

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ & ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**«Χρήση Όζοντος ως Απολυμαντικό Μέσο σε Δρόγες Αρωματικών Φυτών»**

**Μάρθα Καζή**

**Βόλος 2016**

Χρήση Όζοντος ως Απολυμαντικό Μέσο σε Δρόγες Αρωματικών Φυτών

Καζή Μάρθα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λύκας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Ανθοκομία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων

Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογία - Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Μποζιάρης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή & Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Copyright © *KAZH MAPΘA*, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα από τον Νοέμβριο του 2015 έως τον Σεπτέμβριο του 2016.

Τα αποτελέσματα που εξάγονται στις σελίδες που ακολουθούν αποτελούν το επιστέγασμα πολύωρης εργασίας και συνεχούς συνεργασίας με μία σειρά ανθρώπων που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη.

Στο πλαίσιο αυτό οφείλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Χ. Λύκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, τη συνεχή καθοδήγηση αλλά και για την αμεσότητα και το συμβουλευτικό του ρόλο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον κύριο Ε. Βέλλιο, Επίκουρο Καθηγητή στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη βοήθειά του σε εξοπλισμό και υλικά, και την καθοδήγησή του σε ζητήματα που αφορούσαν στη ταυτοποίηση μυκήτων. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω επίσης στον κύριο Ι. Μποζιάρη Αναπληρωτή Καθηγητή στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις συμβουλές του και την παροχή του εξοπλισμού και των υλικών κατά τη διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων.

Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην ερευνήτρια Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια των μικροβιολογικών αναλύσεων και την Παναγιωτάκη Ευαγγελία για τη συνεισφορά των γνώσεών της στη διεξαγωγή της ταυτοποίησης μυκήτων.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω, την οικογένειά μου για τα όσα έχει κάνει για μένα, τους καρδιακούς μου φίλους για την στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

## Περίληψη

Τα Αρωματικά Φυτά μπορούν να εκτεθούν σε ένα μεγάλο εύρος μικροβιακής επιμόλυνσης τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή. Επομένως, μπορούν να παρουσιάσουν υψηλό μικροβιακό φορτίο συμπεριλαμβανομένων παθογόνων και μικροοργανισμών που παράγουν τοξίνες. Αυτό τα καθιστά ως δυνητική πηγή κινδύνου για την υγεία όταν καταναλώνονται ως πρόσθετα σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα τα οποία δεν υπόκεινται σε περαιτέρω επεξεργασία.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του όζοντος στον περιορισμό του μικροβιακού φορτίου των δρογών των αρωματικών φυτών, καθώς και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους.

Αρχικά, μελετήθηκε το μικροβιακό φορτίο 5 δειγμάτων αποξηραμένων φαρμακευτικών φυτών (δρόγες) και συγκεκριμένα στη Ρίγανη, το Θυμάρι, το Τσάι του βουνού, τη Λουίζα και το Χαμομήλι. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν με τυχαία δειγματοληψία αποικίες μυκήτων προκειμένου να ταυτοποιηθούν. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν αποστάξεις ώστε να ελεγχθεί ποσοτικά το αιθέριο έλαιο κάθε μιας εκ των πέντε δρογών.

Κατόπιν, εφαρμόστηκε όζον με δυο μεταχειρίσεις ίδιας συγκέντρωσης (4 ppm) για διάρκεια 30 min και 60 min αντίστοιχα, προκειμένου να εξεταστεί η επίδρασή του τόσο στον περιορισμό του μικροβιακού φορτίου των δρογών όσο και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Ακολούθησε μικροβιολογική ανάλυση του φυτικού υλικού μετά τον οζονισμό προκειμένου να προσδιοριστεί η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου και να επιλεγεί η καλύτερη μεταχείριση για την κάθε δρόγη. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν αποστάξεις προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση όζοντος στην ποιοτική υποβάθμιση των αιθέριων ελαίων.

Η εφαρμογή όζοντος παρουσίασε θετικά αποτελέσματα ως προς τη μείωση του μικροβιακού φορτίου στο σύνολό του καθώς και στην μείωση του πληθυσμού των μυκήτων που θεωρήθηκαν ύποπτοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Ωστόσο, δεν παρουσίασε την ίδια αποτελεσματικότητα στον περιορισμό του μικροβιακού φορτίου της κάθε δρόγης.

Αναφορικά με το φορτίο των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, προέκυψε ότι μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού εμφανίστηκε στο χαμομήλι και το θυμάρι (2,2 λογάριθμους) και μικρότερη στο τσάι (1,6 λογάριθμο). Σε σχέση με το φορτίο της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), η μεγαλύτερη μείωση εμφανίστηκε στη ρίγανη (3 λογάριθμους) ακολούθως στο χαμομήλι (2,2 λογάριθμους) και η μικρότερη στο θυμάρι (1,5 λογάριθμο). Στη λουίζα και στο τσάι δεν παρουσιάστηκε μείωση μεγαλύτερη από 1,5 λογάριθμους (1,3 και 0,7 αντίστοιχα). Όσον αφορά το σύνολο του φορτίου των ζυμών και των μυκήτων, η μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού παρατηρήθηκε στη λουίζα (1,6 λογάριθμους),

ακολουθώς στο θυμάρι (1 λογάριθμο) και τέλος στο τσάι με (0,7 λογάριθμους). Ακόμη, στην περίπτωση της ρίγανης και του χαμομηλιού το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης.

Οι μύκητες που απομονώθηκαν αρχικά αφορούσαν τα γένη *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Ulocladium* spp. και *Fusarium* spp. Οι μύκητες που ταυτοποιήθηκαν μετά τον οζονισμό του τσαγιού και του θυμαριού αφορούσαν τα γένη *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp.

Η ποσότητα του παραλαμβανόμενου αιθέριου ελαίου δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε καμία από τις δρόγες που μελετήθηκαν.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η χρήση όζοντος ως μέθοδος επεξεργασίας δρογών αρωματικών φυτών φαίνεται να είναι αποτελεσματική όμως κρίνεται σκόπιμη η συνέχιση της έρευνας προκειμένου να διευκρινιστούν οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπ όψη για την εκάστοτε δρόγη.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: μικροβιακό φορτίο, μύκητες, αιθέρια έλαια

## Summary

Aromatic plants can be exposed to a wide range of microbial contamination, both before and after harvesting. Therefore, they can present high microbial load and include pathogenic microorganisms and microorganisms that produce toxins. This makes them a potential health hazard when consumed as additives in ready-to-eat meals which are not subject to further processing.

The aim of this study was to investigate the effect of ozone on the reduction of the microbial load of herbs and their qualitative characteristics.

Initially, the microbial quality of 5 samples of dried aromatic plants was studied, namely: Oregano, Thyme, Mountain tea, Verbena and Chamomile. Then fungal colonies were isolated by random sampling to be identified. Also distillations were performed to check the quantity of the essential oil of each of the five plant materials.

Then, ozone of the same concentration (4 ppm) was applied in two treatments for a duration of 30 min and 60 min, to examine its effect. After the treatments, microbiological analysis was performed in order to determine the change in the microbial load and select the best treatment for each plant material. Finally, fungal colonies were isolated for identification and new distillations of the plant materials were performed to clarify the ozone effect on quantitative degradation of essential oils.

The ozone application showed positive results in reducing the microbial load as a whole and also in reducing the fungal population that were suspected of producing mycotoxins. However, it did not show the same effectiveness to reduce the microbial load of each plant material.

Regarding the load of Enterobacteriaceae, it came up that the greatest population decline was displayed by chamomile and thyme (2.2 logs) and finally the tea (1.6 log). In relation to the load of TVC, the largest decrease was displayed by oregano (3 logs) followed by chamomile (2.2 logs) and finally thyme (1.5 logs). The verbena and tea showed 1.3 and 0.7 logs reduction respectively. Regarding to the fungal and yeast load, the highest population decrease was observed in the verbena (1.6 log), followed by thyme (1 log) and finally the tea (0.7 log). Furthermore in the case of oregano and chamomile microbial load annihilated.

Fungal colonies that were originally isolated belonged to the genera of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Ulocladium* spp. and *Fusarium* spp. Fungal colonies that were identified after the ozonation of tea and thyme belonged to the genera of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp.

The amount of the received essential oil after the use of ozone showed no statistically significant difference in each plant material that was analyzed.

It was concluded that the use of ozone as a method of treatment of dried herbs seems to be effective but further research is appropriate to clarify the factors to be taken into account for each dried plant material.

**KEYWORDS:** microbial load, fungi, essential oils



«Εγώ, η Μάρθα Καζή, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού.

Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Καζή Μάρθα»

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	iii
Περίληψη .....	iv
Summary .....	vi
Κατάλογος Συντομογραφιών .....	xii
Κατάλογος Πινάκων - Διαγραμμάτων .....	xiii
Κατάλογος Εικόνων .....	xv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1. Αρωματικά Φυτά.....	1
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα .....	3
1.3. Μικροβιακό φορτίο .....	5
1.3.1. Μικροβιολογικές Προδιαγραφές ΦΑΦ .....	8
1.4. Μέθοδοι απολύμανσης.....	11
1.4.1. Οζονισμός.....	13
1.5. Σκοπός εργασίας .....	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	18
2.1. Φυτικό υλικό .....	18
2.2. Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου.....	18
2.3. Παραλαβή αιθέριων ελαίων .....	25
2.4. Επιλογή της συγκέντρωσης και του χρόνου εφαρμογής του όζοντος.....	26
2.5. Κριτήρια επιλογής δειγμάτων για απόσταξη και περαιτέρω μικροβιακή ανάλυση .....	28
2.6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	29
3.1. Αποτελέσματα των μετρήσεων πριν τον οζονισμό των δειγμάτων .....	29
3.1.1. Συνολικό μικροβιακό φορτίο .....	29
3.1.2. Ταυτοποίηση μυκήτων .....	31
3.1.3. Παραλαβή αιθέριων ελαίων .....	44
3.2. Χρήση όζοντος ως απολυμαντικό μέσο .....	46
3.3. Αποτελέσματα των μετρήσεων μετά τον οζονισμό των δειγμάτων.....	48
3.3.1. Επίδραση στο μικροβιακό φορτίο .....	48

3.3.2. Επιλογή δειγμάτων για απόσταξη και περαιτέρω μικροβιακή ανάλυση.....	57
3.3.3. Ταυτοποίηση μυκήτων .....	59
3.3.4. Παραλαβή αιθέριων ελαίων .....	64
3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Θρεπτικά υποστρώματα .....	75

## Κατάλογος Συντομογραφιών

### Ελληνικά

OMX                    Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

### Αγγλικά

APHA                    American Public Health Association  
cfu                        colony forming units  
DG18                    Dichloran-Glycerol Agar Base  
KAAAB                   Kanamycin Aesculin Azide Agar Base  
MRD                    Maximum Recovery Diluent  
MMGM                   Minerals Modified Glutamate Medium  
PDA                    Potato Dextrose Agar  
TBX                    Tryptone Bile X  
TFTC                    Too Few To Count  
TNTC                    Too Numerous To Count  
TSA                    Tryptone Soya Agar  
TVC                    Total Viable Count  
VRBGA                   Violet Red Bile Glucose

## Κατάλογος Πινάκων - Διαγραμμάτων

Πίνακας 1.1: Οδηγία ΕΗΙΑ για τις μικροβιακές προδιαγραφές δρογών που εγχέονται σε βραστό νερό .	9
Πίνακας 2. 1:Χρησιμοποιηθέντες μάζες δρογών για απόσταξη.....	26
Πίνακας 3. 1: Μέσες τιμές αρχικού μικροβιακού φορτίου (log cfu/g) των δειγμάτων των πέντε διαφορετικών δρογών.....	30
Πίνακας 3. 2: Αποτελέσματα ταυτοποίησης απομονώσεων αρχικού μικροβιακού φορτίου. Με την επισήμανση «x» χαρακτηρίζονται τα άγνωστα είδη. Με την επισήμανση «->» χαρακτηρίζεται η μη περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας .....	39
Πίνακας 3.3: Αρχική απόδοση δρογών σε αιθέριο έλαιο.....	45
Πίνακας 3. 4: : Συγκεντρωτικός πίνακας των στατιστικώς σημαντικών διαφορών που αφορούν το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων στις διάφορες μεταχειρίσεις .....	57
Πίνακας 3. 5: Αποτελέσματα ταυτοποίησης τελικού μικροβιακού φορτίου .....	62
Διάγραμμα 3. 1: Ποσοστά ταυτοποίησης συνόλου απομονώσεων μυκήτων αρχικά.....	40
Διάγραμμα 3. 2: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα της λουίζας .....	41
Διάγραμμα 3. 3: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του τσαγιού.....	41
Διάγραμμα 3. 4: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του θυμαριού .....	42
Διάγραμμα 3. 5: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του χαμομηλιού .....	43
Διάγραμμα 3. 6: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα της ρίγανης .....	43
Διάγραμμα 3.7: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της τιμής του O <sub>3</sub> με τον όγκο των δειγμάτων ρίγανης, θυμαριού, χαμομηλιού, λουίζας και τσαγιού.....	46
Διάγραμμα 3.8: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της τιμής του O <sub>3</sub> με τον όγκο των δειγμάτων ρίγανης, θυμαριού, χαμομηλιού και λουίζας.....	47
Διάγραμμα 3.9: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της συγκέντρωσης του O <sub>3</sub> στην τιμή των 4 ppm με την μεταβολή της θερμοκρασίας από την έναρξη της μεταχείρισης.....	47
Διάγραμμα 3. 10: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη λουίζας πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O <sub>3</sub> , για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3) .....	49
Διάγραμμα 3. 11: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη ρίγανης πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O <sub>3</sub> , για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των	

ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3) .....	51
Διάγραμμα 3. 12: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη τσαγιού πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O <sub>3</sub> , για 30 και 60 min. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3).....	52
Διάγραμμα 3. 13: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη χαμομηλιού πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O <sub>3</sub> , για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3) .....	54
Διάγραμμα 3. 14: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη θυμαριού πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O <sub>3</sub> , για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3) .....	55
Διάγραμμα 3. 15: Μέσοι όροι ποσότητας αιθέριων ελαίων που παραλήφθηκαν μετά τον οζονισμό των δρογών (n=3) Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3).....	64
Πίνακας Π. 1: Θεραπευτικά υποστρώματα αρίθμησης μικροοργανισμών. ....	75
Πίνακας Π. 2: Θεραπευτικό υπόστρωμα ταυτοποίησης ζυμομυκήτων. ....	76

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2. 1: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων για καταμέτρηση αποικιών .....	20
Εικόνα 2. 2: Απεικόνιση σχήματος αραιώσεων MPN .....	21
Εικόνα 2. 3: Σχηματική διάταξη απόσταξης με ατμό .....	25
Εικόνα 2. 4: Απόσταξη με ατμό με αποστακτική διάταξη τύπου Clevenger .....	26
Εικόνα 2. 5: Διάταξη συσκευής οξονοποίησης.....	27
Εικόνα 3. 1: <i>Cladosporium herbarum</i> . a-b αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (a) πλάγια όψη (b) εμπρόσθια όψη c-f 6 d, 25°C c-f μεγέθυνση x 400 (c) κονιδιοφόροι (κόκκινο βέλος) δικύτταρο κονίδιο (μαύρο βέλος) d-f μυκηλιακές υφές με διάφραγμα (μπλε βέλος) κονιδιοφόροι (κόκκινα βέλη) (e) κυλινδρικό κονίδιο, λεμονοειδές κονίδιο (μάυρα βέλη) .....	32
Εικόνα 3. 2: <i>Alternaria</i> spp. a-b αποικία σε PDA 13 d, 25°C (a) πλάγια όψη (b) εμπρόσθια όψη c-f μεγέθυνση x 400 (c) δικτυοκονίδια (d) κονίδια με οριζόντιο διάφραγμα (μαύρα βέλη) (f) βραχύς κονιδιοφόρος με δικτυοκονίδιο (κόκκινο βέλος) .....	33
Εικόνα 3. 3: <i>Ulocladium</i> spp. (a) αποικία σε PDA 13 d, 25°C b-d 10 d, 25°C μεγέθυνση x 400 (c) δικτυοκονίδια (b,d) συμποδιακά επιμηκνόμενοι με γονάτια κονιδιοφόροι δικτυοκονίδιο (μαύρο βέλος) .....	34
Εικόνα 3. 4: <i>Fusarium</i> spp. (a) μεγέθυνση μακροκονιδίων τμήματος d b-c χαρακτηριστικός χρωματισμός υποστρώματος (μαύρα βέλη) (b) αποικία σε PDA, 6 d, 25°C (c) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (d) μακροκονίδια μεγέθυνση x 400, 4 d, 25°C .....	35
Εικόνα 3. 5: <i>Penicillium</i> spp. (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (b) αποικία σε PDA, 6 d, 25°C c-f 4 d, 25°C μεγέθυνση x 400 διάφορα είδη διακλάδωσης (κόκκινα βέλη), στρογγυλά υαλώδη λεία κονίδια (μαύρο βέλος) (c,d) μονοσπονδυλωτά (e) δισπονδυλώδες συμμετρικό (f) δισπονδυλώδες ασύμμετρο..	36
Εικόνα 3. 6: <i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i> (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C b-c 8 d, 25°C (b) κονιδιοφόρος με σφαιροειδή διογκωμένη βάση με κονίδια μεγέθυνση x 400 .....	37
Εικόνα 3. 7: <i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i> (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (b) κονίδια c-e 5 d, 25°C κονιδιοφόροι με σφαιροειδή διογκωμένη βάση με κονίδια μεγέθυνση x 400 .....	38
Εικόνα 3. 8: <i>Aspergillus</i> spp. (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-e 4 d, 25°C μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν κεφαλές με κονίδια σε αλυσίδες (μαύρα βέλη) .....	59
Εικόνα 3. 9: <i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i> (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-f 4 d, 25°C (b) κονίδια c-d μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν κεφαλές με κονίδια (f) κατακερματισμένο τμήμα κεφαλής, σύμπλοκο φιαλιδίων που φέρουν κονίδια .....	60
Εικόνα 3. 10: <i>Penicillium</i> spp. (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-f 4 d, 25°C μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν διακλαδώσεις τύπου πινέλου και κονίδια.....	61



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Αρωματικά Φυτά

Η σπουδαιότητα των αρωματικών φυτών για την υγεία του ανθρώπου έχει αποδειχθεί από την αρχαιότητα. Η σημερινή τάση για κατανάλωσή τους είναι συνεχώς αυξανόμενη λόγω της στροφής των καταναλωτών σε υγιεινούς τρόπους διατροφής, πιο φυσικές μεθόδους θεραπείας, πρόληψης ασθενειών και προαγωγής της υγείας. Σε αυτό συνηγόρησε το μεγάλο ενδιαφέρον των μέσων μαζικής ενημέρωσης για τα φυτικά φαρμακευτικά σκευάσματα καθώς και για τα φαρμακευτικά αρωματικά φυτά. Επιπλέον, η διοχέτευση στην αγορά μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρίες, οι οποίες έβαλαν τα φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα πολύ πιο δυναμικά στη μαζική αγορά, συνεισέφερε ιδιαίτερα στην ταχεία αύξηση της καταναλωτικής ζήτησης (Κατσιώτης, 2011).

Η χρήση των φαρμακευτικών αρωματικών φυτών αυξάνεται επειδή αυτά τα προϊόντα εκτιμώνται ως απολύτως φυσικά συστατικά σε σχέση με τις χημικές πρόσθετες ουσίες. Εκτός από την άμεση χρησιμοποίησή τους από τη βιομηχανία και τους καταναλωτές, αποτελούν επίσης αφετηρία για την παραγωγή πολλών γεύσεων ή/και συστατικών των γεύσεων. Ο τομέας της υγιεινής διατροφής είναι επίσης μια αναπτυσσόμενη αγορά όπως και η αντίστοιχη βιομηχανία και οι καταναλωτές εστιάζουν περισσότερο στα υγιή τρόφιμα (Δόρδας, 2009).

Οι αυξημένες απαιτήσεις σχετικά με την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και την ποιότητα έχουν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη της έρευνας για υψηλής ποιότητας πρώτες ύλες, αλλά και ως προς την τυποποίηση αυτών των προϊόντων. Όλο και περισσότερες καινοτόμες επιχειρήσεις αναζητούν βιολογικά πιστοποιημένες πρώτες ύλες ή υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα φυτικής προέλευσης με στόχο την ανάπτυξη νέων προϊόντων.

Οι κύριες χρήσεις των αρωματικών φαρμακευτικών φυτών και των αιθέριων ελαίων ή άλλων βιοδραστικών συστατικών που παραλαμβάνονται από αυτά είναι:

- Απευθείας μαγειρική χρήση σαν φρέσκα ή αποξηραμένα αρτύματα, βότανα, καρυκεύματα, μπαχαρικά
- Στην αρωματοποιία, σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής ή για τη φροντίδα του νοικοκυριού, είτε απ'ευθείας σαν κύρια και βασικά συστατικά είτε σαν πρώτες ύλες για την εκχύλιση ή/και τη σύνθεση ειδικών αρωματικών χημικών ουσιών.

- Στη ζαχαροπλαστική, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών σαν αρωματικά-βελτιωτικά
- Στην ιατρική και τη κτηνιατρική σαν συστατικά σκευασμάτων
- Στη γεωργία σαν φυσικά φυτοπροστατευτικά μέσα
- Στην φαρμακευτική, σε διάφορα σκευάσματα, λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας, ή σαν βελτιωτικά οσμής και γεύσης.

Οι συμβουλές που δίνονται προκειμένου μια επιχείρηση μεταποίησης φαρμακευτικών αρωματικών φυτών να είναι επιτυχής στην ανταγωνιστική αγορά είναι:

- Το προϊόν να ανταποκρίνεται πλήρως στις προδιαγραφές της τάξεως προϊόντων που ανήκει
- Να προτιμάται η βιολογική παραγωγή προϊόντων καθώς είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τους καλλιεργητές στις αναπτυσσόμενες χώρες
- Να υιοθετηθεί ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου (HACCP) καθώς αποτελεί θετικό επιχείρημα στην εξαγωγική επιχείρηση
- Να υιοθετηθούν πρότυπα ορθής γεωργικής πρακτικής.

Τα παραγόμενα προϊόντα πρέπει να καλύπτουν απόλυτα τις διεθνείς προδιαγραφές τόσο από την άποψη ποικιλίας όσο και από την άποψη ποιότητας (Κατσιώτης, 2011).

## 1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα

Οι συνθήκες κατά την καλλιέργεια των αρωματικών φυτών μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση σε βιομάζα, την παραγωγή του αιθέριου ελαίου (ποιοτικά και ποσοτικά) καθώς και τη μικροχλωρίδα του φυτικού υλικού (Βαρναβάς, 2013). Η ανάλυση της σύστασης του αιθέριου ελαίου των Φαρμακευτικών και Αρωματικών Φυτών (ΦΑΦ) αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του ποιοτικού ελέγχου των δρογών προς διάθεση.

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που χρησιμεύουν στο φυτό σαν μέσα προσαρμογής στις διακυμάνσεις των συνθηκών θερμοκρασίας, φωτός, καταπόνησης, μόλυνσης ή κατά των φυτοφάγων ζώων. Είναι ευχάριστα στην οσμή και όντας αρκετά πτητικά εξατμίζονται πολύ γρήγορα. Οι κύριες χημικές ομάδες στις οποίες ανήκουν τα χημικά συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι τα τερπένια και τα φενυλ-προπάνια. Σε πολλές περιπτώσεις είναι σημαντικές οι διαφορές στη σύσταση των αιθέριων ελαίων εντός του ίδιου βοτανικού είδους. Μπορεί να βρίσκονται σε οποιοδήποτε φυτικό κυτταρικό ιστό ή σε ειδικά κύτταρα, αδένες ή αγωγούς σε διάφορα μέρη του φυτού. (φύλλα, ρίζες, άνθη). Τέλος, οι εκκριτικές τους δομές κατατάσσονται σε επιφανειακές και υποδόριες (Κατσιώτης, 2011).

Η ποιότητα της παραγόμενης δρόγης επηρεάζεται από τους ακόλουθους παράγοντες:

### ➤ Το είδος φυτού

Αρχικά, το πολλαπλασιαστικό υλικό θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ασθένειες. Επίσης, η ποικιλία του θα πρέπει να έχει επιλεγθεί με βάση το είδος του προς διάθεση προϊόντος, την ακαταλληλότητά της για παραγωγή δρόγης (νωπό, ξερή δρόγη, αιθέριο έλαιο), την ευαισθησία του σε ασθένειες και τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Το ύψος του μίσχου, οι λείες ή τραχιές επιφάνειες, το μέγεθος του φύλλου, οι εγκοιλώσεις της ταξιανθίας επηρεάζουν τις προσβολές από εχθρούς και ασθένειες.

### ➤ Τις κλιματικές συνθήκες

Το κάθε είδος ΦΑΦ απαιτεί διαφορετικές κλιματικές συνθήκες προκειμένου το τελικό προϊόν να ανταποκρίνεται στις διεθνείς προδιαγραφές.

Οι θερμές περιοχές με υψηλή υγρασία ενισχύουν τις πιθανότητες ανάπτυξης και μετάδοσης ασθενειών. Ενώ οι περιοχές με έλλειψη νερού μπορούν να δημιουργήσουν υδατική καταπόνηση στα φυτά.

➤ Τις καλλιεργητικές παραμέτρους

Τα ΦΑΦ έχουν το καθένα τις δικές του απαιτήσεις ως προς την εγκατάσταση και διαχείριση της καλλιέργειας. Το ίδιο ισχύει και για την άρδευση, τη θρέψη, το κλάδεμα και την αντιμετώπιση ασθενειών της καλλιέργειας.

➤ Τη συγκομιδή

Η επιλογή της κατάλληλης χρονικής περιόδου κατά την οποία θα ξεκινήσει η συγκομιδή αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ως προς την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Αντίστοιχα, σημαντικό ρόλο παίζει και η ορθή επιλογή του μέρους του φυτού που θα συγκομιστεί. Βασικό κριτήριο αποτελεί ο τρόπος διάθεσης του υλικού. Το στάδιο της συγκομιδής (ωρίμανση, στάδιο ανθοφορίας) καθώς και ο χρόνος συγκομιδής (πρωί, απόγευμα) καθορίζουν την καλύτερη κατά περίπτωση ποιότητα η οποία αφορά την απόδοση ή τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις (ποιοτικές/ ποσοτικές) ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού (δραστικά συστατικά, αιθέρια έλαια) (Δόρδας, 2009).

➤ Την επεξεργασία

Κρίσιμο είναι το χρονικό διάστημα από τη συγκομιδή έως την τοποθέτηση για ξήρανση, απόσταξη ή τυποποίηση. Κατά την ξήρανση το κάθε αρωματικό φυτό απαιτεί διαφορετικές συνθήκες υγρασίας - θερμοκρασίας. Επίσης διαφορετικές συνθήκες χρειάζονται τα φύλλα, ολόκληρο το φυτό και τα άνθη. Επιπλέον η τελική υγρασία διαφέρει για το κάθε φυτικό υλικό ενώ συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10-12% (Κατσιώτης, 2011). Ο ακατάλληλος βαθμός ξήρανσης και η μη επαρκής θερμοκρασία ξήρανσης μπορούν να οδηγήσουν σε πιθανή αποσύνθεση του φυτικού υλικού κατά την αποθήκευση.

Οι συνθήκες επεξεργασίας επηρεάζουν εκτός από την τελική συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου και το τελικό μικροβιακό φορτίο του φυτικού υλικού.

