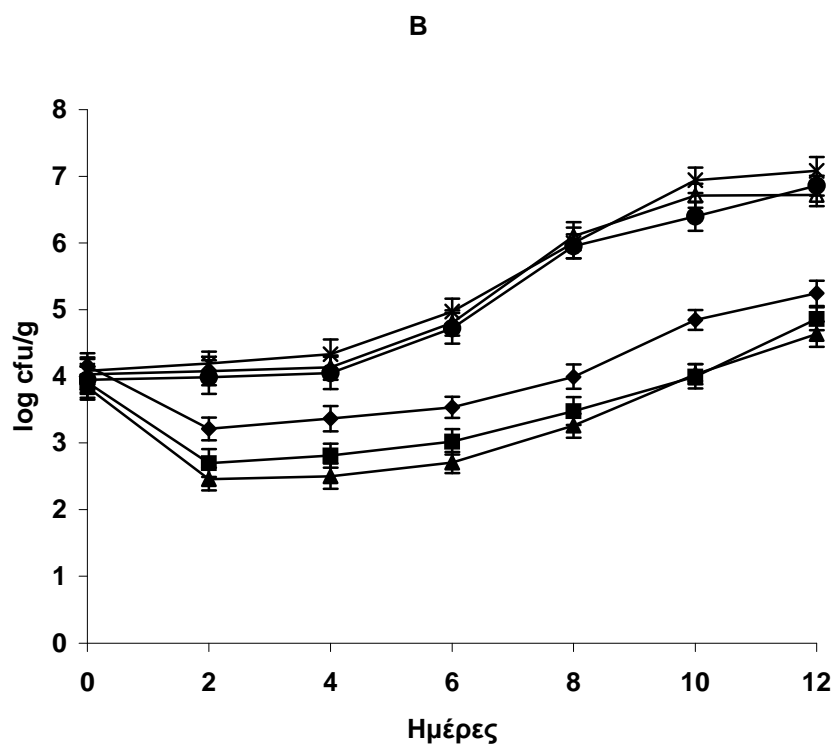
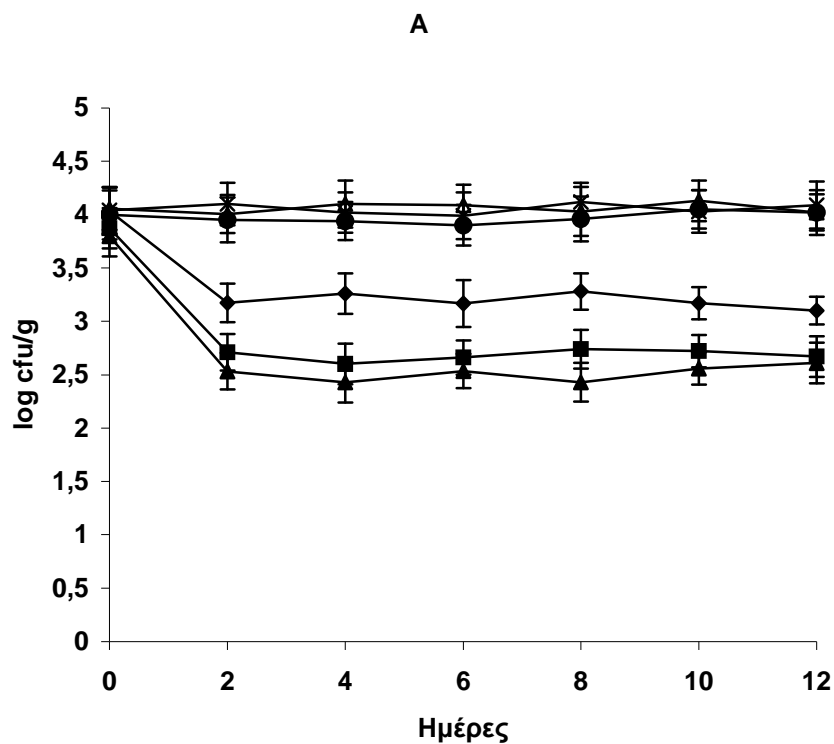
Σχήμα 48. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *S. aureus* (Sap) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



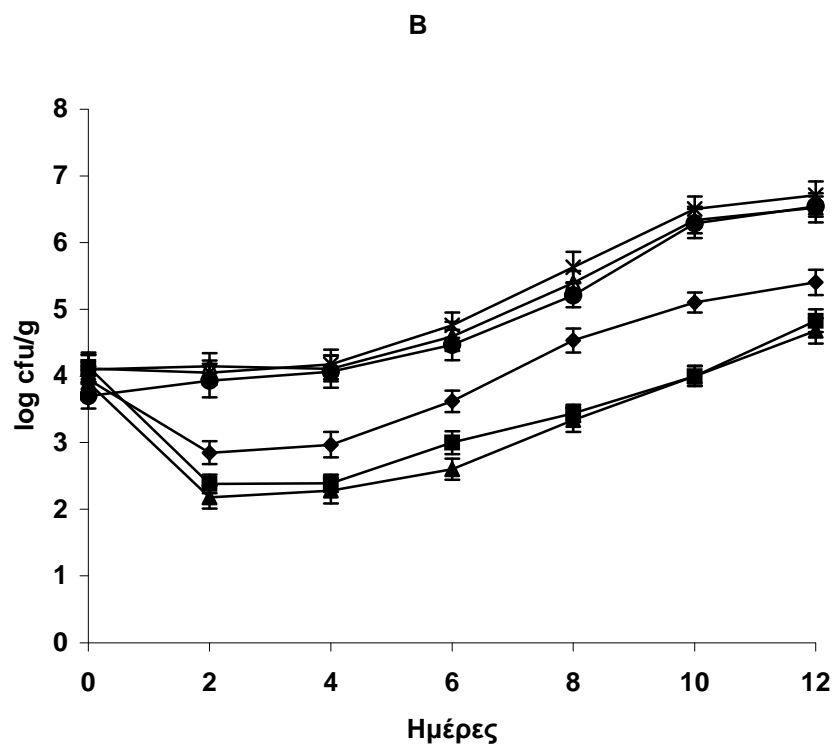
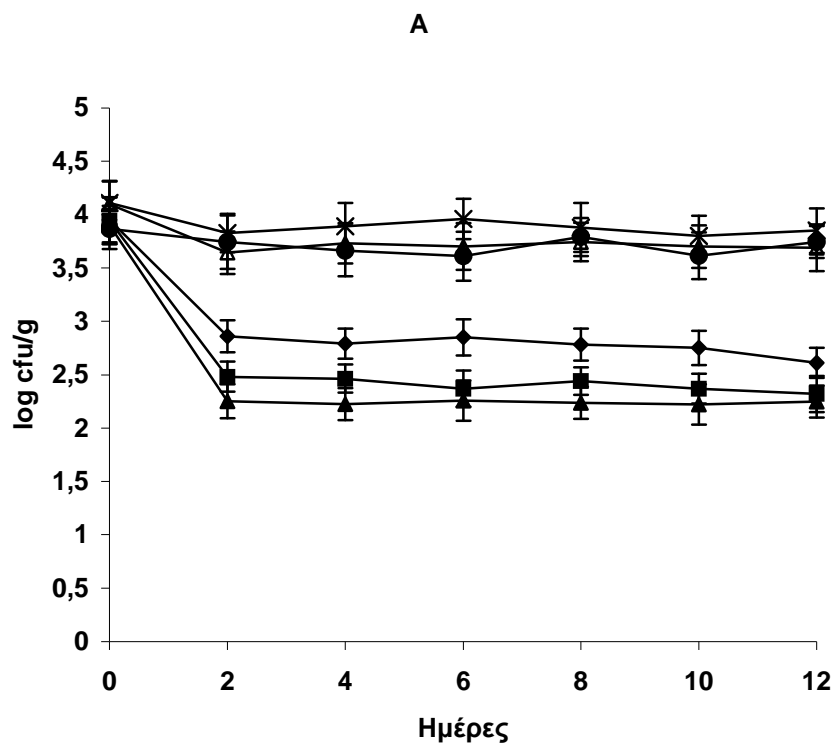
Σχήμα 49. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *S. aureus* (Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-○-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



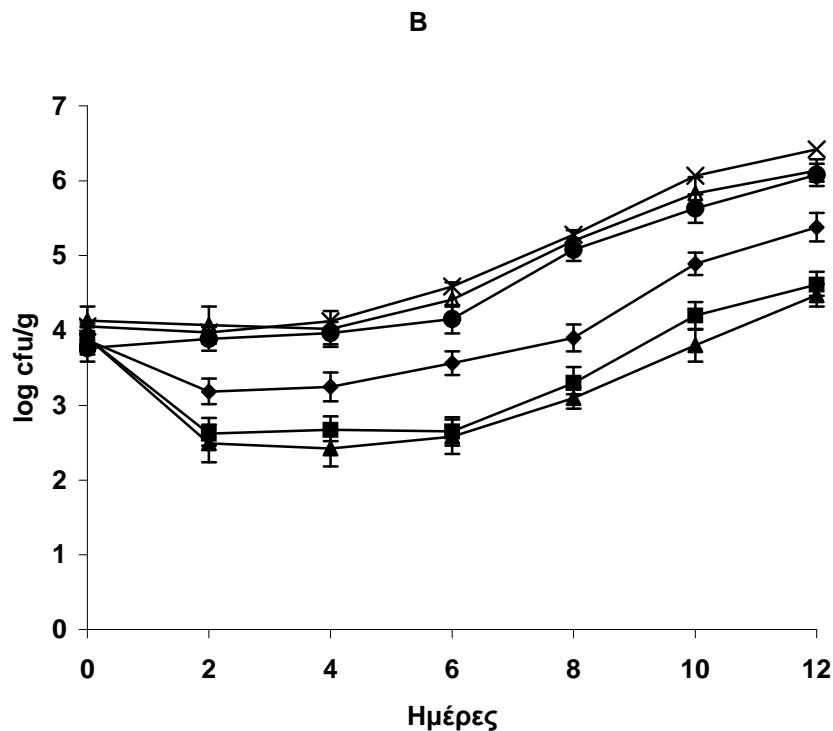
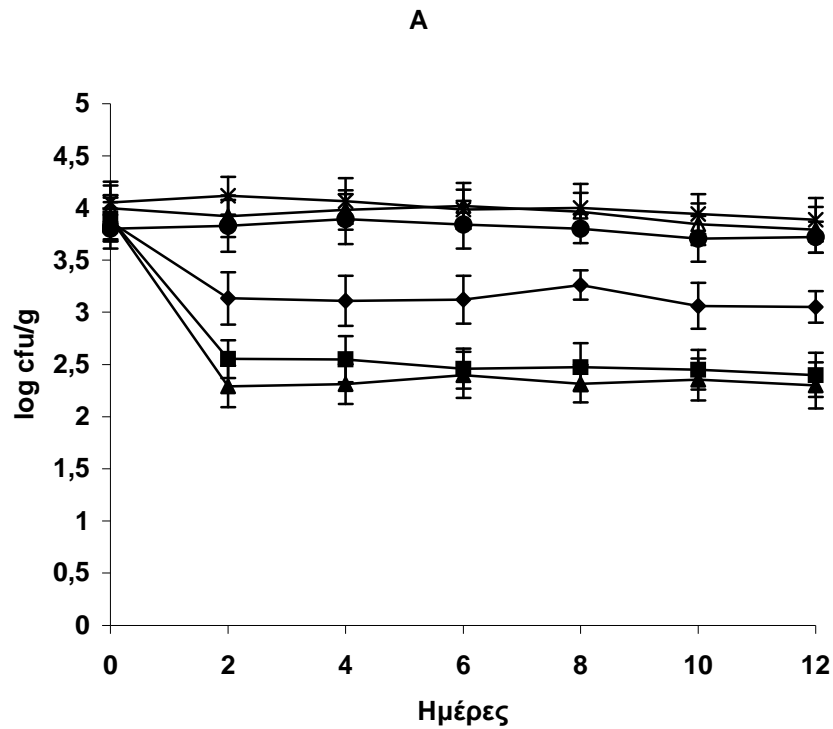
Σχήμα 50. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά μίγματος στελεχών *S. aureus* (Sap-Sak) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-o-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