Αναφορικά με την τυποποίηση, φαίνεται ότι οι Έλληνες παραγωγοί προτιμούν τα προϊόντα να διατίθενται χύδην. Κατ' αυτόν τον τρόπο υποβαθμίζουν την ποιότητά τους με συνέπεια τις σημαντικές απώλειες εσόδων.

➤ Την αποθήκευση και διάθεση

Τέλος σημαντικούς παράγοντες αποτελούν η αποθήκευση και διάθεση του τελικού προϊόντος. Προκειμένου να αποθηκευτούν οι δρόγες των ΦΑΦ, θα πρέπει να

έχουν ξηρανθεί επαρκώς και να διατηρηθούν σε συνθήκες κατάλληλες ώστε να αποφευχθούν αλλοιώσεις και προσβολές. Η αποθήκευση πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας, θερμοκρασίας < 25°C και χώρο σκιερό ώστε να μην επιδεινωθεί δραματικά η ποιότητά τους. Σημαντική μέριμνα κατά την αποθήκευση αποτελεί η αποτροπή υδρόλυσης και οξείδωσης των αιθέριων ελαίων καθώς και η αποτροπή προσβολής από έντομα (Κατσιώτης, 2011). Επιπρόσθετα, ορισμένες δρόγες μπορεί να χρειαστούν ξεχωριστούς χώρους αποθήκευσης ώστε η μυρωδιά τους να μην απορροφάται από άλλες.

Με ορθές συνθήκες αποθήκευσης υπάρχει η ευχέρεια της διάθεσης των δρογών σε διάστημα τριών έως δώδεκα μηνών (Κατσιώτης, 2011).

Βάση των ανωτέρω, κρίνεται απαραίτητο όλες οι διαδικασίες να διεκπεραιώνονται σύμφωνα με τις αντίστοιχες προδιαγραφές προκειμένου να επιτευχθεί παραγωγή ποιοτικού προϊόντος και είσοδος στις διεθνείς αγορές.

### 1.3. Μικροβιακό φορτίο

Ως μικροβιακό φορτίο νοείται ο συνολικός αριθμός μικροβίων που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο. Είναι μια μεταβλητή με ιδιαίτερη σημασία για τον προσδιορισμό της ποιότητας λόγω της αντίστροφης σχέσης τους. Οι μικροοργανισμοί αναπτυσσόμενοι σε τρόφιμα καταναλώνουν συστατικά που είναι πολύτιμα για την ορθολογική διατροφή του ανθρώπου. Επιπλέον, παράλληλα σχηματίζουν ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα μεταβολισμού ξένα προς τα κανονικά συστατικά του τροφίμου ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις και επικίνδυνα. Αποτελούν με αυτό τον τρόπο δυνητική πηγή κινδύνου για την υγεία όταν καταναλώνονται ως πρόσθετα σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα τα οποία δεν υπόκεινται σε περαιτέρω επεξεργασία.

Το ενδιαφέρον των μικροβιολόγων για τα ΦΑΦ έγκειται καταρχάς στο γεγονός ότι μπορεί να παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επιπλέον, περιστασιακά διεγείρουν τον μικροβιακό μεταβολισμό ενώ μουχλιάζουν αν διατηρηθούν σε ακατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Τέλος, συχνά περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών που μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση ή και παθογένεια.

Πολλά αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους έχουν αναφερθεί ως δραστικά ενάντια σε ένα μεγάλο εύρος βακτηρίων και μυκήτων. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες ενός αιθέριου ελαίου μπορεί να εξαρτώνται μόνο από ένα ή δύο από τα κύρια συστατικά του. Για παράδειγμα, σε αυτά ανήκουν η καρβακρόλη και η θυμόλη που περιέχονται στη ρίγανη και στο θυμάρι.

Η ρίγανη και το θυμάρι ανήκουν στα φυτά με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση. Ο βαθμός της ανασταλτικής δράσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δραστικών ουσιών και τα στελέχη των μικροοργανισμών. Η δραστηριότητα του αιθέριου ελαίου ρίγανης και λιγότερο του θυμαριού ως αντιμυκητιακά (*Aspergillus flavus*, *A. Niger*, *A. Ochraceus*) αποδείχθηκε από τον Paster *et al.* (1995). Ο μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης των αιθέριων ελαίων ποικίλει λόγω του ότι τα αντιμικροβιακά συστατικά ποικίλουν χημικά.

Η συλλογή και μεταχείριση των ΦΑΦ δεν πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες με αποτέλεσμα να επιμολύνονται σε κάθε στάδιο έως την αποθήκευσή τους. Έτσι επηρεάζεται η περίοδος συντήρησης καθώς και το δυνητικό όφελός τους. (McKee, 1995, Buckenhuskes and Rendlen, 2004)

Πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης μπορούν να αποτελέσουν:

- Ο τρόπος καλλιέργειας των φυτών καθώς και η διαδικασία συγκομιδής και αποξήρανσης τους
- Η μη τήρηση των κανονισμών κατά την διαδικασία εισαγωγής και εξαγωγής
- Η διαδικασία μεταποίησής τους
- Εφαρμογή ακατάλληλων θερμοκρασιών κατά την αποθήκευση, και μεταφορά

Η παρεμπόδιση της μικροβιακής επιμόλυνσης των αποξηραμένων αρωματικών φυτών έγκειται στην εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής και της επεξεργασίας καθώς και στην επαρκή απολύμανση.

Τα αρωματικά φυτά περιέχουν εκείνους τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο χώμα και στη χλωρίδα της περιοχής όπου καλλιεργούνται κι επιβιώνουν της διαδικασίας της αποξήρανσης. Σκόνη, έντομα, περιττώματα πουλιών και τροφτικών κι ενδεχομένως χρήση επιμολυσμένου νερού αποτελούν τις κύριες πηγές επιμόλυνσης. Το μικροβιακό φορτίο μπορεί να ποικίλλει από καλλιεργητική περίοδο σε καλλιεργητική περίοδο εξαρτώμενο από την περιεχόμενη υγρασία, και τις συνθήκες αποθήκευσης (Κατσιώτης, 2011, Δόρδας, 2009). Η μικροβιακή ποιότητα των αρωματικών φυτών συχνά αντικατοπτρίζει την υγιεινή κατάσταση της περιοχής παραγωγής και των χειρισμών.

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει το μικροβιακό φορτίο των αρωματικών φυτών κι έχουν αναφέρει την παρουσία παθογόνων βακτηρίων όπως πχ.

*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, μύκητες, ζύμες, ολική αερόβια μεσόφιλη χλωρίδα και εντεροβακτήρια.

Τα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά περιλαμβάνουν εκτός από βακτήρια και υψηλά ποσοστά μυκήτων καθώς και μεταβολίτες αυτών. Επομένως, επιμόλυνση με μύκητες επίσης προκαλεί ανησυχίες διότι κάτω από κατάλληλες συνθήκες ορισμένοι μύκητες (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.) παράγουν δευτερογενείς τοξικούς μεταβολίτες (μυκοτοξίνες) είτε πριν τη συγκομιδή είτε μετά. Το τελευταίο συμβαίνει εάν η ξήρανση καθυστερήσει και αν κατά την αποθήκευση τους, το νερό επιτραπεί να υπερβεί τις κρίσιμες τιμές για την ανάπτυξη των μυκήτων.

Τα πιο κοινά γένη μυκήτων που ανιχνεύονται στα αρωματικά φυτά είναι τα *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp. και *Mucor* spp. (Zukiewicz - Sobczak et al., (2013). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μια σχετικά υψηλή συχνότητα τοξικογενών μυκήτων και συγκεκριμένα, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium citrinum* και *P. islandicum*. Βέβαια, δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ του βαθμού επιμόλυνσης και της συγκέντρωσης σε αφλατοξίνες στις δρόγες. (Majerus et al., 1985)

Τα ανωτέρω συνηγορούν στην αποξήρανση του φυτικού υλικού όσο το δυνατόν πιο γρήγορα προκειμένου να αποφευχθεί αλλοίωση ενώ παράλληλα να διατηρηθούν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Η αποξήρανση των αρωματικών φυτών φαίνεται να μειώνει τον αριθμό των παρόντων βλαστικών βακτηρίων. Η εναπομένουσα μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από σποριογόνα βακτήρια και μύκητες τα οποία έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε ξηρό περιβάλλον για μεγάλο διάστημα.

Εξαιτίας της αργής οξείδωσης ο βιώσιμος αριθμός κυττάρων μπορεί να ελαττωθεί κατά τη αποθήκευση των δρογών. Αυτός εν μέρει μπορεί να είναι και ο λόγος που οι δρόγες είναι περισσότερο επιμολυσμένες κατά την έναρξη της αποθήκευσης απ'ότι στο λιανικό εμπόριο. (Julseth et al., 1983, Schwab et al., 1982)

Λόγω της χαμηλής ενεργότητας ύδατος, (συνήθως 0,3 - 0,65) ουσιαστικά δεν υπάρχει βακτηριακή αλλοίωση των δρογών μετά την αποξήρανση. Ωστόσο, οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτές πριν και κατά τη διάρκεια της αποξήρανσης, της αποθήκευσης και της διάθεσης του τελικού προϊόντος αν η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία φτάσουν σε επιτρεπτά όρια ή αν βραχεί τοπικά το φυτικό υλικό.

Ο πληθυσμός σποριογόνων βακτηρίων σε δρόγες που χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε χαμηλής οξύτητας προϊόντα, τα οποία υπόκεινται ήπια θερμική μεταχείριση, μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση. Οι δρόγες αποτελούν μία από τις

κύριες αιτίες επιμόλυνσης συγκεκριμένων τροφίμων με μύκητες. Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να προκληθεί αλλοίωση σε τρόφιμα κατάλληλα για ανάπτυξη μυκήτων ειδικά αν δεν υποστούν επαρκή μεταχείριση για την καταστροφή τους (Sagoο, S., K., et al., 2008). Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου υπάρχει μικρή πιθανότητα πρόκλησης αλλοίωσης, οι δρόγες ως συστατικά μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητους πληθυσμούς μικροοργανισμών.

Τέλος δεν αρκεί μόνο να περιοριστεί το μικροβιακό φορτίο των δρογών, καθώς πρέπει να αποφευχθεί η επιμόλυνση τους γεγονός που επιτυγχάνεται με εφαρμογή συστήματος HACCP.

### 1.3.1. Μικροβιολογικές Προδιαγραφές ΦΑΦ

Ο κίνδυνος αλλοίωσης που σχετίζεται με αρτύματα προστιθέμενα σε τρόφιμα εξαρτάται από την πιθανότητα επιμόλυνσης με αλλοιωγόνους ή και παθογόνους μικροοργανισμούς και τοξίνες. Τα αρτύματα προστίθενται σε πολλά είδη τροφίμων. Γι' αυτό είναι ικανά να εισάγουν μικροοργανισμούς που δεν κρίνονται ως σημαντικοί για ορισμένα τρόφιμα ενώ για κάποια άλλα να είναι. Επομένως, οι κίνδυνοι ασφάλειας και αλλοίωσης πρέπει να αξιολογηθούν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης χρήσης της αρτυματικής ύλης. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται τη διατήρηση αυστηρών απαιτήσεων αναφορικά με τα αρτύματα που προστίθενται σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα καθώς δεν υπόκεινται σε περεταίρω θερμική επεξεργασία.

Προτείνεται ο έλεγχος των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών να γίνεται αυστηρά για συγκεκριμένη προσθήκη σε τρόφιμα, μεταξύ του μεταποιητή των αρτυμάτων και του τελικού χρήστη. (ASTA, 1994) Επιπλέον, το πλήθος της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως αξιόπιστος δείκτης πιθανής αλλοίωσης.

Δεν υπάρχουν μικροβιολογικές προδιαγραφές αποξηραμένων φαρμακευτικών φυτών ωστόσο ο κώδικας ορθής πρακτικής υγιεινής ορίζει ότι οι δρόγες θα πρέπει να είναι ελεύθερες παθογόνων μικροοργανισμών σε επίπεδα που θα μπορούσαν να αποτελέσουν κίνδυνο για την υγεία και συνιστά την απουσία *Salmonella* σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

Η European Spice Association (ESA) καθορίζει την απουσία *Salmonella* σε 25 γρ δείγματος, *Escherichia coli* < 10<sup>2</sup> cfu/g και ότι οι υπόλοιπες μικροβιολογικές απαιτήσεις συμφωνούνται μεταξύ αγοραστή και πωλητή καθώς πολλοί αγοραστές



ΦΑΦ έχουν δικές τους καθορισμένες προδιαγραφές σχετικά με τα επιθυμητά επίπεδα δραστικών συστατικών και μικροβιακού φορτίου.

Σύμφωνα με την European Herbal Infusions Association η αποδεκτή ποσότητα μυκήτων στα αποξηραμένα βότανα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή των  $10^6$  cfu/g. Ενώ κατόπιν έρευνάς της το 1999 καθιέρωσε οδηγία για τις μικροβιακές προδιαγραφές δρογών που εγχέονται σε βραστό νερό. (Πίνακας 1.1)

Πίνακας 1.1: Οδηγία ΕΗΙΑ για τις μικροβιακές προδιαγραφές δρογών που εγχέονται σε βραστό νερό

Είδος μικροβιακού φορτίου	Όριο
ΟΜΧ	$1 \times 10^8$ /g
Ζυμες	$1 \times 10^6$ /g
Μύκητες	$1 \times 10^6$ /g
<i>E. coli</i>	$1 \times 10^4$ /g
<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 5 x 25g

Στην Ιρλανδία υπάρχουν μικροβιολογικές οδηγίες που αφορούν τα έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα. Ενώ, στο εμπόριο γενικότερα, τα επίπεδα της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας θα πρέπει να είναι μικρότερα από  $10^3 - 10^4$  cfu/g προκειμένου να είναι αποδεκτό το απολυμασμένο φυτικό υλικό. (Farkas, 2000)

Οι γενικές απαιτήσεις της αγοράς για τις δρόγες ΦΑΦ είναι:

- i. Να είναι απαλλαγμένες από παθογόνους και τοξικογόνους μικροοργανισμούς κάτω από τα επίπεδα που μπορεί να παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία και θα πρέπει να συμμορφώνονται με τις διατάξεις για τα πρόσθετα τροφίμων
- ii. Να μην περιέχουν ουσίες που προέρχονται από μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα μυκοτοξίνες, σε ποσότητες που να υπερβαίνουν τα όρια ανοχής ή τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την επιτροπή του Codex Alimentarius
- iii. Να μην περιέχουν επίπεδα επιμόλυνσης από έντομα, πουλιά και τρωκτικά σε βαθμό που υποδηλώνει ότι επεξεργάστηκαν κάτω από ανθυγιεινές συνθήκες
- iv. Να μην περιέχουν χημικά κατάλοιπα που προκύπτουν από την επεξεργασία σε ποσοστά που να υπερβαίνουν τα όρια ανοχής ή τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την επιτροπή του Codex Alimentarius

- v. Να συμμορφώνονται με τις διατάξεις για τις προσμείξεις και τα μέγιστα επίπεδα για τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων που καθορίζονται από την επιτροπή του Codex Alimentarius

Το ζήτημα της ποιότητας των ΦΑΦ γίνεται ολοένα και πιο σημαντικό. Οι επιχειρήσεις που εμπορεύονται τέτοια προϊόντα γίνονται ολοένα και πιο απαιτητικές κατά την παραλαβή των υψηλής ποιότητας πρώτων υλών. Τα προγράμματα διασφάλισης της ποιότητας που εφαρμόζονται, απαιτούν από τους παραγωγούς να τεκμηριώνουν την παραγωγή τους. Με τον τρόπο αυτό, για κάθε παρτίδα να μπορεί να ελέγχεται η ποιότητά της σε οποιοδήποτε σημείο της πορείας της καθώς και η μέθοδος παραγωγής της. Αν και τα προγράμματα διασφάλισης δεν είναι ακόμη υποχρεωτικά για τα συγκεκριμένα προϊόντα, αναμένεται να γίνουν στο μέλλον. Το γεγονός αυτό, θα δυσκολέψει περισσότερο τους παραγωγούς στη διάθεση των προϊόντων τους στα επόμενα χρόνια (Κατσιώτης, 2011).

## 1.4. Μέθοδοι απολύμανσης

Με βάση τα παραπάνω συνιστάται να επιλεγθεί μία μέθοδος απολύμανσης πριν ή κατά τη συσκευασία. Στη βιομηχανία τροφίμων, ορίζεται ως αντιμικροβιακός παράγοντας ο παράγοντας εκείνος που οδηγεί σε μείωση του μικροβιακού πληθυσμού του επιμολυσμένου υλικού κατά 2 λογαρίθμους. (Tiwari & Rice, 2012, Torlak et al. 2013)

Οι διαδικασίες που εφαρμόζονται για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου είναι:

- ♦ Κάπνιση με οξείδιο του αιθυλενίου ή οξείδιο του προπυλενίου

Αποτελεί την πιο παλιά μέθοδο, ευρέως χρησιμοποιούμενη στις ΗΠΑ. Είναι απαγορευμένη στην Ευρώπη και άλλες χώρες λόγω τοξικότητας. Η κάπνιση εφαρμόζεται σε ειδικούς θαλάμους κενού. Το εύρος της εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης είναι 400 - 1000 mg/L. Ανάλογα με τον τύπο δρόγης, τη βιοποικιλότητα της μικροχλωρίδας και τις συνθήκες εφαρμογής, μπορεί να επιφέρει μείωση 1- 4 logs της OMX. Ενώ η μείωση του πληθυσμού των μυκήτων αφορά 2-3 logs (Brodowska et al., 2014). Ο ρυθμός καταστροφής των μικροβιακών κυττάρων εξαρτάται από:

- ♦ Τη συγκέντρωση του καπνισμού
- ♦ Τη θερμοκρασία
- ♦ Τη σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας στο θάλαμο κάπνισης
- ♦ Τη περιεχόμενη υγρασία της δρόγης
- ♦ Το πορώδες της δρόγης
- ♦ Τη διαπερατότητα του υλικού συσκευασίας

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος δεν είναι αποτελεσματική ενάντια στα ενδοσπόρια βακτηρίων και τα σπόρια μυκήτων.

- ♦ Θερμικές μέθοδοι

Η αποστείρωση με θέρμανση αντενδείκνυται εξαιτίας της ευαισθησίας των ευπαθών πτητικών συστατικών που περιέχονται στα ΦΑΦ. Η υπερβολική θερμότητα μπορεί να μετουσιώσει τα ένζυμα ή να απομακρύνει τα πτητικά συστατικά.

Οι εφαρμογές υψηλής συχνότητας και μικροκυμάτων έχουν μικρή πρακτική χρησιμότητα ενώ η διηλεκτρική θέρμανση παρεμποδίζεται λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε υγρασία των ΦΑΦ. Η χρήση των μικροκυμάτων είναι αποτελεσματική ενάντια σε βλαστικές μορφές βακτηρίων και μυκήτων αλλά τα

ενδοσπόρια των *Bacillus* sp. και *Clostridium* sp. καθώς και τα σπόρια μυκήτων εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας

Η χρήση ατμού υψηλής θερμοκρασίας. (100-200°C) με ακόλουθη ξήρανση με ζεστό αέρα και γρήγορη ψύξη αποτελεί ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο. Εξασφαλίζει υψηλό βαθμό μείωσης μικροβιακού φορτίου ιδιαίτερα για βάκιλους της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, κόκκους του γένους *Enterococcus*, ενδοσπόρια του γένους *Bacillus* και βακτήρια του γένους *Clostridium* ζύμες και μύκητες. (Brodowska, 2014)

Κρίσιμο στάδιο αποτελεί ο έλεγχος της ενεργότητας νερού μετά την εφαρμογή προκειμένου να αποφευχθεί αλλοίωση. Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς μεταβολές χρώματος, και μείωση των βιοενεργών συστατικών της δρόγης. Η διαδικασία δεν χρησιμοποιείται για τριμμένο υλικό καθώς δημιουργούνται συσσωματώματα μετά την εφαρμογή του ατμού.

#### ♦ Ακτινοβόληση

Έχει δοκιμαστεί η εφαρμογή μη ιονίζουσας ακτινοβολίας όπως η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία, ωστόσο, λόγω της μειωμένης διεισδυτικής της ικανότητας είναι ανεπαρκής ως απολυμαντικός παράγοντας. Επομένως φαίνεται πως είναι ακατάλληλη μέθοδος για εμπορική χρήση.

Αντίθετα με τη UV ακτινοβολία, η εφαρμογή ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι αποτελεσματική και ασφαλής διαδικασία για καταστροφή μικροοργανισμών σε μεγάλο εύρος προϊόντων και συσκευασιών με μικρές αλλαγές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

Η ακτινοβόληση επιτυγχάνεται με χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας από ραδιενεργά ισότοπα του κοβαλτίου ( $Co^{60}$ ) και του καισίου ( $Cs^{137}$ ) (ακτίνες  $\gamma$ ) ή από γραμμικούς επιταχυντές οι οποίοι παράγουν ακτίνες  $\beta$  (επιταχυνόμενα  $e^-$ ) ή ακτίνες X στα τρόφιμα. Οι πηγές αυτές δεν καθιστούν τα τρόφιμα ραδιενεργά.

Μπορεί να απαιτείται δόση ακτινοβολίας ίση με 20 kGy ώστε να επιτευχθεί εμπορική αποστείρωση δρογών. Ωστόσο, δόσεις από 3 έως 10 kGy μπορούν να μειώσουν τους ζώντες μικροβιακούς πληθυσμούς σε ικανοποιητικά επίπεδα χωρίς να επηρεάσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Σύμφωνα με την Joint Expert Committee on Wholesomeness of Irradiated Foods, κάθε τρόφιμο το οποίο ακτινοβολείται με μία μέση δόση 10 kGy ή μικρότερη είναι ασφαλές για τον άνθρωπο (Λάζος, 2010).

Η υγιεινή και ασφάλεια των ακτινοβολημένων τροφίμων έχει μελετηθεί περισσότερο διεξοδικά από κάθε άλλη μέθοδο επεξεργασίας τροφίμων. Πρόκειται για απλή, ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο. Επιτρέπει την επεξεργασία των δρογών στην τελική συσκευασία εξαλείφοντας το πρόβλημα της επιμόλυνσης.

Στην Ευρώπη, η ακτινοβόληση των τροφίμων δεν χρησιμοποιείται ευρέως. Έχουν χορηγηθεί μόνο μερικές άδειες για την ακτινοβόληση καρυκευμάτων. Παρόλο ότι η ακτινοβόληση των καρυκευμάτων και των βοτάνων συνεχίζει να αποδίδει τα καλύτερα αποτελέσματα και είναι η πιο αξιόπιστη κι ευέλικτη τεχνολογία, η χρήση της μεθόδου παραμένει περιορισμένη λόγω ψυχολογικών εμποδίων κι επακόλουθη αντίσταση των καταναλωτών.

#### 1.4.1. Οζονισμός

Το όζον είναι η τριατομική μορφή του οξυγόνου. Η επιλογή του αερίου όζοντος ως αντιμικροβιακού παράγοντα βασίστηκε στην άριστη απολυμαντική του δράση. Δρα ταχύτατα και είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας. Η έγκριση της χρήσης όζοντος ως αντιμικροβιακού παράγοντα για μεταχείριση τροφίμων από τον FDA, διεύρυνε το ενδιαφέρον αναφορικά με την εφαρμογή του. Είναι ένας ισχυρός ευρέως φάσματος αντιμικροβιακός παράγοντας ενεργός ενάντια σε βακτήρια, μύκητες, ιούς, πρωτόζωα, σπόρια βακτηρίων και μυκήτων. (Khadre *et al*, 2001, Patil *et al.*, 2014).

Η χρήση όζοντος ως ισχυρού αντιμικροβιακού παράγοντα είναι διαδεδομένη σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η απολύμανση νερού καθώς επίσης και η απολύμανση επιφανειών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην παραγωγή και μεταποίηση φρούτων και λαχανικών, στη παραγωγή αναψυκτικών καθώς και στη βιομηχανία ιχθυηρών.

Έχει μελετηθεί ευρέως η αντιμικροβιακή δράση του όζοντος ενάντια σε μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τρόφιμα. Συγκεκριμένα, σε θετικά κατά gram βακτήρια (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Enterococcus faecalis*) σε gram αρνητικά βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa* και *Yersinia enterocolitica*), σε ζύμες (*Candida albicans*, *Zygosaccharomyces bacilli*) και σε σπόρια *Aspergillus niger* (Restaino *et al.* 1995, Greene *et al.* 2012).

Η οξειδωτική δράση του όζοντος μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και τα οργανικά συστατικά του μέσου εφαρμογής. (Kim *et al.*, 1999b)

Η συγκέντρωση όζοντος που απαιτείται για ένα τρόφιμο εξαρτάται από τα οργανικά συστατικά του τροφίμου τα οποία ανταγωνίζονται τους μικροοργανισμούς για το όζον. Για το λόγο αυτό τρόφιμα διαφορετικής χημικής σύνθεσης απαιτούν διαφορετική δοσολογία όζοντος για επαρκή απολύμανση. (Patil *et al.*, 2014) Όπου απαιτούνται υψηλές δόσεις όζοντος είναι πολύ πιθανό να προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις στις θρεπτικές και ποιοτικές παραμέτρους του τροφίμου.

Σύμφωνα με τον Zhao *et al.* (1995), η εφαρμογή όζοντος σε πολύ μαύρης πιπεριάς μείωσε τον μικροβιακό πληθυσμό κατά 3-4 λογάριθμους χωρίς σημαντική επίδραση στα πτητικά συστατικά της πιπεριάς. Αντίστοιχη διοχέτευση όζοντος σε μαύρο πιπέρι και σε συνδυασμό με διαφορετικά επίπεδα υγρασίας για έως έξι ώρες είχε ως αποτέλεσμα παρόμοια μείωση μικροβιακού φορτίου. Ωστόσο, προκλήθηκε οξείδωση συγκεκριμένων πτητικών συστατικών.

Εκτός από απολυμαντικός παράγοντας στη βιομηχανία τροφίμων, το όζον έχει χρησιμοποιηθεί και για αδρανοποίηση αφλατοξινών. (Kim *et al.*, 1999b)

#### ➤ Συγκέντρωση & χρόνος εφαρμογής

Δεν παρουσιάζουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ίδια ευαισθησία καθώς τα gram αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερα ευαίσθητα στο όζον από τα gram θετικά. Επίσης, τα σπόρια των βακτηρίων και των μυκήτων είναι πιο ανθεκτικά από τα βλαστικά κύτταρά τους ενώ οι μύκητες είναι πιο ανθεκτικοί σε σχέση με τις ζύμες. (Moore *et al.*, 2000, Pasqual *et al.*, 2007, Restaino *et al.*, 1995)

Τα ανωτέρω επιβεβαιώνονται από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μελέτης οζονισμού σε δρόγες 6 αρωματικών φυτών.

Σύμφωνα με τους Vali Asil *et al.* (2013) μεγαλύτερη μείωση του μικροβιακού φορτίου ( $\log \text{cfu} / \text{g} \geq 2$ ) επιτευχθεί στο μελισσόχορτο με την εφαρμογή 0.9 ppm  $\text{O}_3$  για 30 min. Το μικροβιακό φορτίο που μειώθηκε αφορούσε την OMX, τα κολοβακτηρίδια καθώς και το συνολικό αριθμό ζυμών και μυκήτων. Η προαναφερθείσα συγκέντρωση  $\text{O}_3$  φαίνεται να έχει μια σημαντική θετική επίδραση όταν εφαρμόζεται για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Σε ορισμένες ωστόσο περιπτώσεις η μείωση του μικροβιακού φορτίου δεν υπήρξε επαρκής (ήταν μικρότερη από 2 λογαρίθμους) γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην παρουσία μικροοργανισμών με ανθεκτικότητα καθώς διαφορετικά είδη μικροοργανισμών αποτελούσαν το αρχικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων.