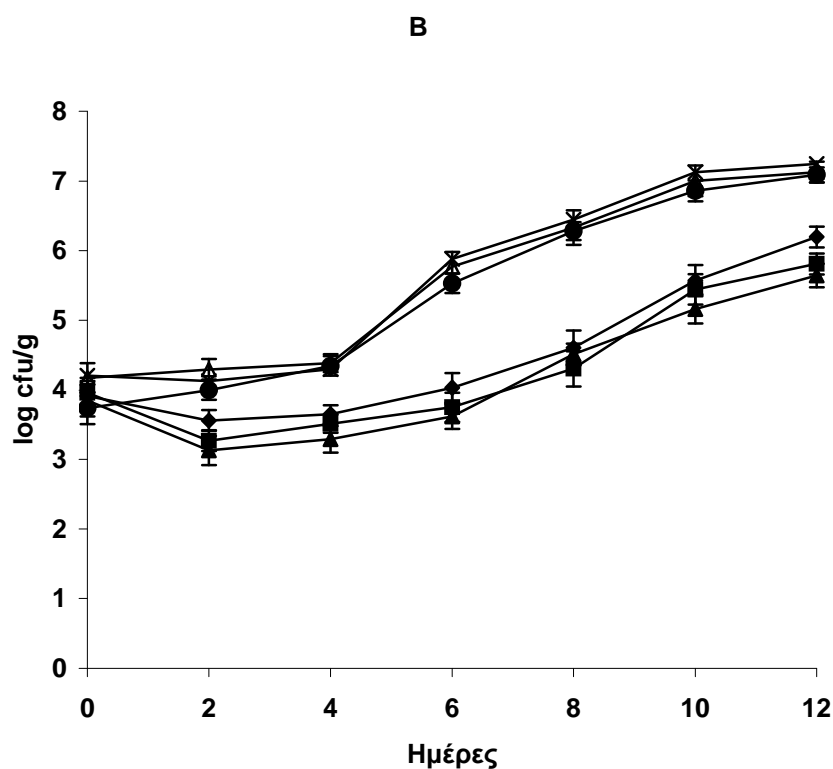
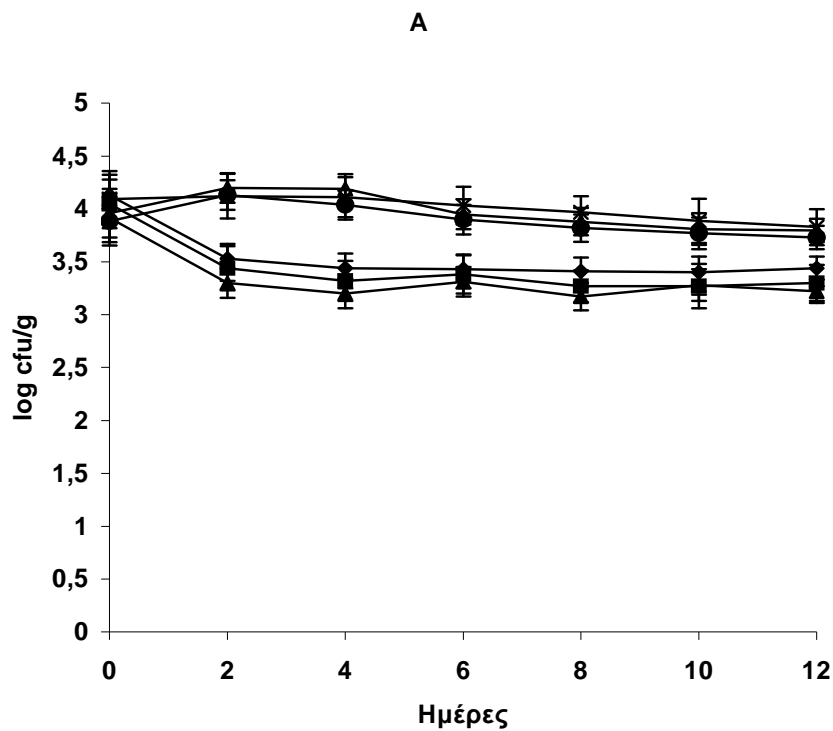
Σχήμα 51. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *S. typhimurium* σε μπτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



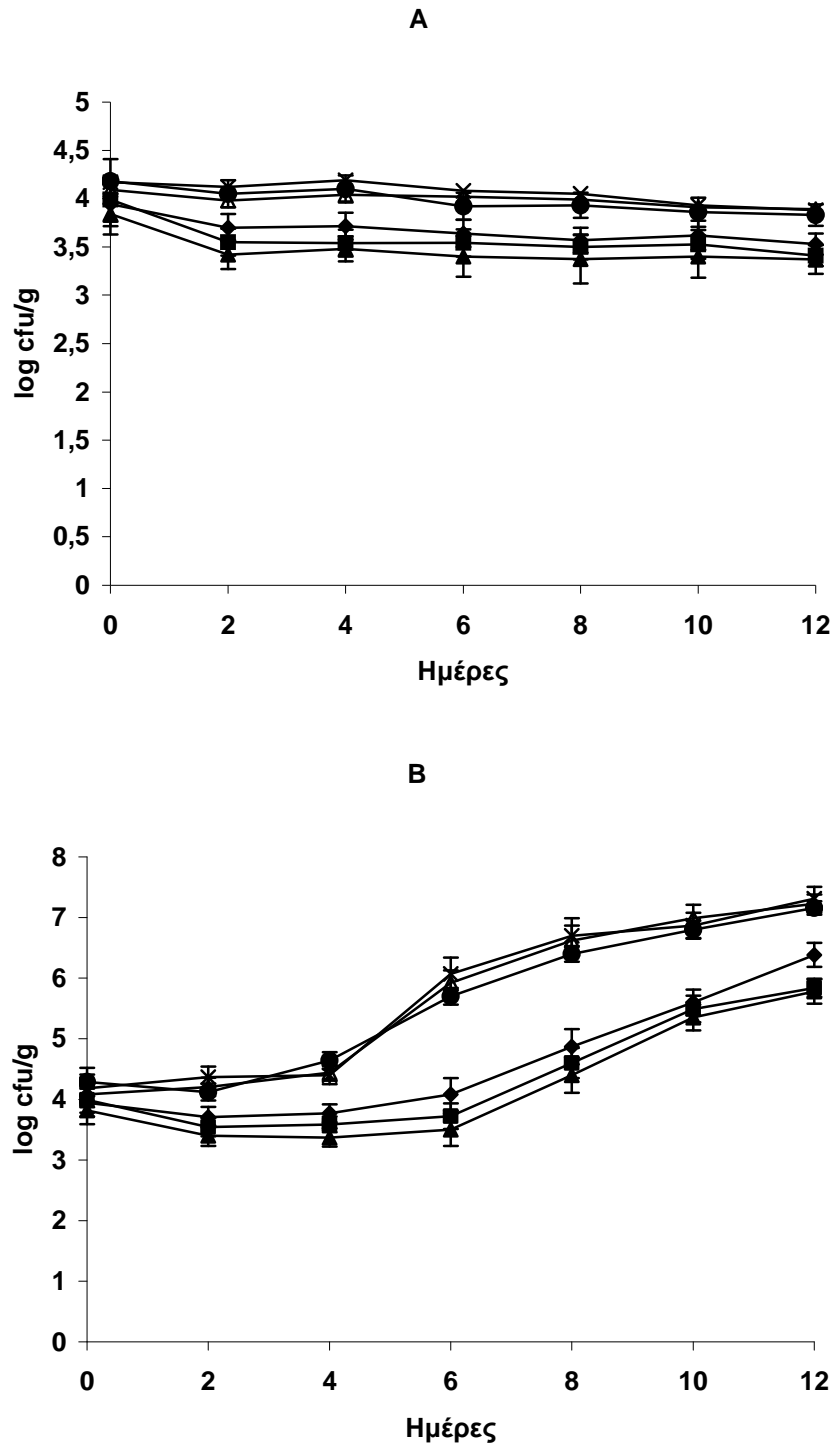
Σχήμα 52. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *S. enteritidis* σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



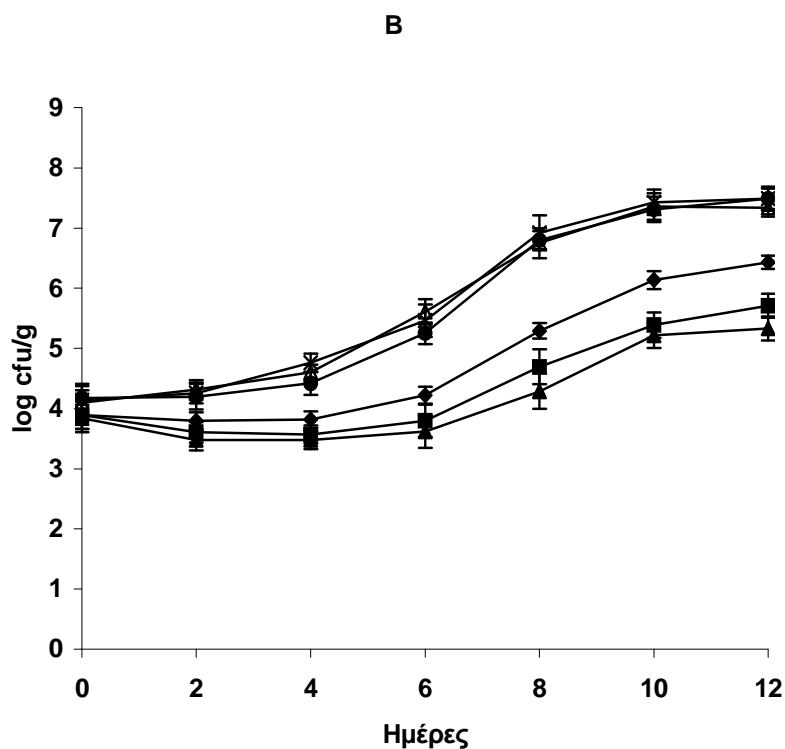
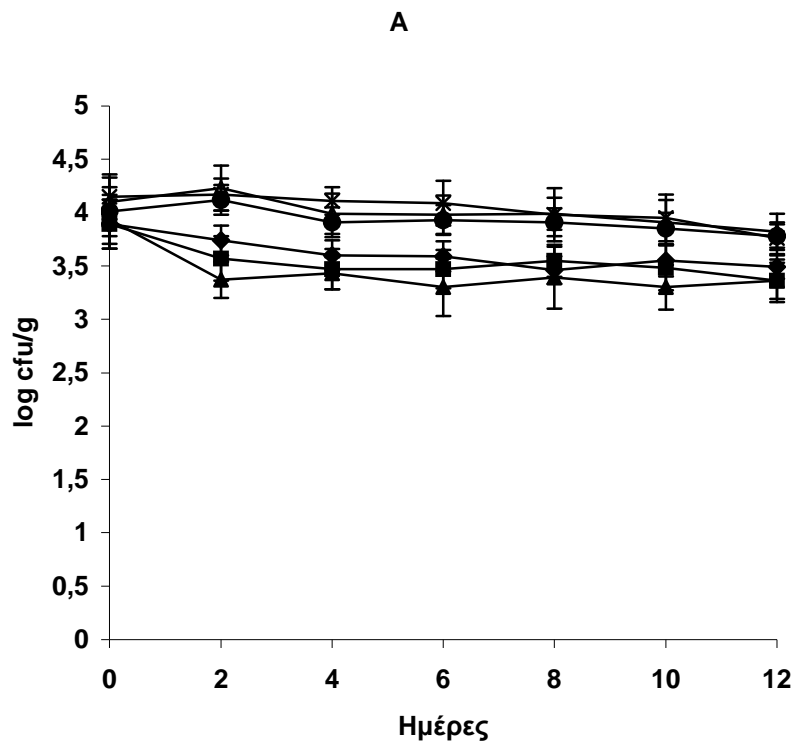
Σχήμα 53. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά μίγματος στελεχών *Salmonella* (*typhimurium-enteritidis*) σε μπτωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 54. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *E. coli* O157:H7 EDL 932 σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 55. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά *E. coli* O157:H7 EDL 933 σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g, (-◆-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.



Σχήμα 56. Αντιμικροβιακή δράση μίγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης-θυμαριού-δενδρολίβανου) κατά μίγματος στελεχών *E. coli* O157:H7 (EDL 932-933) σε μυττωτό βόειου κρέατος στους 4 °C (A) και 10 °C (B) για 12 ημέρες. (-x-) μάρτυρας, (-Δ-) νισίνη 500 IU/g, (-●-) νισίνη 1000 IU/g (-♦-) μίγμα 0.6% (v/wt), (-■-) μίγμα 0.6% και νισίνη 500 IU/g, (-▲-) μίγμα 0.6% και νισίνη 1000 IU/g.

4.4. Σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στο μυττωτό βοείου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πληθυσμών όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* σημαντικά χαμηλότερων ($P<0.05$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Η κατάταξη των αιθέριων ελαίων κατά σειρά δραστηριότητας ήταν η παρακάτω: αιθέριο έλαιο ρίγανης ή θυμαριού (0.6%) < μίγμα των αιθέριων ελαίων (0.6%) < αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (0.6%).

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στο μυττωτό βοείου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C παρουσίασαν πληθυσμούς της *S. enteritidis* και του μίγματος στελεχών της *Salmonella* σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Η κατάταξη των αιθέριων ελαίων κατά σειρά δραστηριότητας ήταν η παρακάτω: αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.6%) < αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.6%) < μίγμα των αιθέριων ελαίων (0.6%) < αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (0.6%).

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στο μυττωτό βοείου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C παρουσίασαν πληθυσμούς της *S. typhimurium* σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Η κατάταξη των αιθέριων ελαίων κατά σειρά δραστηριότητας ήταν η παρακάτω: αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.6%) < μίγμα των αιθέριων ελαίων (0.6%) < αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.6%) ή αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (0.6%).

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στο μυττωτό βοείου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 4 και 10 °C παρουσίασαν πληθυσμούς όλων των στελεχών της *E. coli* 0157:H7 σημαντικά χαμηλότερους ($P<0.05$) σε σχέση με τους μάρτυρες. Η κατάταξη των αιθέριων ελαίων κατά σειρά δραστηριότητας ήταν η

παρακάτω: αιθέριο έλαιο ρίγανης < μίγμα των αιθέριων ελαίων (0.6%) < αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.6%) < αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (0.6%).

4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.6% και 0.9% στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4 ή στους 10 °C για 12 ημέρες. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6 ή 0.9%) ήταν ισχυρότερη κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) σε σχέση με εκείνη κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης κατά διαφόρων παθογόνων έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές σε εργασίες *in vitro* και σε τρόφιμα. Η δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.4 και 1 %) σε θρεπτικά υποστρώματα κατά στελεχών του *S. aureus* αναφέρεται από τους Özcan και συν. (2003). Οι Hammer και συν. (1999) παρατήρησαν αναστολή της ανάπτυξης του *S. aureus*, όταν το αιθέριο έλαιο της ρίγανης χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις, όπως 0.12 % σε *in vitro* πειράματα. Οι Tsigarida και συν. (2000) επίσης διαπίστωσαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.8%) αναστέλει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε βόειο κρέας τόσο σε αερόβιες συνθήκες, όσο και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή υπό κενό στη διάρκεια της συντήρησης στους 5 °C. Οι Skandamis και συν. (2002β) ανέφεραν ότι η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.8%) παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση κατά της *S. typhimurium* σε μυττωτό βόειου κρέατος με ή χωρίς τη φυσιολογική γλωρίδα κατά τη συντήρησή του στην ψύξη. Οι Oussalah και συν. (2006) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στο πλαστικό φύλλο της συσκευασίας σε συγκέντρωση 1% αναστέλει την ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7 σε βόειο κρέας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 4 °C για 5 ημέρες. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση που παρουσίασε το αιθέριο έλαιο κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων ήταν μεγαλύτερη στη συγκέντρωση 0.9% παρά στη συγκέντρωση 0.6%. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας και άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους (Friedman και συν 2002, Di Pasqua και συν 2005; Rasooli και συν 2005).

Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ήταν ισχυρότερη κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) σε σχέση με εκείνη κατά των Gram-αρνητικών (*Salmonella* και *E. coli* O157:H7). Η δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά διαφόρων παθογόνων έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές σε εργασίες *in vitro* και σε τρόφιμα. Οι Sagdic και συν (2002) ανέφεραν ότι αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1 % είχε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *E. coli* O157:H7 σε θρεπτικό ζωμό στους 37 °C. Οι Burt και Reinders (2003) παρατήρησαν ότι το αιθέριο έλαιο θυμαριού (0.12 και 0.25%) σε θρεπτικό ζωμό παρουσίασε βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση κατά της *E. coli* O157:H7 στους 10 °C, αντίστοιχα. Οι Özcan και συν. (2003) επίσης βρήκαν ότι αιθέριο έλαιο θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.4 και 1 % σε θρεπτικό υπόστρωμα είχε αντιμικροβιακή δράση κατά του *S. aureus*. Επιπρόσθετα, οι Hammer και συν. (1999) διαπίστωσαν αναστολή της ανάπτυξης του *S. aureus* σε συγκέντρωση 0.25 % αιθέριου ελαίου θυμαριού σε θρεπτικό υπόστρωμα. Οι Smith-Palmer και συν. (1998) επίσης παρατήρησαν ότι το έλαιο θυμαριού είχε βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση κατά της *S. enteritidis* σε θρεπτικό ζωμό στους 4 °C. Οι Aureli και συν. (1992) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού 0.25 % σε μυττωτό χοιρινού

κρέατος προκάλεσε μείωση στους αρχικούς πληθυσμούς της *L. monocytogenes* κατά 2 και 2.3 log cfu/g κατά τη συντήρηση για 8 ημέρες στους 4 και 8 °C, αντίστοιχα. Οι Singh και συν. (2003) βρήκαν ότι η προσθήκη ελαίου θυμαριού σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1 % σε «χοτ ντογκ» είχαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes*. Οι ίδιοι όμως ερευνητές παρατήρησαν επίσης ότι η προσθήκη του αιθέριου ελαίου (0.1%) στο τρόφιμο δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου. Οι Smith-Palmer και συν. (1998) παρατήρησαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.5 και 1%) σε τυρί χαμηλής λιποπεριεκτικότητας ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση του στους 4 °C για 12 ημέρες.

Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση, η οποία ήταν ισχυρότερη κατά των Gram – θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) σε σχέση με τα Gram-αρνητικά βακτήρια (*E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές τόσο σε *in vitro* πειράματα όσο και σε τρόφιμα. Οι Hammer και συν. (1999) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου για την ανασχεση του *S. aureus* σε θρεπτικό υπόστρωμα ήταν 1 %, ενώ η αντίστοιχη ελάχιστη συγκέντρωση για την ανασχεση της ανάπτυξης της *S. typhimurium* ήταν πάνω από 2 %. Οι Smith-Palmer και συν. (1998) αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση σε συγκέντρωση 0.1 % κατά των *L. monocytogenes* και *S. aureus* σε θρεπτικό ζωμό στους 35 °C, ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση ήταν >1% για αντιμικροβιακή δράση κατά των *E. coli* και *S. enteritidis*. Οι Pandit και Shelef (1994) παρατήρησαν ότι έλαιο δενδρολίβανου σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1 % παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes* σε κρεατοσκεύασμα χοιρινού κρέατος κατά τη συντήρησή του στους 5 °C για χρονικό διάστημα 50 ημερών.