Οι Torlak *et al.* (2013) αναφέρουν ότι προκειμένου να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο της ρίγανης κατά 3,2 λογαρίθμους χρειάστηκε εφαρμογή 5,3 ppm  $\text{O}_3$  για 90

min ενώ με εφαρμογή 2,8 ppm O<sub>3</sub> για 120 min το φορτίο της μειώθηκε κατά 2,5 λογάριθμους.

Οι ίδιοι ερευνητές επισημαίνουν ωστόσο ότι ενώ η εφαρμογή 5.3 ppm O<sub>3</sub> για 120 min επέφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την μείωση του μικροβιακού φορτίου, επηρέασε ωστόσο, το χρώμα της οξονισμένης ρίγανης. Επιπλέον οι Zagon et al. (1992) αναφέρουν ότι παρατεταμένη εφαρμογή όζοντος (>6 h) σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (>9 mg/L) προκάλεσε αποχρωματισμό μπαχαρικών.

#### ➤ Τρόπος δράσης

Το όζον καταστρέφει τους μικροοργανισμούς μέσω οξείδωσης ενώ το υπολειπόμενο όζον μετατρέπεται σε μη τοξικό προϊόν. Δύο κύριοι μηχανισμοί καταστροφής των μικροοργανισμών από το όζον έχουν αναγνωρισθεί:

1. Οξειδώνει τις σουλφιδικές ομάδες και τα αμινοξέα των ενζύμων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτίδια
2. Οξειδώνει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε υπεροξειδία οξέων (Victorin 1992).

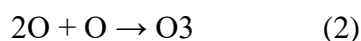
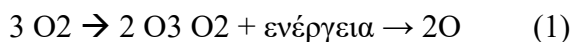
Οι μικροοργανισμοί καταστρέφονται με διάσπαση του περιβλήματος των κυττάρων ή αποσύνθεσή του που οδηγεί στην κυτταρική λύση. Καταστρέφει τα σπόρια με υποβάθμιση του εξωτερικού περιβλήματος (αποτελεί το 50% του όγκου των σπορίων) εκθέτοντας έτσι τον φλοιό και τον πυρήνα στη δράση του όζοντος. (Foegeding 1985, Khadre et al. 2001, Greene *et al.* 2012 ).

Όταν έρχεται σε επαφή με βακτήρια, ιούς ή μύκητες, καταστρέφει το περίβλημα του μικροοργανισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή το επιπλέον άτομο οξυγόνου καταστρέφεται, εξαλείφοντας όλους τους μικροοργανισμούς και αφήνοντας μόνο οξυγόνο. Η καταστροφή και αδρανοποίηση των μικροοργανισμών σχετίζεται με την συγκέντρωση του όζοντος και το χρόνο επαφής του με τον μικροοργανισμό.

#### ➤ Παραγωγή όζοντος

Το όζον είναι η αλλοτροπική μορφή του οξυγόνου. Σχηματίζεται από τις υπεριώδεις ακτίνες του ήλιου και από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις κατά τη διάρκεια καταιγίδων. Τα μονήρη άτομα οξυγόνου δεν είναι δυνατόν να υπάρξουν σταθερά αφ' εαυτού και επανενώνονται για το σχηματισμό διατομικού οξυγόνου. Ωστόσο κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου αναδιάταξης κάποια από αυτά επανασυνδέονται υπό τη μορφή του ασταθούς και πολύ δραστικού τριατομικού οξυγόνου.

Οι διάφορες τεχνικές παραγωγής όζοντος με ηλεκτρική εκκένωση βασίζονται στη διέλευση ξηρού οξυγόνου από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτρική εκκένωση η οποία λαμβάνει χώρα, διασπά τα άτομα του διατομικού οξυγόνου οδηγώντας σε μονήρη άτομα οξυγόνου που σε μία προσπάθεια σταθεροποίησης ενώνονται με μη διασπασμένα μόρια διατομικού οξυγόνου σχηματίζοντας τελικά το μόριο του όζοντος σύμφωνα με την εξίσωση όπως περιγράφεται στις εξισώσεις (1) και (2):



Λόγω του ότι είναι ασταθές αέριο, πρέπει να παράγεται και να εφαρμόζεται επί τόπου. (Rice and Netzer, 1982)

Το όζον δεν είναι μόνο πολύ ισχυρό οξειδωτικό αλλά κι ένα πολύ ισχυρό μη χημικό απολυμαντικό. Η απολυμαντική του δράση είναι 3125 φορές γρηγορότερη από το χλώριο ως βακτηριοκτόνο και είναι το ισχυρότερο οξειδωτικό που διατίθεται στο εμπόριο για τον αέρα και την επεξεργασία νερού (Βλάσση, 2012).

Το 1997 η χρήση όζοντος αναγνωρίστηκε ως ασφαλής στις εφαρμογές των τροφίμων στις ΗΠΑ. Έχει την πλήρη έγκριση για απευθείας εφαρμογή σε τρόφιμα FDA. Η χρήση όζοντος επιτρέπεται είτε ως μορφή αερίου είτε διαλυμένο σε νερό ως αντιμικροβιακός παράγοντας για τρόφιμα (Ο' Donnell et al., 2012).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, μεταξύ των διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας τροφίμων μόνο η ακτινοβόληση και ο ιονισμός έχουν ειδικούς κανόνες ρύθμισης κι επισήμανσης η οποία διαφέρει εντός των κρατών μελών (εθνική νομοθεσία για την ακτινοβόληση). Στην περίπτωση του όζοντος δεν ισχύει συγκεκριμένη νομοθεσία. Ωστόσο, υπάρχουν δύο γενικοί κανόνες που ισχύουν και για το όζον:

(1) οδηγία για την επισήμανση (2000/13). Αφορά την ένδειξη στην ετικέτα της συγκεκριμένης μεταχείρισης που υπόκεινται το προϊόν, αν η απουσία αυτής της ένδειξης θα μπορούσε να παραπλανήσει τον καταναλωτή.

(2) άδεια για τα «νέα τρόφιμα» πριν την εμπορική τους διάθεση με τον παραπάνω χαρακτηρισμό που υπόκειται στον κανονισμό 258/97, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που έχουν υποβληθεί σε νέα μέθοδο μεταχείρισης.

### ➤ Τοξικότητα

Το όζον είναι τοξικό αέριο του οποίου η τοξικότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης σε αυτό. (Pascual *et al.*, 2007, Greene *et al.* 2012) Από πλευράς ασφάλειας των εργαζομένων, πρέπει να διασφαλιστεί ότι το προσωπικό δεν εκτίθενται σε συγκεντρώσεις όζοντος υψηλότερες από:



- 0,1 ppm κατ' όγκο (0.2 mg/m<sup>3</sup>) σε καθημερινή διάρκεια άνω των 8 ωρών.
- 0.3 ppm κατ' όγκο (0.6 mg/m<sup>3</sup>) ως όριο για μέγιστη έκθεση 15 λεπτών και όχι περισσότερο από τέσσερις φορές τη μέρα, σύμφωνα με τους κανονισμούς του US Occupational Safety and Health Administration (OSHA) (Tiwari & Rice, 2012)

Όταν χρησιμοποιείται σε επίπεδα που δεν υπερβαίνουν τα 0,05 ppm θεωρείται ασφαλές για τον άνθρωπο να το αναπνεύσει 24 ώρες τη μέρα. Σε αυτά τα επίπεδα δεν υπάρχουν βλαβερές συνέπειες για τα φυτά.

### **1.5. Σκοπός εργασίας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του όζοντος στο μικροβιακό φορτίο των αρωματικών φυτών καθώς και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους.

Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν οι δρόγες από πέντε είδη αρωματικών φυτών που καλλιεργούνται ευρέως στην Ελλάδα και έχουν σημαντική εμπορική αξία. Οι δρόγες των αυτών διαθέτουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά ενώ κάποια περιέχουν συστατικά με αντιμικροβιακές ιδιότητες και κάποια άλλα όχι.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Φυτικό υλικό

Για τις ανάγκες των πειραμάτων παραλήφθηκε από παραγωγούς επαρκής ποσότητα αποξηραμένου φυτικού υλικού που συλλέχθηκε κατά την περίοδο του 2016 και αφορούσε πέντε είδη και συγκεκριμένα:

- ♦ Ρίγανη (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) : τριμμένη και κοσκινισμένη
- ♦ Θυμάρι (*Thymus vulgaris*) : τριμμένο και κοσκινισμένο
- ♦ Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*) : ανθοκεφαλές
- ♦ Λουίζα (*Aloysia triphyla* syn. *Lippia citriodora*): φύλλα
- ♦ Τσάι του βουνού (*Sideritis raeseri*) : ανθοφόροι βλαστοί και φύλλα

Το φυτικό υλικό παρέμεινε στο χώρο του εργαστηρίου σε συνθήκες περιβάλλοντος μέχρι την ολοκλήρωση των πειραμάτων.

### 2.2. Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου

#### 2.2.1. Δειγματοληψία

Ένα σύνολο 5 δειγμάτων από κάθε ένα από τα προαναφερθέντα φυτικά είδη παραλήφθηκε τυχαία από διαφορετικά μέρη της μάζας των ξηρών δρογών. Τα δείγματα (50 g έκαστο) μεταφέρθηκαν ασηπτικά στο εργαστήριο Μαρκετινγκ & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων & Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου έγινε η προετοιμασία για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου.

#### 2.2.2. Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης μικροοργανισμών

Για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών και των ομάδων μικροοργανισμών έγινε χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων του Παραρτήματος 1.

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της αντίστοιχης προμηθεύτριας εταιρείας, με προσθήκη απιονισμένου νερού και ακόλουθη θερμική μεταχείριση του υλικού (βρασμός, υγρή αποστείρωση στους 121 °C για 15 min).

Μετά την παρασκευή τους τόσο το MRD (Maximum Recovery Diluent, υδατικό διάλυμα εναιώρησης) όσο και το VRBGA (Violet Red Bile Glucose, θρεπτικό υπόστρωμα) διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος έως τη χρήση τους για χρονικό διάστημα που δεν υπερέβη το προτεινόμενο από την

προμηθεύτρια εταιρία. Το VRBGA ρευστοποιήθηκε σε θάλαμο μικροκυμάτων και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για σταθεροποίηση της θερμοκρασίας στους 45°C ακριβώς πριν τη διεξαγωγή της μικροβιολογικής ανάλυσης. Τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα (TSA-Tryptone Soya Agar, KAAAB- Kanamycin Aesculine Azide Agar Base, TBX- Tryptone Bile X, DG-18- Dichloran - Glycerol Agar Base) τοποθετήθηκαν εντός υδατόλουτρου ώστε η θερμοκρασία τους να σταθεροποιηθεί στους 45°C προτού διανεμηθούν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

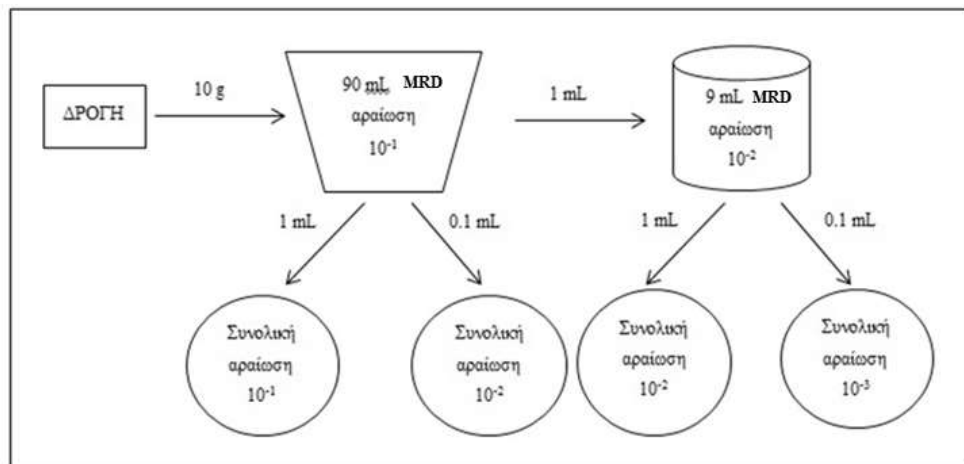
Τα θρεπτικά υποστρώματα που απαιτούσαν διανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (MRD- Maximum Recovery Diluent, MMGM- Minerals Modified Glutamate Medium, PDA- Potato Dextrose Agar) παρασκευάστηκαν αντίστοιχα σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας, με προσθήκη απιονισμένου νερού, βρασμό και συνεχή ανάδευση, ακόλουθη ισόποση διανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες, πωματισμό με υδρόφοβο βαμβάκι και θερμική μεταχείριση του υλικού (βρασμός, υγρή αποστείρωση στους 121°C για 15 min).

Μετά την αποστείρωσή τους οι δοκιμαστικοί σωλήνες με MRD και MMGM παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ενώ οι δοκιμαστικοί σωλήνες με PDA παρέμειναν υπό κλίση μέχρι τη στερεοποίησή τους.

### **2.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση**

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1, από κάθε δείγμα των 50 g ζυγίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 10,00 g και αναμείχθηκαν με 90,0 mL MRD. Κατόπιν ομογενοποιήθηκαν για 2 min με χρήση stomacher και ακολούθως μεταφέρθηκε 1,0 mL σε 9,0 mL MRD (μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων).