Η προσθήκη του μίγματος αιθέριων ελαίων (0.6%) παρουσίασε αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων παθογόνων. Η προσθήκη συνδυασμών αιθέριων ελαίων σε κρεατοσκευάσματα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Οι Lin και συν. (2005) αναφέρουν ότι η προσθήκη μίγματος εκχυλισμάτων ρίγανης και κρίνας σε αναλογίες 50/50 ,75/25 και 25/75 % σε βόειο κρέας και φιλέτα ιχθύων παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *L. monocytogenes* κατά τη συντήρησή τους στους 4 °C για 8 ημέρες.

Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στα φαινολικά συστατικά τους. Ο μηχανισμός δράσης των φαινολικών αυτών συστατικών αποδίδεται στην προσβολή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της (Knobloch και συν. 1986, Sikkema και συν. 1994). Η βλάβη που προκαλείται στην βακτηριακή μεμβράνη οδηγεί σε απώλεια ζωτικών συστατικών και ιόντων και συνεπώς στη λύση του κυττάρου (Oosterhaven και συν. 1995, Gustafson και συν. 1998, Helander και συν. 1998, Cox και συν. 2000, Lambert και συν. 2001, Skandamis και συν. 2001, Ultee και συν. 2002). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη που αποτελούν τις κύριες φαινολικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και του θυμαριού παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes* και της *E. coli* O157:H7 σε *in vitro* μελέτες (Lis-Balchin και Deans 1997, Hellander και συν 1998, Burt και συν 2005, Gaysinsky και συν 2005, Di Pasqua και συν 2006, Gill και Holley 2006). Οι Chiasson και συν. (2004) παρατήρησαν ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη ανέστειλαν την ανάπτυξη της *S. typhi* όταν προστέθηκαν σε βόειο κρέας που συντηρούνταν στους 4 °C σε συγκεντρώσεις 0.9 και 1.14 %, αντίστοιχα. Το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο, που αποτελούν τους κύριους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και του θυμαριού, φαίνεται ότι επίσης παρουσιάζουν

αντιμικροβιακή δράση (Kisko και Roller 2005). Εξάλλου το καρνοσικό, το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ είναι τα κύρια πολυφαινολικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου στα οποία θεωρείται ότι οφείλεται η αντιμικροβιακή του δράση (Moreno και συν. 2006).

Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων που παρατηρήθηκε στο μυττωτό βόειου κρέατος ήταν μεγαλύτερη κατά των Gram – θετικών (*L. monocytogenes* και *S. aureus*), σε σχέση με τους Gram - αρνητικούς μικροοργανισμούς (*E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Τα Gram - αρνητικά βακτήρια, σε αντίθεση με τα Gram – θετικά, διαθέτουν μια εξωτερική, προστατευτική μεμβράνη η οποία περιβάλλει το κύτταρο (Marino και συν. 1999, Burt 2004). Η μεμβράνη αυτή αποτελείται εσωτερικά από ένα στρώμα γλυκεροφωσφολιπιδίων και εξωτερικά από στρώμα λιποπολυσακχαριτών με μερικώς ανιοντική και υδρόφιλη επιφάνεια. Η εξωτερική μεμβράνη των Gram – αρνητικών κυττάρων λειτουργεί ως «φραγμός» για μακρομόρια και υδόφοβες ενώσεις, όπως τα αιθέρια έλαια φυτικής προέλευσης (Hellander και συν. 1998, Smith-Palmer και συν. 1998).

Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων κατά των παθογόνων *L. monocytogenes* και *S. aureus* μετά την προσθήκη τους σε συγκέντρωση 0.6% στο μυττωτό βόειου κρέατος μπορούσε να διαβαθμιστεί ως εξής: ρίγανη ή θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο. Η αντίστοιχη διαβάθμιση κατά της *S. enteritidis* και του μίγματος στελεχών της *Salmonella* ήταν η εξής: ρίγανη > θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο, ενώ κατά της *S. typhimurium* ως εξής: ρίγανη > μίγμα των αιθέριων ελαίων > θυμάρι ή δενδρολίβανο. Εξάλλου, η διαβάθμιση κατά της *E. coli* O157:H7 ήταν η εξής: ρίγανη > μίγμα αιθέριων ελαίων > θυμάρι > δενδρολίβανο. Άλλοι ερευνητές επίσης παρατήρησαν κυρίως σε *in vitro* πειράματα ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης ή του θυμαριού ήταν

ισχυρότερη κατά διάφορων παθογόνων από εκείνη του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου (Sagdic 2003, Özcan και συν. 2003, Burt 2004).

Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στα δείγματα μυττωτού βοείου κρέατος παρουσίασε μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων στους 10 °C , σε σχέση με αυτή στους 4 °C. Σε συμφωνία, οι Burt και Reinders (2003) επίσης παρατήρησαν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου θυμαριού κατά της *E. coli* O157:H7 σε θρεπτικό ζωμό σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία της ψύξης. Ομοίως, οι Aureli και συν. (1992) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.25 %) σε μυττωτό χοιρινού κρέατος είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των αρχικών πληθυσμών της *L. monocytogenes* κατά 2 και 2.3 log cfu/g στους 4 και 8 °C, αντίστοιχα. Γενικά, η δράση των φαινολικών συστατικών παρατηρείται πιο ενισχυμένη κατά των βακτηρίων σε υψηλές θερμοκρασίες από ότι σε θερμοκρασίες ψύξης (Burt 2004).

Η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g σε μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram – θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) κατά τη συντήρηση για 12 ημέρες στους 4 και 10 °C. Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης βρέθηκε να εξαρτάται από την συγκέντρωσή της, από τα στελέχη των παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και από τη θερμοκρασία συντήρησης. Η προσθήκη της νισίνης σε συγκέντρωση 500 IU/g παρουσίασε ασθενή ή καθόλου αντιμικροβιακή δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και του *S. aureus*. Αντίθετα, η προσθήκη της νισίνης σε συγκέντρωση 1000 IU/g παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes* και του *S. aureus*. Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης κατά των Gram – θετικών βακτηρίων στο κρέας ήταν σαφώς μικρότερη από εκείνη η οποία καταγράφηκε *in vitro*. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας και άλλοι ερευνητές

παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης εξασθενεί όταν η τελευταία προστίθεται στο κρέας, παρά σε εργαστηριακά υποστρώματα. Αυτό αποδίδεται τόσο στη δέσμευσή της νισίνης από τις πρωτεΐνες και το λίπος, όσο και στην εξουδετέρωσή της από τις πρωτεάσες του κρέατος (Aasen και συν. 2003, Stergiou και συν. 2006). Οι Pawar και συν. (2000) αναφέρουν ότι η προσθήκη νισίνης (400 και 800 IU/g) σε μυττωτό από κρέας βουβάλου ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και ο βαθμός αναστολής ανάπτυξης του παθογόνου αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της νισίνης κατά τη συντήρηση στους 4 °C. Ομοίως οι Vignolo και συν. (2000) κατέγραψαν ισχυρή ανασταλτική δράση της νισίνης σε συγκέντρωση 2000 IU/g κατά της *L. monocytogenes* σε μυττωτό βόειου που διατηρήθηκε στους 20 °C για 24 ώρες.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, οι Abee και συν. (1994) και οι Thomas και Wimpeny (1996) αναφέρουν ότι η αντιλειτουργική δράση της νισίνης εξασθενεί με τη μείωση της θερμοκρασίας και θεωρούν ότι αυτό οφείλεται στη μείωση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης η οποία παρατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Άλλοι ερευνητές επίσης παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης ήταν διαφορετική σε διαφορετικά στελέχη της *L. monocytogenes* και του *S. aureus* (Vignolo και συν. 2000, Giacometti και συν. 2000, Castellano και συν. 2001, Singh και συν. 2001, Brumfitt και συν. 2002). Η διαφορά στην ευαισθησία των διάφορων στελεχών των Gram – θετικών βακτηρίων στην αντιμικροβιακή δράση της νισίνης, θεωρείται ότι οφείλεται τόσο στις διαφορές σύστασης της μεμβράνης των διαφόρων βακτηρίων σε λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια, όσο και στην αδυναμία της νισίνης να δράσει σε πιο συμπαγείς μεμβράνες (Mazzotta και Montville 1997, Vignolo και συν. 2000).

Η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g σε μυττωτό βόειου κρέατος δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram – αρνητικών βακτηρίων, *Salmonella* και *E. coli* O157:H7, κατά τη συντήρηση στους 4 και 10 °C για 12 ημέρες. Η αναποτελεσματικότητα της νισίνης κατά των Gram – αρνητικών βακτηριακών κυττάρων είναι ευρύτερα αποδεκτή και αποδίδεται στην ύπαρξη της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία περιβάλλει την κυτταρική τους μεμβράνη και το πεπτιδογλυκανικό στρώμα, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την είσοδο και δράση της νισίνης (Breukink και de Kruijff 1999, Helander και Mattila-Sandholm 2000, Fang και Tsai 2003). Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, οι Cleveland και συν. (2001) και οι Olasuro και συν. (2003) αναφέρουν ότι η νισίνη δεν εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση κατά της *Salmonella* και της *E. coli* O157:H7 σε *in vitro* πειράματα. Οι Fang και Tsai (2003) αναφέρουν επίσης ότι η προσθήκη νισίνης σε συγκεντρώσεις 10^2 , 10^3 και 10^4 IU/g σε τεμάχια βόειου κρέατος δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά της *E. coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια διατήρησης των δειγμάτων στους 10 και 30 °C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης (0.6 ή 0.9%) και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 4 και 10 °C παρουσίασε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων (*L. monocytogenes*, του *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) παρουσίασε συνεργό δράση κατά της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *S. enteritidis* όχι όμως κατά των στελεχών της *E. coli* O157:H7, της *S. typhimurium* και του μίγματος των στελεχών της *Salmonella*. Η προσθήκη των συνδυασμών όλων των εξετασθέντων αιθερίων ελαίων με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος παρουσίασε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση

κατά των Gram – θετικών (*L. monocytogenes* και *S. aureus*), έναντι των Gram – αρνητικών βακτηρίων (*Salmonella* και *E. coli* O157:H7). Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *Salmonella*. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου τόσο της ρίγανης (0.6%) όσο και θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) εμφάνισε βακτηριοστατική δράση κατά της *L. monocytogenes* και του *S. aureus*, αφού η ανίχνευση αυτών των παθογόνων ήταν εφικτή μόνο μετά από εμπλουτισμό τους στη συντήρηση στους 4 και 10 °C. Επιπλέον, η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) εμφάνισε βακτηριοστατική δράση και κατά της *Salmonella*.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά όλων των στελεχών της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *Salmonella* κατά τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 °C, όσο και στους 10 °C. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7, αφού η ανίχνευση όλων αυτών των στελεχών ήταν εφικτή μόνο μετά από εμπλουτισμό τους καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στις δύο θερμοκρασίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα στελέχη ή το μίγμα των στελεχών των εξετασθέντων παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus* και *E. coli* O157:H7 παρουσίασαν διαφορές στην αντιμικροβιακή συμπεριφορά με την προσθήκη όλων των αιθέριων ελαίων και του μίγματός τους σε συγκέντρωση 0.6% στο μυττωτό βόειου κρέατος, σε αντίθεση με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού 0.6% που παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των *S. enteritidis*, *S.*

typhimurium και του μίγματός τους. Επίσης, μετά την προσθήκη του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) παρατηρήθηκαν οι εξής διαφορές: Το στέλεχος Lmk της *L. monocytogenes* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητο από το στέλεχος Scott A και το μίγμα των στελεχών της *L. monocytogenes*. Το στέλεχος Sap του *S. aureus* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητο από το στέλεχος Sak και το μίγμα των στελεχών του *S. aureus*. Η *S. enteritidis* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητη από τη *S. typhimurium* και το μίγμα των στελεχών της *Salmonella*.

Αντίθετα, διαφορές παρουσιάστηκαν μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *Salmonella* στην προσθήκη των συνδυασμών των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη. Έτσι, το στέλεχος Lmk της *L. monocytogenes* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητο από το στέλεχος Scott A και το μίγμα των στελεχών στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) και στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) και (1000 IU/g). Αντίστοιχα, το στέλεχος Sap του *S. aureus* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητο από το στέλεχος Sak και το μίγμα των στελεχών στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) και στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g). Τέλος, η *S. enteritidis* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητη από τη *S. typhimurium* και το μίγμα τους στην προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) και (1000 IU/g). Σε συμφωνία με τα αποτελεσματα μας, άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή συμπεριφορά μεταξύ μεμονωμένων στελεχών των παθογόνων βακτηρίων ή μίγματος αυτών των στελεχών εξαρτάται από τις διαφορές μεταξύ των στελεχών αυτών ή της ανταγωνιστικής συμπεριφορά τους (Vignolo et al 2000, Whiting and Golden 2002). Είναι γνωστό, ότι οι διαφορές της αντιμικροβιακής

συμπεριφοράς μεταξύ των στελεχών ή του μίγματος ενός παθογόνου φανερώνονται σε ισχυρά αντίξοες συνθήκες (Jensen και συν. 1987).

Η αυξημένη συνεργός δράση όλων των εξετασθέντων αιθέριων ελαίων με τη νισίνη κατά των Gram – θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τόσο οι φαινολικές ουσίες των αιθέριων ελαίων όσο και η νισίνη, προσβάλλουν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων αυτών αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητά της και επομένως, η από κοινού δράση τους αυξάνει την αντιμικροβιακή τους δράση. Η συνεργός δράση της νισίνης με την καρβακρόλη και τη θυμόλη κατά της *L. monocytogenes*, αναφέρεται και από άλλους ερευνητές σε *in vitro* μελέτες (Pol και Smid 1999, Ettayebi και συν. 2002).

Η συνεργός δράση των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη κατά των Gram – αρνητικών μικροοργανισμών *Salmonella* και *E. coli* O157:H7 θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αποδόμηση της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης των Gram – αρνητικών βακτηρίων από τα φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων, γεγονός που επιτρέπει στη νισίνη να διαπερνά το «φραγμό» της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης και να δρα εναντίον του βακτηριακού κυττάρου. Η ποσότητα της νισίνης, που μπορεί να εισέλθει και να δράσει εναντίον του βακτηριακού κυττάρου, εξαρτάται από το βαθμό της βλάβης που προξενείται στην εξωτερική προστατευτική μεμβράνη από το αιθέριο έλαιο. Έτσι, όταν το αιθέριο έλαιο είχε ασθενή δράση κατά των παθογόνων, όπως το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου κατά της *S. enteritidis*, ορισμένη μόνο ποσότητα της νισίνης μπορούσε να διαπεράσει τον «φραγμό» της εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρατηρείται συνεργός αντιμικροβιακή δράση, η οποία δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των συνδυασμών του αιθέριου ελαίου με τη νισίνη στις 500 ή στις 1000 IU/g. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις που το αιθέριο έλαιο είχε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση και ως εκ τούτου είχε μεγαλύτερη

δράση κατά της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης, όπως η ρίγανη κατά της *S. enteritidis*, μεγαλύτερη ποσότητα νισίνης μπορούσε να εισέλθει και έτσι να παρουσιάζεται μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση στις 1000 IU/g από εκείνη με τις 500 IU/g. Όταν το έλαιο δεν παρουσίαζε δράση κατά του παθογόνου, όπως το δενδρολίβανο κατά των στελεχών της *E. coli* O157:H7, τότε η νισίνη δεν μπορούσε να δράσει εναντίον του βακτηριακού κυττάρου και συνεπώς δεν παρατηρούνταν συνεργός δράση.

Αξίζει να τονιστεί, ότι λόγω της βακτηριοστατικής δράσης κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) και του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος, τα μικροβιολογικά κριτήρια της Ε.Ε. που προβλέπουν πληθυσμούς του παθογόνου χαμηλότερους από 2 log cfu/g κατά τη συντήρηση στους 4 °C μπορεί να ικανοποιηθούν (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005). Η βακτηριοκτόνος δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και της *Salmonella* της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη σε συγκέντρωση 500 ή 1000 IU/g στο μυττωτό βοείου κρέατος, πληρεί τα μικροβιολογικά όρια στα τρόφιμα που έχουν τεθεί από την Ε.Ε. τόσο για τη *L. monocytogenes* (< 2 log cfu/g) όσο και για τη *Salmonella* (απουσία στα 25 g) κατά τη συντήρηση στους 4 °C (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.9% στο θρεπτικό ζωμό παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*, που ήταν αυξανόμενη από τη μικρότερη (0.3%) προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.9%). Η αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου και του συνδυασμού τους σε συγκέντρωση 0.3% σε TSB κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ασθενής καθόσον οι πληθυσμοί των παθογόνων, παρά την αρχική μείωση, αναπτύχθηκαν και έφτασαν σε υψηλούς πληθυσμούς, στο τέλος της επώασης. Η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων στη χαμηλότερη συγκέντρωση (0.3%) με τη νισίνη (500 ή 1000 IU/ml), έδειξε κατά κύριο λόγο, ότι παρουσίαζε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων βακτηρίων. Επειδή η μεμονωμένη προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.6 και 0.9% παρουσίασε γενικά πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των εξετασθέντων παθογόνων, δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν ανάλογα συμπεράσματα για συνεργό αντιμικροβιακή δράση της προσθήκης του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων στις συγκεντρώσεις αυτές με τη νισίνη.
- Ο οργανοληπτικός έλεγχος του μutton βόειου κρέατος μετά από προσθήκη αιθέριων ελαίων ρίγανης, θυμαριού, δενδρολίβανου καθώς και μίγματός τους σε συγκεντρώσεις 0.3 και 0.6%, έδειξε ότι τα εξετασθέντα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά (οσμή, γεύση και συνολική αποδοχή) μετά από θερμανσή τους παρέμειναν αποδεκτά από τους δοκιμαστές καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη, αφού αξιολογήθηκαν με βαθμολογίες πάνω από το όριο απόρριψης.

- Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων θυμαριού, δενδρολίβανου και του μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.9% στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που δεν ήταν αποδεκτά από τους δοκιμαστές, σε αντίθεση με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην ίδια συγκέντρωση (0.9%) που ήταν αποδεκτά από τους δοκιμαστές καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.
- Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6% και 0.9%) στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων *L. monocytogenes*, του *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και της *Salmonella* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4 ή στους 10 °C, για 12 ημέρες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και της *Salmonella* και βακτηριοκτόνο δράση κατά του *S. aureus*, κατά τη συντήρηση στους 4 και 10 °C.
- Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού, του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου και μίγματος των αιθέριων ελαίων σε συγκεντρώσεις 0.6% στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση, η οποία ήταν ισχυρότερη κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S.*

aureus) από εκείνη κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*Salmonella* και *E. coli* O157:H7).

- Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων κατά των παθογόνων *L. monocytogenes* και *S. aureus* μετά την προσθήκη τους σε συγκέντρωση 0.6% στο μυττωτό βόειου κρέατος μπορούσε να διαβαθμιστεί ως εξής: ρίγανη ή θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο. Η αντίστοιχη διαβάθμιση κατά της *S. enteritidis* και του μίγματος στελεχών της *Salmonella* ήταν η εξής: ρίγανη > θυμάρι > μίγμα αιθέριων ελαίων > δενδρολίβανο, ενώ κατά της *S. typhimurium* ως εξής: ρίγανη > μίγμα των αιθέριων ελαίων > θυμάρι ή δενδρολίβανο. Εξάλλου, η διαβάθμιση κατά της *E. coli* O157:H7 ήταν η εξής: ρίγανη > μίγμα αιθέριων ελαίων > θυμάρι > δενδρολίβανο.
- Η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g σε μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram – θετικών βακτηρίων (*L. monocytogenes* και *S. aureus*) κατά τη συντήρηση στους 4 και 10 °C για 12 ημέρες. Αντίθετα, η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 IU/g σε μυττωτό βόειου κρέατος δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση κατά των Gram – αρνητικών βακτηρίων, *Salmonella* και *E. coli* O157:H7, κατά τη συντήρηση στους 4 και 10 °C. Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης βρέθηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της, από τα στελέχη των παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και από τη θερμοκρασία συντήρησης.

- Η προσθήκη του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης (0.6 ή 0.9%) και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 4 και 10 °C, παρουσίασε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά όλων των εξετασθέντων παθογόνων (*L. monocytogenes*, του *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 και *Salmonella*). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) παρουσίασε συνεργό δράση κατά της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *S. enteritidis* όχι όμως κατά των στελεχών της *E. coli* O157:H7, της *S. typhimurium* και του μίγματος των στελεχών της *Salmonella*.
- Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes*, της *S. enteritidis* και του μίγματος των στελεχών της *Salmonella*, ενώ παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά του *S. aureus*. Αντίστοιχα, η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και βακτηριοκτόνο δράση κατά του *S. aureus*. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.9%) με τη νισίνη (500 και 1000 IU/g) στο μυττωτό βόειου κρέατος παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση κατά όλων των στελεχών της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *Salmonella* κατά τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4 °C, όσο και στους 10 °C. Η προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.9%) με

τη νισίνη (1000 IU/g) παρουσίασε βακτηριοστατική δράση κατά όλων των στελεχών της *E. coli* O157:H7.

- Τα στελέχη ή το μίγμα των στελεχών των εξετασθέντων παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus* και *E. coli* O157:H7 παρουσίασαν διαφορές στην αντιμικροβιακή συμπεριφορά με την προσθήκη όλων των αιθέριων ελαίων και του μίγματός τους σε συγκέντρωση 0.6% στο μυττωτό βόειου κρέατος, σε αντίθεση με την προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού 0.6% που παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των *S. enteritidis*, *S. typhimurium* και του μίγματός τους. Επίσης, μετά την προσθήκη του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) παρατηρήθηκαν οι εξής διαφορές: Το στέλεχος Lmk της *L. monocytogenes* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητο από το στέλεχος Scott A και το μίγμα των στελεχών της *L. monocytogenes*. Το στέλεχος Sap του *S. aureus* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητο από το στέλεχος Sak και το μίγμα των στελεχών του *S. aureus*. Η *S. enteritidis* παρουσιάστηκε πιο ευαίσθητη από τη *S. typhimurium* και το μίγμα των στελεχών της *Salmonella*. Αντίθετα, διαφορές παρουσιάστηκαν μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes*, του *S. aureus* και της *Salmonella* στην προσθήκη των συνδυασμών των αιθέριων ελαίων με τη νισίνη. Έτσι, το στέλεχος Lmk της *L. monocytogenes* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητο από το στέλεχος Scott A και το μίγμα των στελεχών στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) και στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) και (1000 IU/g). Αντίστοιχα, το στέλεχος Sap του *S. aureus* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητο από το στέλεχος Sak και το μίγμα των στελεχών στην προσθήκη

του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.6 %) με τη νισίνη (500 IU/g) και στην προσθήκη του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g). Τέλος, η *S. enteritidis* παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητη από τη *S. typhimurium* και το μίγμα τους στην προσθήκη του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου (0.6%) με τη νισίνη (500 IU/g) και (1000 IU/g).

- Λόγω της βακτηριοστατικής δράσης κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) και του συνδυασμού των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού (0.6%) με τη νισίνη (1000 IU/g) στο μυττωτό βοείου κρέατος, τα μικροβιολογικά κριτήρια της Ε.Ε. που προβλέπουν πληθυσμούς του παθογόνου χαμηλότερους από 2 log cfu/g κατά τη συντήρηση στους 4 °C μπορεί να ικανοποιηθούν (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005). Η βακτηριοκτόνος δράση κατά των στελεχών της *L. monocytogenes* και της *Salmonella* της προσθήκης του συνδυασμού του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (0.9%) με τη νισίνη σε συγκέντρωση 500 ή 1000 IU/g στο μυττωτό βοείου κρέατος, πληρεί τα μικροβιολογικά όρια στα τρόφιμα που έχουν τεθεί από την Ε.Ε. τόσο για τη *L. monocytogenes* (< 2 log cfu/g) όσο και για τη *Salmonella* (απουσία στα 25 g) κατά τη συντήρηση στους 4 °C (Κανονισμός της Ε.Ε. 2073, 2005).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Aasen IM, Markussen S, Moretro T, Katla T, Axelsson L, Naterstad K (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*. 87, 35-43.
- Abdalla AE and Roozen JP (2001). The effects of stabilised extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. *European Food Research and Technology*. 212, 551-560.
- Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1962–1968.
- Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M (1998). Antifungal activities of *Oreganum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Levandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1739-1745.
- Ahmed S and Donaghy M (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Eds Kaper J and O'Brien A. ASM Press, Washington DC. pp: 59-65.
- Ahn J, Grun IU, Mustapha A (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *Journal of Food Protection* 67, 148–155.
- Alzoreky NS and Nakahara K (2002). Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. 80, 223–230.
- AMSA (1995). *Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat*. Chicago, IL. American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board.
- Aureli P, Costantini A, Zolea S (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55, 344–348.
- A.N.K.O. A.E. (1999). Επιχειρησιακό Σχέδιο για τη σύσταση και λειτουργία επιχείρησης επιχείρησης Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών. Κοζάνη.
- Bagamboula CF, Uyttendaele M, Dabevere J (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21, 33-42.
- Bauer K, Garbe D (1985). *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 213.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
- Benz R, Junk G, Sahl HG (1991). Mechanism of channel formation by lantibiotics in black lipid membranes. In: *Nisin and Novel Lantibiotics*, Escom, Leiden,,: 359-372.
- Bergdoll MS (1989). *Staphylococcus aureus*. In *Foodborne Bacterial Pathogens*. Ed. MP Doyle. Marcel Dekker Inc. New York. pp: 327-445.
- Beuchat LR (1976). Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food Science* 41, 899-902.

- Bierbaum G, Sahl HG (1987). Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22, influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanineamidase, *Journal of Bacteriology* 169, 5452-5458.
- Bille J (1990). Epidemiology of listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. pp. 71-74, *in*: Miller, Smith & Somkuti.
- Botsoglou NA, Yannakopoulos AL, Fletouris DJ, Tserveni-Goussi AS, Fortomaris PD (1997). Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 3711- 3716.
- Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB (2002 α). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*. 62, 259-265.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki G, Spais AB (2002 β). Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and atocopherol acetate supplementation. *Food Research International*. 36, 207-213.
- Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou E, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G (2003 α). Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in longterm frozen turkey meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2930-2936.
- Botsoglou NA, Grigoropoulou SH, Botsoglou EN, Govaris A, Papageorgiou G (2003 β). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate in lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science* 65, 1193-1200.
- Bower C, McGuire J, Daeschel M (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 992-997.
- Boyle W (1955) Spices and essential oils as preservatives. *American Perfum and Essential Oil Review* 66, 25– 28.
- Boziaris IS, Adams MR (2001). Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives, *Journal of Applied Microbiology* 91, 715-724.
- Breukink E, von Kraaij C, Demel RA, Siezen RJ, Kuipers OP, de Kruijff B (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry* 36, 6968-6976.
- Breukink E, de Kruijff B (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochemistry and Biophysics Acta* 1462, 223-234.
- Brewer R, Adams MR, Park SF (2002). Enhancement inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol, *Letters and Applied Microbiology* 34, 18-21.
- Broome CV, Gellin B, Schwartz B (1990). Epidemiology of listeriosis in the United States. pp. 61–65, *in*: A.J. Miller, J.L. Smith and G.A. Somkuti (eds). *Foodborne Listeriosis*. New York NY: Elsevier Science Pub.
- Brötz H, Josten M, Wiedemann I, Schneider U, Götz F, Bierbaum G (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and others lantibiotics, *Molecular Microbiology* 30, 317-327.

- Brumfitt W, Salton MRJ and Hamilton-Miller JMT (2002). Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 731–734
- Bullerman LB, Lieu FY, Seiler SA (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*. 42, 1107-1109.
- Burt SA, Reinders RD (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36, 162-167.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*
- Caillet S, Shareck F, Lacroix M (2005). Effect of Gamma Radiation and Oregano Essential Oil on Murein and ATP Concentration of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 68, 2571-2579.
- Calpouzios L (1954) Botanical aspects of oregano. *Econ. Bot.* 8:222-233.
- Castellano P, Farías ME, Holzapfel W, Vignolo G (2001). Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnology Letters* 23, 605-608.
- Catizone P, Marotti M, Toderi G, Tetenyi P (1986). *Colti Vazione delle Piante Medicinali e Aromatiche*; Patron editore, Bologna, Italy.
- Chan WC, Leyland ML, Clark J, Dodd HM, Lian LY, Gasson MJ (1996). Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. *FEBS Letters*. 390, 129-132.
- Chaibi A, Ababouch LH, Belasri K, Boucetta S, Busta FF (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology* 14, 161-174.
- Charai M, Mosaddak M, Faid M (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Oreganum majorama* L and *Oreganum compactum*. *Journal of Essential Oil Research* 8, 657-664.
- Chatterjee D (1990). Inhibition of fungal growth and infection in maize grains by spice oils. *Letters in Applied Microbiology* 11, 148-151.
- Chen CH, Pearson AM, Gray JJ (1992). Effects of synthetic antioxidants. (BHA, BHT, PG) on the mutagenic IQ-like compounds. *Food Chemistry*. 45, 177-183.
- Chiasson F, Borsa J, Quattara B, Lacroix M (2004). Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi in Ground Beef. *Journal of Food Protection* 67, 1157–1162.
- Chikindas ML, Montville TJ (2002). Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Control of foodborne microorganisms, Marcel Dekker, New York, :303-321.
- Cindas LM, Casaus MP, Fernandez MF, Hernandez PE (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15, 289-298.

- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.
- Coma V, Sebti J, Pardon P, Deschamps A, Pichavant FH (2001). Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 64, 470-475.
- Commission Regulation (EC) No 1565/2000 of 18 July 2000 laying down the measures necessary for the adoption of an evaluation programme in application of Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council: Official Journal L180 19/07/2000, pp. 8 – 16.
- Commission Decision of 23 January 2002 amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC: Official Journal L49 20/02/2002, pp. 1 –160.
- Conner DE and Beuchat LR (1984) Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science* 49, 429-434.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130– 135.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175.
- Cutter CN, Siragusa GR (1994). Decontamination of beef carcasses tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiology* 11, 481-489.
- Cutter CN, Siragusa GR (1995a). Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection* 58, 977-983.
- Cutter CN, Siragusa GR (1995b). Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection* 58, 1028-1030.
- Cutter CN, Siragusa GR (1998). Incorporation of nisin into meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Letters in Applied Microbiology*. 27, 19-23.
- Daferera D, Ziogas BN, Polissiou MG (2000). GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2576-2581
- Davies EA, Bevis HE, Delves-Broughton J (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 24, 343-346.
- Daouk RK, Dagher SM, Sattout EJ (1995). Antifungal activity of the essential oil of *origanum syrianum* L., *Journal of Food Protection* 58, 1147-1149.
- D'Aoust J, Park C, Szabo R, Todd E, Emmons B, McKellar R (1988). Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica* and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 71, 3230-3236.