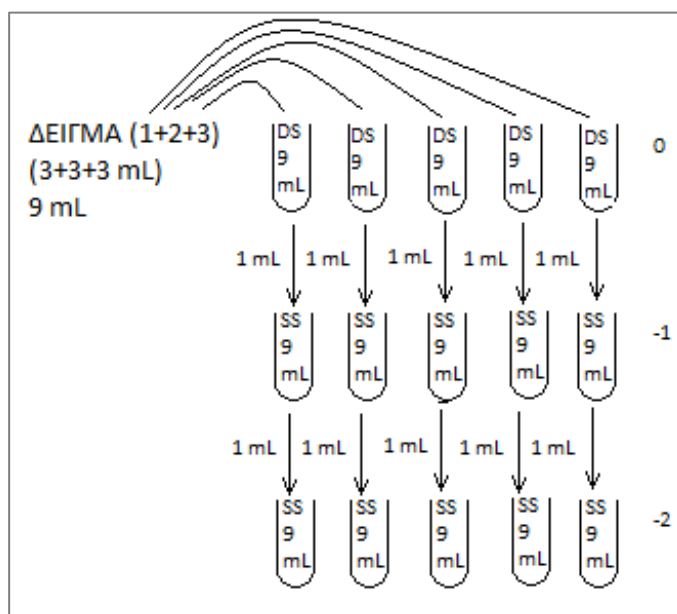
Μία ποσότητα εναιωρήματος της κάθε μιας από τις δεκαδικές αραιώσεις εμβολιάστηκε σε τρυβλία Petri με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα προκειμένου να γίνει καταμέτρηση αποικιών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για το κάθε δείγμα.



Εικόνα 2. 1: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων για καταμέτρηση αποικιών

- ♦ Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα εκτιμήθηκε με επίστρωση 0,1 mL από την κάθε αραιώση σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Tryptone Soy Agar), τα τρυβλία ανεστράφησαν και ακολούθησε επώαση στους 25°C για 72 h.
- ♦ Η εκτίμηση των *Enterobacteriaceae* πραγματοποιήθηκε με ενσωμάτωση 1,0 mL από την κάθε αραιώση με 10 mL θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA (Violet Red Bile Glucose) σε τρυβλία Petri και αφού επήλθε στερεοποίηση ακολούθησε επιστιβάδευση με 15 mL επιπλέον θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA. Αφότου στερεοποιήθηκαν τα τρυβλία Petri ανεστράφησαν και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 ± 2 h.
- ♦ Οι εντερόκοκκοι εκτιμήθηκαν με επιφανειακή εξάπλωση 0,1 mL για την κάθε αραιώση σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα KAAAB (Kanamycin Aesculin Azide Agar Base) τα οποία ανεστράφησαν και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 h.
- ♦ Η εκτίμηση των ζυμών - μυκήτων πραγματοποιήθηκε με επιφανειακή εξάπλωση 0,1 mL από την κάθε αραιώση σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα DG18 (Dichloran - Glycerol Agar Base) τα οποία ανεστράφησαν και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25°C για 72 h.

- Όσον αφορά την εκτίμηση παρουσίας *E. coli* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτίμησης πιθανού αριθμού (Most Probable Number) και το υπόστρωμα Minerals Modified Glutamate Medium σε διπλής συγκέντρωσης (Double Strength) και απλής συγκέντρωσης (Single Strength) διαλύματα ως υποθετικό τεστ (presumptive test).



Εικόνα 2. 2: Απεικόνιση σχήματος αραιώσεων MPN

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2, ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε 9 mL θρεπτικού υλικού. Στους 5 δοκιμαστικούς σωλήνες διπλής συγκέντρωσης προστέθηκαν 9 mL δείγματος, που προήλθαν από άθροισμα 3 mL από την κάθε επανάληψη. Στους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες απλής συγκέντρωσης έγινε μεταφορά 1 mL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες διπλής συγκέντρωσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 h. Κατόπιν, όσα δείγματα εμφάνισαν κίτρινη χρώση ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα TBX και τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα για επώαση στους 44°C για 48 h ως επιβεβαιωτικό τεστ (confirmative test).

#### 2.2.4. Επιλογή τρυβλίων & καταμέτρηση αποικιών

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης όλα τα τρυβλία εξετάστηκαν οπτικά για την παρουσία των χαρακτηριστικών αποικιών των διαφορετικών μικροοργανισμών, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκαν.

Από την APHA (American Public Health Association) έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένοι κανόνες επιλογής τρυβλίων, με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται μέσα σε αυτά προκειμένου να εξαχθούν ορθά συμπεράσματα. Η καταμέτρηση γίνεται με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Οι κανόνες αυτοί παρατίθενται παρακάτω:

- i. Προκειμένου να είναι στατιστικά έγκυρες οι καταμετρήσεις, λαμβάνονται υπόψη μόνο τα τρυβλία που έχουν 30 έως 300 αποικίες. Στα τρυβλία με περισσότερες από 300 αποικίες δεν είναι εφικτή η καταμέτρηση και χαρακτηρίζονται ως TNTC (Too Numerous To Count) ενώ τα τρυβλία με λιγότερες από 30 αποικίες χαρακτηρίζονται ως TFTC (Too Few To Count).
- ii. Εάν μόνο ένα τρυβλίο έχει 30 έως 300 αποικίες, τότε ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο συντελεστή αραιώσης (πχ. για την αραιώση  $10^{-2}$  με το  $10^2$ ) και το αποτέλεσμα εκφράζει τον αριθμό αποικιών ανά g ή mL (cfu/g ή mL).
- iii. Όταν δύο τρυβλία, από δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, έχουν 30 έως 300 αποικίες, τότε αφού υπολογιστεί ο αριθμός αποικιών που προκύπτει από κάθε αραιώση, εξάγεται ο μέσος όρος, εκτός εάν ο λόγος του αριθμού που προκύπτει από την μεγαλύτερη αραιώση, προς τον αριθμό που προκύπτει από τη μικρότερη αραιώση, είναι μεγαλύτερος του 2. Στη περίπτωση αυτή λαμβάνεται υπόψη μόνο ο αριθμός που προκύπτει από τη μικρότερη αραιώση.
- iv. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν λιγότερες από 30 αποικίες, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται με βάση τον αριθμό αποικιών της μικρότερης αραιώσης.
- v. Εάν κανένα τρυβλίο δεν έχει αποικίες, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν μικρότερο του 1 επί τον συντελεστή της πρώτης αραιώσης.
- vi. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν περισσότερες από 300 αποικίες η αρίθμηση γίνεται με τη βοήθεια της τετραγωνισμένης κυκλικής οθόνης του μετρητή αποικιών. Η διαίρεση του τρυβλίου σε επαρκή αριθμό τομέων, ικανών να προσεγγίσουν κατά το πλησιέστερο δυνατό το ακριβές πλήθος των αποικιών.
- vii. Εάν χρησιμοποιείται διπλή σειρά τρυβλίων, τότε εξάγεται ο μέσος όρος για τρυβλία της ίδιας αραιώσης και στη συνέχεια ο μέσος όρος από δύο διαφορετικές αραιώσεις αφού τηρηθούν οι κανόνες i, ii & iii.
- viii. Το τελικό αποτέλεσμα στρογγυλοποιείται στα δύο πρώτα ψηφία.

Επιπλέον, στην περίπτωση της μεθόδου επιφανειακής εξάπλωσης, το αποτέλεσμα εκφράζεται αφού ληφθεί υπόψη, εκτός από το βαθμό της αραίωσης και η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος (0,1 mL).

Στην πράξη η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται με την εφαρμογή της σχέσης 3:

$$N = \frac{\Sigma c}{V (n_1 + 0.1 n_2) d} \quad (3)$$

όπου:  $\Sigma c$  = το άθροισμα των αποικιών σε όλα τα μετρούμενα τρυβλία

$V$  = ο όγκος του εμβολίου εντός των τρυβλίων

$n_1$  = ο αριθμός των τρυβλίων που ανήκουν στη μικρότερη αραίωση

$n_2$  = ο αριθμός των τρυβλίων που ανήκουν στη μεγαλύτερη αραίωση

$d$  = ο βαθμός της μικρότερης αραίωσης από τις δύο χρησιμοποιούμενες για την έκφραση του αποτελέσματος

Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως βιώσιμες μονάδες που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν αποικίες ανά γραμμάριο δείγματος (cfu/g)

### **2.2.5. Επιλογή αποικιών ζυμών μυκήτων προς ταυτοποίηση.**

Από τις ανεπτυγμένες αποικίες του υποστρώματος DG-18 πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και μεταφορά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Παρασκευάστηκαν συνολικά 4 σειρές καλλιέργειών.

Μετά την διαδικασία οζονισμού των δειγμάτων προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που επιβίωσαν, απομονώθηκαν εκ νέου αποικίες με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Οι απομονωμένες αποικίες παρέμειναν για επώαση στους 25°C έως την επαρκή ανάπτυξη των χαρακτηριστικών ταυτοποίησής τους.

### **2.2.6. Ταυτοποίηση μυκήτων**

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας και ταυτοποίησης των μυκήτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Από κάθε αποικία ηλικίας τριών έως επτά ημερών έγιναν μια σειρά από μόνιμα παρασκευάσματα με στόχο να παρατηρηθούν ευκρινή χαρακτηριστικά ταυτοποίησης. Τα μόνιμα παρασκευάσματα έγιναν με τοποθέτηση μιας σταγόνας lactophenol cotton

blue (Cappuccino *et al.*,2005) σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και ασηπτική μεταφορά τμήματος της αποικίας, με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου. Κατόπιν τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του παρασκευάσματος καλυπτρίδα και σφραγίστηκε με βερνίκι νυχιών.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων παρατηρήθηκαν με χρήση του μικροσκοπίου Motic BA310 καθώς και με χρήση του μικροσκοπίου NIKON LABOPHOT-2 σε κατάλληλη μεγέθυνση. Επιπλέον, με χρήση κατάλληλης κάμερας (Motic 10MP) και λογισμικού (Motic Images Plus 2.0 ML) έγινε λήψη φωτογραφιών των χαρακτηριστικών ταυτοποίησης.

Με βάση τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν και με τη βοήθεια της κλείδας προσδιορισμού «*Illustrated genera of imperfect fungi*» (Barnet *et al.*, 1987) πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των απομονωμένων μυκήτων.



## 2.3. Παραλαβή αιθέριων ελαίων

### 2.3.1. Συλλογή δειγμάτων

Ένα σύνολο 5 δειγμάτων συλλέχθηκαν τυχαία από διαφορετικά μέρη της μάζας ξηρών δρογών. Τα δείγματα (300 g έκαστο) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Ανθοκομίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πραγματοποίηση της απόσταξης.

### 2.3.2. Απόσταξη

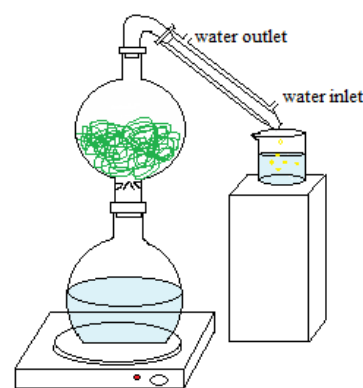
Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 2.3) αποτελούνταν από σφαιρική φιάλη 2000 mL, δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1000 mL, επίθεμα σύνδεσης φιάλης - ψυκτήρα τύπου L και ψυκτήρα.

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων έγινε με υδροατμοαπόσταξη των δειγμάτων προκειμένου το φυτικό υλικό να μην έρχεται σε άμεση επαφή με νερό και να επιτυγχάνεται παραλαβή αιθέριου ελαίου καλύτερης ποιότητας και υψηλής καθαρότητας.

Η διαδικασία της απόσταξης θεωρήθηκε ότι είχε ολοκληρωθεί όταν σταμάτησε η παραλαβή ποσότητας αιθέριου ελαίου η οποία μπορούσε να μετρηθεί με ακρίβεια.

Η καταμέτρηση της παραλαμβανόμενης ποσότητας πραγματοποιήθηκε άμεσα με προχοΐδα 25 mL (ακριβείας 0,05).

Η καταμέτρηση και παραλαβή του αιθέριου ελαίου με την προαναφερθείσα διάταξη στην περίπτωση του τσαγιού και του χαμομηλιού δεν υπήρξε επιτυχής λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης του και της προσκόλλησής του στα τοιχώματα της προχοΐδας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε αποστακτική διάταξη τύπου Clevenger στην οποία το νερό ανακυκλώνεται, ενώ η φάση του αιθέριου ελαίου βρίσκεται υπερκείμενα του νερού και σταδιακά συγκεντρώνεται στο βαθμονομημένο σωλήνα του κύριου μέρους της συσκευής. (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 2. 3: Σχηματική διάταξη απόσταξης με ατμό



Εικόνα 2. 4: Απόσταξη με ατμό με αποστακτική διάταξη τύπου Clevenger

Η αναλογία δρόγης απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:10.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για το κάθε φυτικό είδος.

Το παραληφθέν αιθέριο έλαιο αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία 4°C.

Για την εκάστοτε δρόγη, χρησιμοποιήθηκε διαφορετική μάζα για την απόσταξη της βάση βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με την περιεκτικότητά τους σε αιθέριο έλαιο. Οι μάζες που χρησιμοποιήθηκαν για την απόσταξη κάθε δρόγης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2. 1: Χρησιμοποιηθέντες μάζες δρογών για απόσταξη

Θυμάρι	Ρίγανη	Χαμομήλι	Τσάι του βουνού	Λουίζα
20 g	10 g	75 g	50 g	50 g

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αιθέριο έλαιο εκφράστηκε σε mL/ 100 g ξηρού βάρους σύμφωνα με τη σχέση 4:

$$\text{Απόδοση (\%)} = \frac{\text{mL αιθέριου ελαίου}}{\text{g δρόγης}} \cdot 100 \quad (4)$$

#### 2.4. Επιλογή της συγκέντρωσης και του χρόνου εφαρμογής του όζοντος

Από τα όσα αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.4.1. προκύπτει ότι εφαρμογή 0,9 ppm O<sub>3</sub> για χρονικό διάστημα 30 min μπορεί να είναι επαρκής για ορισμένα είδη μικροοργανισμών ή όταν το μικροβιακό φορτίο είναι μικρό. Προκειμένου ωστόσο να καλυφθούν και περιπτώσεις κατά τις οποίες το μικροβιακό φορτίο του δείγματος είναι πολύ υψηλό ή οι μικροοργανισμοί που το αποτελούν παρουσιάζουν μεγαλύτερη

ανθεκτικότητα κρίνεται απαραίτητη η μελέτη εφαρμογής μιας συγκέντρωσης  $O_3$  που δεν θα ξεπερνά τα 5 ppm και χρονικό διάστημα μικρότερο από 120 min.

Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε η εφαρμογή  $O_3$  σε συγκέντρωση 4 ppm και χρόνος εφαρμογής 30 και 60 min, προκειμένου να μελετηθεί η δράση του στον περιορισμό του μικροβιακού φορτίου σε δρόγες ρίγανης, λουίζας, θυμαριού, τσαγιού και χαμομηλιού .

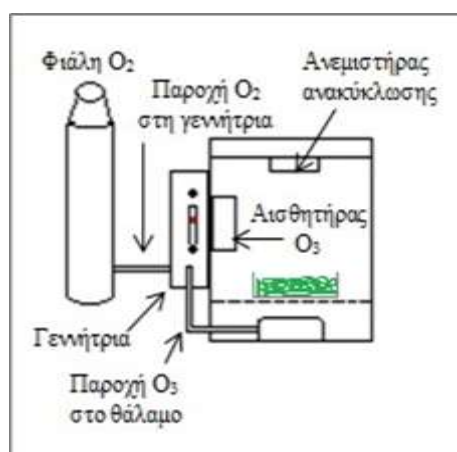
#### 2.4.1. Συλλογή δειγμάτων

Ένα σύνολο 5 δειγμάτων από κάθε ένα από τα προαναφερθέντα φυτικά είδη παραλήφθηκε τυχαία από διαφορετικά μέρη της μάζας των ξηρών δρογών. Τα δείγματα (500 g έκαστο) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Ανθοκομίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πραγματοποίηση του οζονισμού.

#### 2.4.2. Διαδικασία ρύθμισης του συστήματος Οζονισμού

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.5 η διάταξη οζονισμού αποτελούνταν από τη φιάλη οξυγόνου, τη γεννήτρια όζοντος και τον αεροστεγή θάλαμο όγκου  $\approx 400$  L. Στο εσωτερικό του θαλάμου ενσωματώθηκε αισθητήρας όζοντος, ώστε να διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση στο εσωτερικό του θαλάμου και ανεμιστήρας, προκειμένου το όζον να ανακυκλώνεται και να μη συσσωρεύεται στο πάνω μέρος του θαλάμου.

Αρχικά, ρυθμίστηκε η ροή  $O_2$  και η ένταση ρεύματος στη γεννήτρια παραγωγής  $O_3$  ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση  $O_3$  (4 ppm) σε κενό θάλαμο (χωρίς την παρουσία δρόγης).



Εικόνα 2. 5: Διάταξη συσκευής οζονοποίησης

Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 300 g φυτικού υλικού και τοποθετήθηκαν σε δύο στρογγυλά κόσκινα, διαμέτρου 27 cm και ύψους 7 cm. Η διάμετρος των οπών του

κόσκινου ήταν 1 mm. Τα κόσκινα με το φυτικό δείγμα τοποθετήθηκαν στο κέντρο του θαλάμου. Μετά τον οζονισμό του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία επαρκούς ποσότητας από διαφορετικά μέρη της μάζας και το δείγμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο.

Τα δείγματα (50 g έκαστο) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Μαρκετινγκ & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων & Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για εκ νέου εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου και ταυτοποίηση των αναπτυχθέντων μυκήτων με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.

## **2.5. Κριτήρια επιλογής δειγμάτων για απόσταξη και περεταίρω μικροβιακή ανάλυση**

Μετά τον οζονισμό του φυτικού υλικού, τα δείγματα που στη συνέχεια αποστάχθηκαν και αναλύθηκαν μικροβιολογικά επιλέχθηκαν με βάση:

- Την εμφάνιση στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των T0 - T30 για τα είδη του μικροβιακού φορτίου που μελετήθηκαν και
- Τη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά τουλάχιστον 2 λογάριθμους.

Σε περίπτωση που δεν ικανοποιήθηκαν και οι δύο παραπάνω προϋποθέσεις, ελέγχθηκε:

- Η εμφάνιση στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των T30 - T60 για τα είδη του μικροβιακού φορτίου που μελετήθηκαν.

## **2.6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Statgraphics XVII.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1. Αποτελέσματα των μετρήσεων πριν τον οζονισμό των δειγμάτων

##### 3.1.1. Συνολικό μικροβιακό φορτίο

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του αρχικού μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1.

Ο πληθυσμός της αρχικής Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πέντε δειγμάτων. Το συγκεκριμένο μικροβιακό φορτίο παρουσιάστηκε αυξημένο όπως αναμενόταν. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μεγάλο εύρος της μικροχλωρίδας που αναπτύσσεται στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα σε μέση θερμοκρασία. Επιπλέον, το φυτικό υλικό ήταν εκτεθειμένο σε πλήθος μικροοργανισμών καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής και της μεταποίησης.

Η OMX δίνει μια γενική εικόνα της μικροβιακής κατάστασης του τροφίμου χωρίς να προσδιορίζει ωστόσο το είδος των μικροοργανισμών που την απαρτίζουν. Προκειμένου να διεξαχθούν ορθά συμπεράσματα για την μικροβιακή κατάσταση του φυτικού υλικού ακολούθησαν αναλύσεις για συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών.

Αναφορικά με τους μύκητες, η λουίζα, το τσάι και το θυμάρι εμφάνισαν την μεγαλύτερη επιμόλυνση ενώ η ρίγανη και το χαμομήλι τη μικρότερη. Στη λουίζα και το τσάι έχει παρατηρηθεί αντιμυκητιακή δράση σε συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών (Koutsaviti *et al.*, 2012, Ali *et al.*, 2011) Επομένως οι μύκητες που αναπτύχθηκαν πιθανά να μην ανήκουν σε αυτά τα είδη, ή δεν επηρεάζονται λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας των δύο φυτών σε αιθέρια έλαια. Το θυμάρι, περιέχει ουσίες με αντιμυκητιακή δράση στο αιθέριο έλαιό του όμως φαίνεται ότι η συγκέντρωσή τους σε αυτό ενδεχομένως να μην επαρκεί για να ανασταλεί η ενδεχόμενη ανάπτυξή τους. (Adams & Moss, 2008) Επιπλέον, το θυμάρι είναι φυτό χαμηλής βλαστικής ανάπτυξης με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η επιμόλυνση του από μικροοργανισμούς που διαβιούν στο έδαφος σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά. Τόσο τα συστατικά του χαμομηλιού όσο και της ρίγανης διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση γεγονός που συνηγορεί στη περιορισμένη ανάπτυξη μυκήτων. (Tolouee *et al.*, 2010, Roby *et al.*, 2013, Adam *et al.*, 1998)

Οι ζύμες εμφάνισαν τη μεγαλύτερη επιμόλυνση στην περίπτωση της λουίζας και ακολούθως στο τσάι και το θυμάρι. Το χαμομήλι εμφάνισε περιορισμένη επιμόλυνση ενώ η ρίγανη δεν παρουσίασε ανάπτυξη αποικιών. Η επιμόλυνση με ζύμες δεν

παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με την επιμόλυνση με μύκητες σε όλα τα δείγματα εκτός από τη λουίζα που ήταν μεγαλύτερη. Οι μύκητες (ευρωτομύκητες) όπως και οι ζύμες (ζυμομύκητες) διαθέτουν ανθεκτικότητα στις ίδιες συνθήκες κι ευδοκιμούν στο ίδιο περιβάλλον γεγονός που εξηγεί την αντιστοιχία των πληθυσμών τους. Οι ζύμες και οι μύκητες που αναπτύσσονται στα τρόφιμα προκαλούν αλλοιώσεις αλλά όχι παθογένεια (Ταούκης). Κάποια, όμως, είδη μυκήτων κάτω από ορισμένες συνθήκες αναπτύσσουν ιδιαίτερα τοξικές μυκοτοξίνες.

Η μεγαλύτερη επιμόλυνση με είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae παρατηρήθηκε στη λουίζα, ενώ ακολούθησαν το τσάι, το χαμομήλι και το θυμάρι. Στη λουίζα, το τσάι και το χαμομήλι έχει παρατηρηθεί αντιβακτηριακή δράση σε συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών. (Koutsaviti et al., 2013, Ali et al., 2011, Roby et al., 2013, Kazemi, 2014) Επομένως, τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae που αναπτύχθηκαν στα δείγματα, πιθανά να μην ανήκουν σε αυτά τα είδη, ή δεν επηρεάζονται λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας των φυτών σε αιθέρια έλαια. Η ρίγανη δεν παρουσίασε ανάπτυξη αποικιών πιθανά λόγω της αντιβακτηριακής δράσης των συστατικών του αιθέριου ελαίου της (Sivropoulou et al., 1996). Το θυμάρι περιέχει τα ίδια δραστικά συστατικά με τη ρίγανη όμως σε μικρότερες ποσότητες που μαζί με το μικρό ύψος ανάπτυξης του φυτού το καθιστούν επιρρεπές στην επιμόλυνση.

Τα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae ανευρίσκονται παντού (έδαφος, χώμα, νερό, φυτά, φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου). Επομένως, το αυξημένο φορτίο των περισσότερων δειγμάτων πιθανόν να σχετίζεται και με την τοποθεσία της καλλιέργειας καθώς και την έλλειψη ορθών πρακτικών υγιεινής κατά τη συγκομιδή και μεταποίησή της.

Σε κανένα από τα δείγματα δεν υπήρξε ανάπτυξη πληθυσμού του παθογόνου κολοβακτηριοειδούς *Escherichia coli* καθώς και εντερόκοκκων, μεγαλύτερη του ελάχιστου επιπέδου ανίχνευσης. Και οι δύο αυτές μικροβιολογικές αναλύσεις αποτελούν ενδείξεις άμεσης ή έμμεσης περιττωματικής προέλευσης.

Πίνακας 3. 1: Μέσες τιμές αρχικού μικροβιακού φορτίου (log cfu/g) των δειγμάτων των πέντε διαφορετικών δρογών

	OMX	μύκητες	ζύμες	Enterobacteriaceae	εντερόκοκκοι	E. coli
ΛΟΥΙΖΑ	5,84 <sup>a</sup>	3,84 <sup>a</sup>	4,43 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	< 2,00	0
ΡΙΓΑΝΗ	6,68 <sup>a</sup>	2,10 <sup>b</sup>	< 2,00 <sup>b</sup>	< 1,00 <sup>b</sup>	< 2,00	0
ΤΣΑΙ	5,03 <sup>a</sup>	3,77 <sup>a</sup>	3,76 <sup>c</sup>	3,31 <sup>c</sup>	< 2,00	0
ΧΑΜΟΜΗΛΙ	5,15 <sup>a</sup>	2,36 <sup>b</sup>	2,44 <sup>d</sup>	3,18 <sup>c</sup>	< 2,00	0
ΘΥΜΑΡΙ	6,06 <sup>a</sup>	3,52 <sup>a</sup>	3,57 <sup>c</sup>	3,27 <sup>c</sup>	< 2,00	0

Μέσες τιμές ακολουθούμενες από διαφορετικά γράμματα στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05%

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν είναι μικρότερος από τον αριθμό των ζώντων μικροοργανισμών (TVC) διότι:

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται μέσα στο μείγμα μεμονωμένοι και με μορφή αθροισμάτων. Μερικοί από τους μικροοργανισμούς δεν αναπτύσσονται στις συνθήκες επώασης που έχουν επιλεγεί για τις μικροβιολογικές αναλύσεις.

Η μέθοδος αρίθμησης των αποικιών βασίζεται στην αρχή ότι από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μία και μόνο αποικία και συνεπώς η μέτρηση των αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών από όπου προήλθαν.

Επιπλέον υπάρχουν και κατηγορίες μικροοργανισμών που δεν μελετήθηκαν με χρήση εκλεκτικών υλικών πχ. *Pseudomonas*. Επίσης, υπάρχουν μικροοργανισμοί που δεν είναι ικανοί να αναπτυχθούν στα εκλεκτικά τους υποστρώματα κυρίως λόγω ότι πιθανόν να βρίσκονταν σε συνθήκες καταπόνησης.

### 3.1.2. Ταυτοποίηση μυκήτων

Η ταυτοποίηση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διευκρινιστεί το ενδεχόμενο παρουσίας τοξικογενών μυκήτων στα δείγματα των αρωματικών φυτών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ώστε κατόπιν οζονισμού, τα αποτελέσματα αυτά να αποτελέσουν αναφορά προκειμένου να διευκρινιστεί η ενδεχόμενη επίδρασή του O<sub>3</sub> σε συγκεκριμένα γένη.

Ακολουθώς, παρατίθενται οι φωτογραφίες των μορφολογικών χαρακτηριστικών βάσει των οποίων έγινε η ταυτοποίηση των μυκήτων καθώς και η περιγραφή τους.