- D'Aoust JY (1989). *Salmonella*. In Foodborne Bacterial Pathogens. Ed. MP Doyle. Marcel Dekker Inc. New York. pp: 327-445.
- D'Aoust JY (1991). Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 13, 207-216.
- Daw ZY, El-Baroty GE, Mahmoud AM (1995). Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production by some essential oils. *Journal of African Crop Science* 3, 511-517.
- Deighton N, Glidewell SM, Deans SG, Goodman BA (1993). Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free-radicals in the oxidation of plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Science* 63, 221-225.
- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101-109.
- Delves-Broughton J (1993). The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria. *International Biodeterior Biodegradation*, 32, 87-97.
- De Vuyst L, Vandamme EJ (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp:151-221.
- Djenane D, Sanchez-Escalante A, Beltran JA, Roncales P (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry* 76, 407-415.
- Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G, Salamoura A, Kansouzidou A, Levidiotou S (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 82, 273-279.
- Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou V, Kansouzidou A, Levidiotou S (2004). Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece. *Comparative and Immunological Microbiology Infection Disease* 27, 201-207.
- Dorman HJD and Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- Doyle MP and Shoeni JL (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 855-856.
- Droffner ML, Yamamoto N (1992). Procedure for isolation of *Escherichia*, *Salmonella* and *Pseudomonas* mutants capable of growth at the refractory temperature of 54⁰ C. *Journal of Microbiological Methods* 14, 201-206.
- Dykes GA, Amarowicz R, Pegg RB (2003). Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiology* 20, 211-216.
- EC (1999). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*, 23 September 1999. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General (SANCO).
- Economou KD, Oreopoulou V, Thomopoulos CD (1991). Antioxidant properties of some plant extracts of the *Labiatae* family. *Journal of American Oil Chemistry Society* 68, 109-113.

- Einarsson H, Lauzon HL (1995). Biopreservation of brined shrimp (*pandalus-borealis*) by bacteriocins from lactic-acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 669-676.
- EFSA (2004). 2004 Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the EU. http://www.efsa.europa.eu/en/publications/annual_reports/1500.html
- El-Baroty GE (1997). Antimicrobial and antioxidant activities of some essential spice oils. *Journal of Agricultural Science of Mansoura University* 22, 1223-1233.
- Ettayebi K, Yamani JE and Rossi-Hassani BD (2002). Synergistic effect of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*. 183, 191–195.
- Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and Summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5294-5299.
- Fang TJ, Lin LW (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination. *Journal of Food Protection* 57, 479-485.
- Fang T J and Tsai HC (2003). Growth patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology* 20, 243–253.
- Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52, 665-667.
- FDA (US Food & Drug Administration)/Federal Register (1988). Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human ingredient. 21 CFR Part 184, Fed Reg 53:11247-11251.
- FDA/FSIS (2001). Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA) and Food Safety Inspection Service (USDA) (Available at: www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html). [Report published September 2003 as: Quantitative assessment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available at: www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html].
- Ferreira MASS, Lund BM (1996). The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Letters in Applied Microbiology* 22, 433-438.
- Fleisher A and Sneer N (1982). Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of Science of Food and Agriculture* 33, 441-446.
- Fleisher A and Fleisher Z (1988). Identification of Biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano group herbs in the Mediterranean region. *Econ. Bot.* 42:232-241.
- Force M, Sparks S, Ronzio R (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano *in vivo*. *Phytotherapy Research*. 14, 213-214.
- Frazer AC, Sharratt M, Hickman JR (1962). The biological effects of food additives. I. Nisin, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 13, 32-42.

- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. 65, 1545-1560.
- Friedman M, Buick R, Elliott T (2004). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 67, 1774-78.
- Genigeorgis CA (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*. 9, 327-360.
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G (2000). In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 38, 115–118.
- Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB (2003) Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *E. tenella*. *Archives of Animal Nutrition*. 57, 99-106.
- Glass K, Loeffelholz J, Ford J, Doyle MP (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride in fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2513-2516.
- Govaris A, Solomakos N, Rodi A, Papageorgiou D (2002) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw cow's milk in Greece. Proceedings of 3rd Hellenic Symposium on Food Hygiene & Food Technology. Vol B, 49-51.
- Govaris A, Botsoglou N, Papageorgiou G, Botsoglou E, Ambrosiadis I (2004) Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or alpha-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 55, 115-123.
- Govaris A, Solomakos N, Rodi A and Botsoglou E. (2005) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ewe's milk in Greece. Proceedings of 6th International Sheep Veterinary Congress. 185-186.
- Govaris A, Solomakos N, Rodi A, Papageorgiou D (2006) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw goat's milk in Greece. Proceedings of 10th Hellenic Veterinary Congress. 39.
- Greer GG and Jones SDM (1991). Effects of lactic acid and vacuum packaging on beef processed in a research abattoir. *Canadian Industry Food Science and Technology Journal*. 24, 161-168.
- Guenther E (1948). *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 194–198.
- Greuter W, Burdel HM, Long G (1986) Medical Check list. In Editions de conservatoire de Jardin Botaniques de la Ville de Geneve. Vol 3.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 985– 990.
- Haeghebaert S, Le Querrec F, Gallay A, Bouvet P, Gomez M, Vaillant V (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bulletin of Epidemiology*. 23, 105-109.

- Han J, Rhee KS (2005). Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. *Meat Science*. 70, 25-33.
- Hao YY, Brackett RE, Doyle MP (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiology*. 15, 367-378.
- Hargreaves LL, Jarvis B, Rawlinson AP, Wood JM (1975) The antimicrobial effect of spices, herbs, and other extracts from these and other food plants. The British food manufacturing industries research association scientific and technical surveys No 88.
- Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection* 66, 410–417.
- Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 3590–3595.
- Helander IM and Mattila-Sandholm T (2000). Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin *International Journal of Food Microbiology*. 60, 153–161.
- Hikotoko H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S, Kurata H (1980). Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 39, 818-822.
- Hirsch A, Grinsted E, Chapman HR, Mattick ATR (1951). A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *Journal of Dairy Research*. 18, 205-206.
- Hoffmann A, Pag U, Wiedemann I, Sahl HG (2001). Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Il Farmaco*. 57, 685-691.
- Holley RA and Patel D (2005). Review. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22, 273-292.
- Hudaib M, Speroni E, Di Pietra AM, Cavrini V (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutics and Biomedicine*. 29, 691-700.
- Hurst A, Hoover DG (1993) Nisin. In: Antimicrobials in foods, Marcel Dekker Inc, New York, :369-407.
- Ibrir F, Greathead HMR, Forbes JM (2001). The effect of thymol/carvacrol on the performance of broiler chickens infected with *Eimeria acervulina*. Proceedings of workshop on alternatives to feed antibiotics and anticoccidials in the Pig and Poultry Meat Production, Oslo, Norway.
- Imaida K, Fukushima S, Shirai T, Ohtami M, Nakamishi K, Ito N (1983). Promoting activities by butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl trans-peptide-positive for development in the liver of rat. *Carcinogen*, 4, 895-899.

- Ismael AA and Pierson MD (1990). Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection*. 53, 958– 960.
- Jack RW, Benz R, Tagg JR, Sahl HG (1994). The mode of action of SA-FF22, a lantibiotic isolated from *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *European Journal of Biochemistry*. 219, 669-705.
- Jay JM (2000) *Modern food microbiology*. 6th ed., Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA pp: 679.
- Jensen MM, Genigeorgis D, Lindroth S (1987) Probability of growth of *Clostridium botulinum* as affected by strain, cell and serologic type, inoculum size and temperature and time of incubation in model broth system. *Journal of Food Safety*. 8, 109-126.
- Joerger RD, Hoover DG, Barefoot SF, Harmon KM, Grinstead DA, Nettles-Cutter CG (2000). Bacteriocins, In: Encyclopedia of microbiology, vol 1, 2nd ed, Academic Press, San Diego, pp:389-397.
- Judis J (1963). Studies on the mechanisms of action of phenolic disinfectants II, Patterns of release of radioactivity from *Escherichia coli* labeled by growth on various compounds. *Journal of Pharmacology Science*. 52, 261-264.
- Juglal S, Govinden R, Odhav B (2002). Spice oils for the control of co-occurring Mycotoxin-Producing Fungi. *Journal of Food Protection*. 65, 683-687.
- Juliano C, Mattana A, Usai M (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*. 4, 516-522.
- Juven B, Henis J, Jacoby B (1972). Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology*. 35, 559-567.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 626– 631.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. 76, 183-186.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PS, Arbus GC, Lior H (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by vero-toxin producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 151, 775-782.
- Kim J, Marshall MR, Wei C (1995). Antimicrobial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2839–2845.
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1, 119– 128.
- Kokkini S, Vokou D, Karousou R (1989). Essential oil yield of Lamiaceae plants in Greece. pp. 5-12 in Biosciences (S.C. Hatacharyya, N. Sen and K.L. Sethi, eds.). Proc. 11th Int. Congress Essential Oils, Fragrances and Flavours. Vol. 3. Oxford and IBH, New Dehli.
- Kokkini S, Vokou D, Karousou R (1991) Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. *Botanical Chronicle*. 10, 337-346.

- Kokkini S (1994) Herbs of the Labiateae. In Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. (eds. Macrae R, Robinson R, Sadler M, Fuellerlove G. Academic Press, London. Pp2342-2348.
- Kokkini S (1996) Taxonomy, Diversity and Distribution of *Oreganum* species. *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano 8-12 May 1996 CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.* pp:1-12.
- Kotini-Zambaka S (1983) Contribution to the monthly study of the climate of Greece. PhD thesis. University of Thessaloniki, Thessaloniki.
- Koutsoumanis K, Lambropoulou K, Nychas GJE (1999). A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology.* 49, 63-74.
- Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* 197, 20-23.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychaw GJE (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology.* 91, 453-462.
- Lawrence BM (1984) The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Flavorist.* 9, 41-51.
- Lee KG and Shibamoto T (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 4947-4952.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research.* 2, 63-76.
- Lin YT, Labbe RG, Shetty K (2005). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology.* 70, 5672–5678.
- Lis-Balchin M, Buchbauer G, Hirtenlehner T, Resch M (1998). Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology.* 27, 207–210.
- Liu W, Hansen JN (1993). The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology.* 59, 648-651.
- Lou Y and Yousef AE (1999). Characteristics of *L. monocytogenes* important to food processors. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Eds Raser ET and Marth EH, Marcel Dekker Inc. New York. pp: 131-224.
- Lück E and Jager M (1997). Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects. Springer, Berlin,:260.
- Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Japan Journal of Pharmacology.* 44, 77–84.

- Marino M, Bersani C, Comi G (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* measured using a biopedometric method. *Journal of Food Protection*. 62, 1017-23.
- Marino M, Bersani C, Comi G (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 67, 187–195
- Mattick ATR and Hirsch A (1947). Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2, 5-8.
- Mazzotta AS and Montville TJ (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 °C and 30 °C. *Journal of Applied Microbiology*. 82, 32-38.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5, 607-625.
- Mejlholm O and Dalgaard P (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34, 27– 31.
- Meng J and Doyle MP (1998). Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Eds Kaper J and O'Brien A. ASM Press, Washington DC. pp: 92-111.
- Michino H, Araki K, Minami S, Nakayama T, Ejima Y, Hiroe K, Tanaka H, Fujita N, Usami S, Yonekawa M, Sadamoto K, Takaya S, Sakai N (1998). Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Eds Kaper J and O'Brien A. ASM Press, Washington DC. pp: 73-81.
- Milos M, Mastelic J, Jerkovic I (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum*). *Food Control*. 71, 79-83.
- Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*. 5, 797-814.
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*. 40, 223-231.
- Mulders JWM, Boerrigter IJ, Rollema HS, Siezen RJ, de Vos WM (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a structural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*. 201, 581-584.
- Murari Colalongo G (1988). *Formulario Pratico di Fitoterapia*; SEPTEM: Milano, Italy.
- Nikaido H (1996). Outer membrane, In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington DC,;29-47.
- Nilsson L, Huss HH, Gram L (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*. 38, 217-227.

- Nissen H, Holo H, Axelsson L, Blom H (2001). Characterization and growth of *Bacillus spp.* in heat-treated cream with or without nisin. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 530-534.
- Nykänen A, Weckman K, Lepveteläinen A (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*. 61, 63-72.
- Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8, 207-215.
- Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 448-451.
- O' Leary WM, Wilkinson SG (1988) In: *Microbial Lipids*, vol 1, Academic press, New York,:117-201.
- Oosterhaven K, Poolman B, Smid EJ (1995) S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Industrial Crop Products*. 4, 23-31.
- Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M (2006). Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Food Protection*. 69, 2364-2369.
- Ozcan M and Osman E (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*. 212, 658-660.
- Ozcan G, Sagdic O, Ozcan M (2003). Note: Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*. 9, 85-88.
- Οδηγία 95/2/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20^{ης} Φεβρουαρίου 1995 για τα πρόσθετα τροφίμων.
- O.H.E. (1999) United Nations International Trade Yearbook 1999.
- Packiyasothy EV, Kyle S (2002). Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*. 54, 384-387.
- Pandit VA and Shelef LA (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Food Microbiology*. 11, 57-63.
- Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M (1995). Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends in Microbiology*. 3, 253-255.
- Papageorgiou G, Botsoglou NA, Govaris A, Giannenas I, Iliadis S, Botsoglou EN (2003). Effect of dietary oregano essential oil and alpa-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 87, 324-335.
- Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaongar KN, Barbuddle SB (2000). Effect of nisin and its components with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Science*. 56, 215-219.

- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. 17, 5–19.
- Pol IE and Smid EJ (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 29, 166–170.
- Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW (2000). Supplement 1998 (no.42) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 151, 63-65.
- Quattara B, Simard RE, Holley RA, Piette G J-P, Begin A (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 37, 155-162.
- Quattara B, Sabato SF, Lacroix M (2001). Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology*. 68, 1–9.
- Rayman K, Aris B, Hurst A (1981). Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental Microbiology*. 41, 375-380.
- Rayman K, Malik N, Hurst A (1983) Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. *Applied and Environmental Microbiology*. 46, 1450-1452.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson et al. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*. 308, 681-685.
- Rogers LA, Whittier EO (1928). Limiting factors in lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*. 16, 211-229.
- Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 67, 1252–1256.
- Rouso M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A (1998). Essential oil composition wild populations of Italy oregano spice (*Oreganum vulgare ssp hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis 1. Inflorescens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 3741-3746.
- Ruhr E, Sahl HG (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27, 841-845.
- Rybca-Rodgers S (2001) Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Res Int*. 34:449-455.
- Sahl HG, Brandis H (1982). Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep5 and culture conditions effecting its activity. *Zbl Bacteriology and Hygiene*. 252, 166-175.
- Sahl HG and Brandis H (1983). Efflux of low-Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent Pep5. *FEMS Microbiology Letters*. 16, 75-79.
- Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 19, 473-480.

- Sagdic O (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebens und Technol.* 36, 467-473.
- Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG (2003). Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiology.* 20, 661-669.
- Sanchez-Escalante A, Djenane D, Torrescano G, Beltran JA, Roncales P (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science.* 58, 421-429.
- Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lactacin 3147 and Nisaplin (R). *International Journal of Food Microbiology.* 60, 241-249.
- Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W (1990). Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology.* 11, 1-19.
- Schved F, Henis Y, Juven BJ (1994). Responce of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *International Journal of Food Microbiology.* 21, 305-314.
- Senatore F (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides L.*) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44, 1327-1332.
- Shahamat M, Seaman A, Woodbine M (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentbl Bakteriologie Hygiene Abt 1 Orig A.* 246, 506-511.
- Shelef LA (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety.* 6, 29-44.
- Shtenberg AJ, Ignatev AD (1970). Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food and Cosmetic Toxicology,* 8, 369-380.
- Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biology and Chemistry.* 269, 8022-8028.
- Singh B, Falahee B, Adams MR (2001) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiol,* 18:133-139.
- Singh A, Singh RK, Bhunia AK, Singh N (2003). Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm- Wiss Technology.* 36, 787-794.
- Siragusa GR, Cutter CN, Willett JL (1999). Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology.* 16, 229-235.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M (1996) Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44, 1202-1205.
- Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M (1997). Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, 3197-3201.

- Skandamis P and Nychas GJE (2000). Development and validation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in home-made eggplant under various temperatures, pH and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 1646–1653.
- Skandamis P, Tsigarida E, Nychas GJE (2000). Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within gelatine gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16, 31-35.
- Skandamis P and Nychas GJE (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of mince meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 1011 – 1022.
- Skandamis PN, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas GJE (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*. 13, 65-75.
- Skandamis PN, Davies KW, McClure PJ, Koutsoumanis K, Tassou C (2002 α) A vitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. *Food Microbiol*. 19:405-421.
- Skandamis PN, Tsigarida E, Nychas GJE (2002 β) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19, 97-103.
- Smid EJ, Gorris LGM (1999) Natural antimicrobials for food preservation. In: Handbook of Food Preservation. (Ed. Rahman, M.S.) Marcel Dekker, New York, pp. 285–308.
- Smith-Palmer A, Steward J, Fyfe L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 118-122.
- Soliman KM and Badeaa RI (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemistry and Toxicology*. 40, 1669-1675.
- Stergiou VA, Thomas LV, Adams MR (2006). Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat. *Journal of Food Protection*. 69, 951-956.
- Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 3612-3615.
- Taylor JL, Hirsch A, Mattick ATR (1949). The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Veterinary Record*. 61, 197-198.
- Taylor SL, Somers EB, Krueger LA (1985) Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J Food Prot*, 48:234-239.
- Thomas L and Wimpeny JWT (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2006–2012.
- Thomas LV and Isak T (2006). Nisin synergy with natural antioxidant extracts of the herb rosemary. *Acta Horticulturae*. 709, 109-114.

- Thoroski J, Blank G, Biliaderis C (1989) Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 52: 399– 403.
- Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology.* 89, 901–909.
- Tunc I, Berger B, Erler F, Dagli F (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of stored Products Research*, 36, 161-168.
- Ultee A, Kets EPW, Smid EJ (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 65:4606-4610.
- Ultee A and Smid EJ (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology.* 64, 373–378.
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology.* 174, 233– 238.
- Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 68, 1561–1568. PhD thesis, ISBN 90 5808-219-9.
- Valero M, Salmeron MC (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology.* 85, 73-81.
- Van de Braak SAAJ and Leijten GCJJ (1999) Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Van Welie RTH (1997) Alle cosmetica ingredienten en hun functies. Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein, p. 126.
- Vekiari SA, Oreopoulou V, Tzia C, Thomopoulos CD (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society.* 70, 483-487.
- Venturini ME, Blanco D, Oria R (2002). In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection.* 65, 834-839.
- Vignolo G, Palacios J, Farias ME, Sesma F, Schillinger U, Holzapfel W, Oliver G (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology.* 41, 410-416.
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1988) *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece. Distribution, volatile oil yield, and composition. *Econ Bot.* 42:407-412.
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1993) Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemistry and Systematic Ecology.* 21, 287-295.
- Weiss RF (1988). Herbal Medicine. Beaconsfield Publishers: Beaconsfield, U.K., 185-186.
- Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology.* 18, 512-520.

- WHO/FAO (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. INTERPRETATIVE SUMMARY. pp: 8.
- WHO Global Salm-Surv (2004) WHO Global Salm-Surv Progress Report. p:25.
- Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom 1969-1990. *Epidemiology and Infections*. 110, 519-531.
- Williams RB (1997). Laboratory tests of phenolic disinfectants as oocysticides against the chicken coccidium *Eimeria tenella*. *Veterinary Record*. 141, 447-448.
- Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N (2004). Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology*. 21, 283-289.
- Yanishlieva NY, Marinova EM, Gordon MH, Ravena VG (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*. 64:59-66.
- Yano Y, Satomi M, Oikawa H (2006). Antimicrobial activity of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 111, 6-11.
- Zaika L and Kissinger JC (1981) Inhibitory and stimulating effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J Food Sci*. 46:1205-1210.
- Zhao T and Doyle MP (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection*. 57, 780-783.
- Zottola EA, Yezzi TL, Ajao DB, Roberts RF (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 227-238.
- Zuckerman H and Avraham RB (2002). Control of growth of *Listeria monocytogenes* in fresh salmon using Microgard^(TM) and nisin. *Lebensmittel und Wiis Technology*. 35, 543-548.