#### ♦ *Cladosporium herbarum*

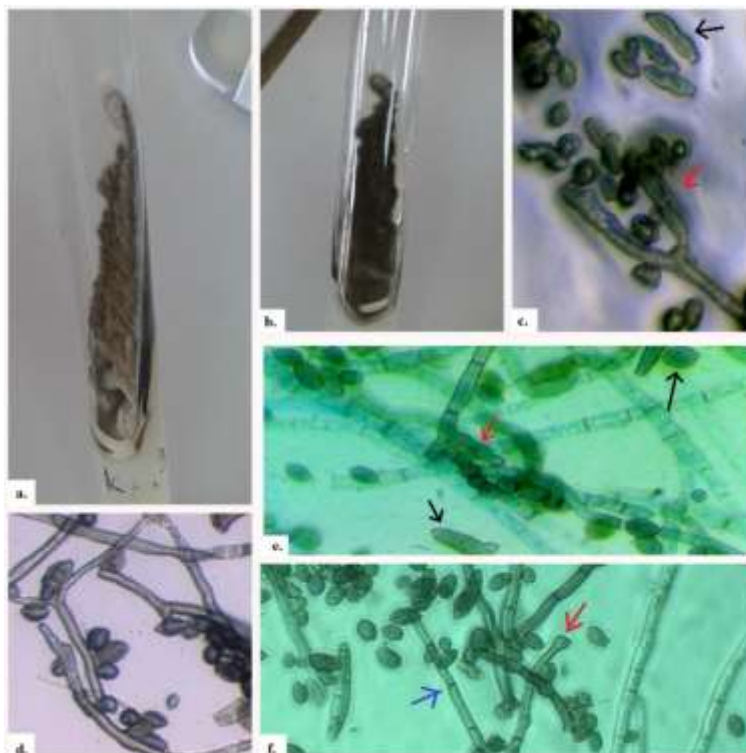
Οι αποικίες είναι βραδείας ανάπτυξης. Η εξάνθηση του μύκητα έχει χρώμα ελαιοκαστανό ή γκριζοκαστανό και υφή βελούδου (Εικόνα 3.1. a-b) (Παναγόπουλος, 1995, Ellis *et al.*, 2007)

Οι κονιδιοφόροι είναι ευθυτενείς χρώματος ελαιοκαστανού διακλαδισμένοι ποικιλοτρόπως κοντά στην κορυφή σε σύμπλεγμα ή μονοί.

Τα κονίδια είναι ελαιοκαστανά μονοκύτταρα ή δικύτταρα ποικίλα σε σχήμα και μέγεθος, ελειψοειδή ή κυλινδρικά (ορισμένα χαρακτηριστικού λεμονοειδούς σχήματος). Παράγονται από μικρές επάκριες ή πλευρικές γονατοειδείς διογκώσεις

των κονιδιοφόρων σε απλές ή διακλαδισμένες ακροπέταλες αλυσίδες. (Εικόνα 3.1. c-f)

Πρόκειται για είδος μύκητα παρασιτικό ή σαπροφυτικό σε φυτικό υλικό και ανευρίσκεται παντού. Δεν παράγει μυκοτοξίνες (Ellis *et al.* 2007)



Εικόνα 3. 1: *Cladosporium herbarum*. a-b αποικία σε PDA, 13 d, 25° C (a) πλάγια όψη (b) εμπρόσθια όψη c-f 6 d, 25° C c-f μεγέθυνση x 400 (c) κονιδιοφόροι (κόκκινο βέλος) δικύτταρο κονίδιο (μαύρο βέλος) d-f μυκηλιακές υφές με διάφραγμα (μπλε βέλος) κονιδιοφόροι (κόκκινα βέλη) (e) κυλινδρικό κονίδιο, λεμονοειδές κονίδιο (μάυρα βέλη)

♦ *Alternaria* spp.

Οι αποικίες είναι ταχείας ανάπτυξης. Οι εξανθήσεις έχουν χρώμα καστανό έως μαύρο και βελούδινη όψη. (Εικόνα 3.2. a-b)

Μικροσκοπικά, παρατηρήθηκαν διακλαδισμένες ακροπέταλες αλυσίδες των κονιδίων που παράγονται συμποδιακά από απλούς, ορισμένες φορές διακλαδισμένους κονιδιοφόρους, βραχείς ή επιμήκεις. (Εικόνα 3.2 f)

Τα κονίδια σχηματίζονται σε αλυσίδες έως δέκα μονάδων και στη συνέχεια παρουσιάζουν διαφράγματα τόσο πλαγίως όσο και κατά μήκος με έως έξι εγκάρσια και δύο έως τρία διαμήκη ή λοξά διαφράγματα (δικτυοκονίδια).

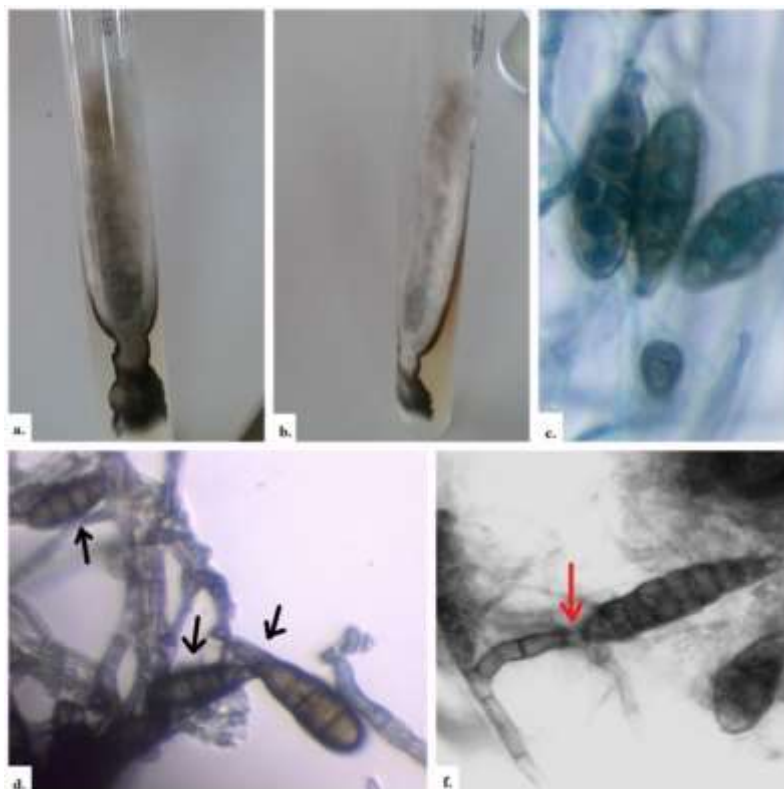
Είναι χρώματος λαδί καστανού έως σκούρου καστανού, μερικές φορές ωοειδή ή ελλειψοειδή συχνά με ένα μικρό κωνικό ή κυλινδρικό ράμφος, με λεία ή ακροχορδονώδη τοιχώματα. (Εικόνα 3.2 c-d) (Pitt *et al.*, 2009)



Τα περισσότερα είδη είναι παρασιτικά ή σαπροφυτικά σε φυτικό υλικό ανευρίσκονται παντού και ορισμένες φορές προέρχονται από το έδαφος.

Μεταξύ του δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν εντοπίστηκαν και ορισμένα που πιθανά ανήκουν στο είδος *A. alternata*.

Το είδος *Alternaria alternata* παράγει αρκετές τοξίνες εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι το τενουζοϊκό οξύ (ΤΑ) (Logrieco et al., 2003). Λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες αποτελούν η αλτερναριόλη (ΑΟΗ) και ο μονομεθυλεθαίρας της αλτερναριόλης (ΑΜΕ), αλτενουένη (ΑΕ) και αλτερτοξίνη I, II και III (Logrieco et al., 2003; Pitt et al., 2009). Οι αλτερτοξίνες παρουσιάζουν μεταλλαξιγόνο δράση, ιδιαίτερα η αλτερτοξίνη III όπου η μεταλλαξιγένεση που παρουσιάζει είναι δέκα φορές μικρότερη από αυτή της αφλατοξίνης Β1 (Bottalico and Logrieco, 1998).



Εικόνα 3. 2: *Alternaria* spp. a-b αποικία σε PDA 13 d, 25°C (a) πλάγια όψη (b) εμπρόσθια όψη c-f μεγέθυνση x 400 (c) δικτυοκονίδια (d) κονίδια με οριζόντιο διάφραγμα (μαύρα βέλη) (f) βραχύς κονιδιοφόρος με δικτυοκονίδιο (κόκκινο βέλος)

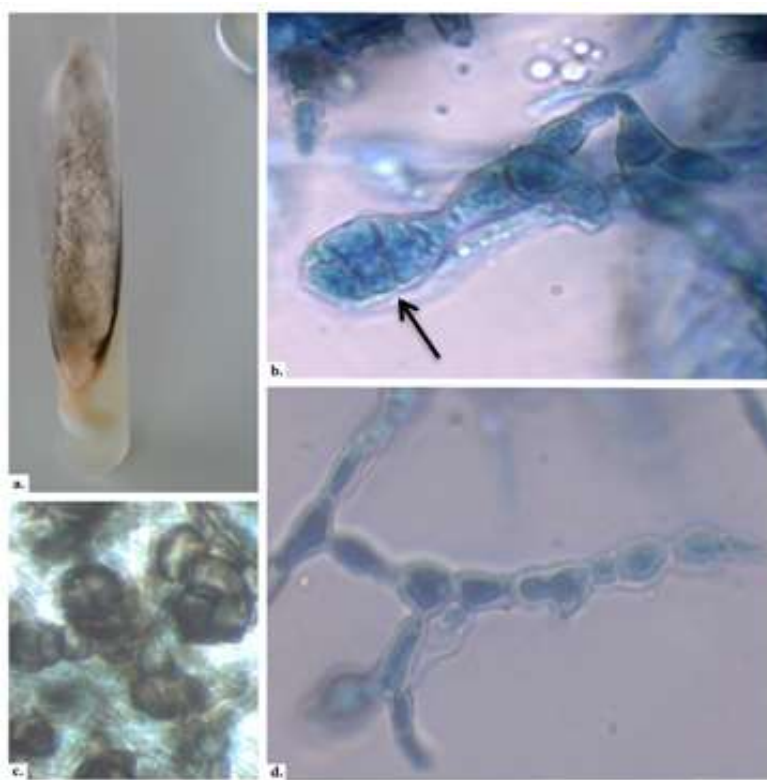
♦ *Ulocladium* spp.

Το γένος *Ulocladium* είναι παρόμοιο με το γένος *Alternaria* καθώς και τα δύο παράγουν κονίδια τόσο με διαμήκη όσο και με εκάρσια διαφράγματα. Βέβαια, τα κονίδια του γένους *Ulocladium* είναι στενότερα στη βάση από ότι στην

κορυφή με εύκαμπτη άκρη. Παρόλο που αυτός ο διαχωρισμός διατηρήθηκε από τον Simmons (2007), μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι το γένος *Ulocladium* δεν μπορεί να διαχωριστεί από το γένος *Alternaria* (Pryor and Gilbertson, 2000, de Hoog and Horre', 2002, Pryor and Bigelow, 2003).

Οι αποικίες είναι ταχύτατα αναπτυσσόμενες. Οι εξανθήσεις έχουν χρώμα ελαιοκαστανό ή γκριζοκαστανό και υφή βελούδου. (Εικόνα 3.3 a)

Μικροσκοπικά, διακρίνονται πολλά συνήθως μονήρη δικτυοκονίδια. (Εικόνα 3.3 c) Είναι σκούρου καφέ χρώματος και συχνά έχουν τραχιά τοιχώματα. Όλα τα είδη είναι σαπρόφυτα. Δεν παράγουν μυκοτοξίνες.



Εικόνα 3. 3: *Ulocladium* spp. (a) αποικία σε PDA 13 d, 25°C b-d 10 d, 25°C μεγέθυνση x 400 (c) δικτυοκονίδια (b,d) συμποδιακά επιμηκνόμενοι με γονάτια κονιδιοφόροι δικτυοκονίδιο (μαύρο βέλος)

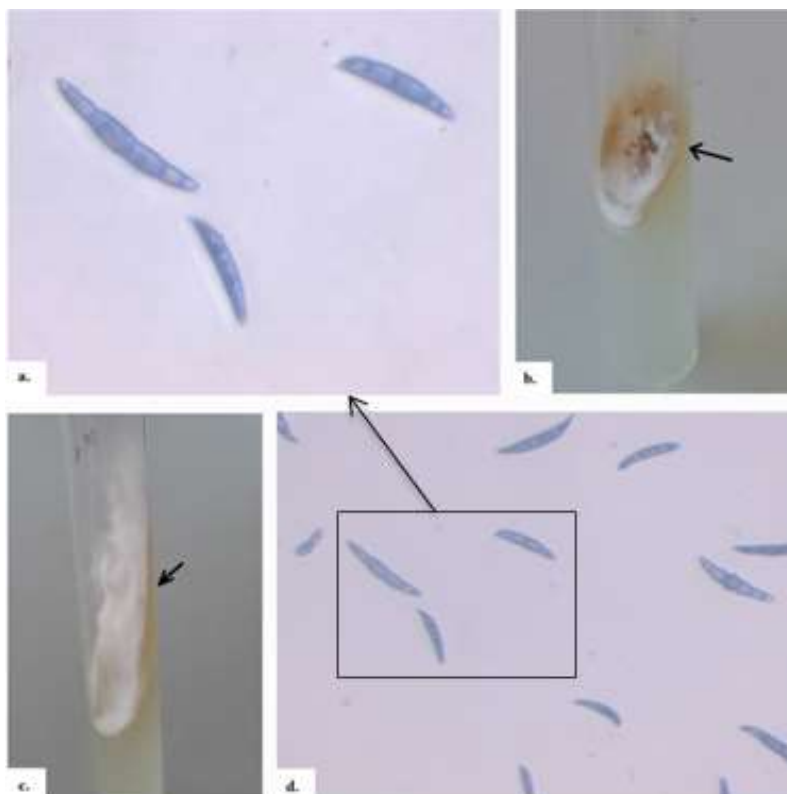
♦ *Fusarium* spp.

Οι αποικίες είναι ταχέως αναπτυσσόμενες ωχρού χρωματισμού, με ή χωρίς βαμβακώδες εναέριο μυκήλιο ανάλογα το είδος. (Εικόνα 3.4 b,c) Τα διάφορα είδη τυπικά παράγουν τόσο μακροκονίδια όσο και μικροκονίδια από λεπτά φιαλίδια.

Τα μακροκονίδια είναι υαλώδη δικύτταρα έως πολυκύτταρα, ατρακτοειδή ως επί το πλείστο με ένα επίμηκες ακραίο κύτταρο. (Εικόνα 3.4 a,d) Δημιουργούνται πάνω σε ένα φιαλίδιο που σχηματίζεται στην υφή ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου. Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω σε ένα

φιαλίδιο που σχηματίζεται στην υφή ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου. Είναι μονοκύτταρα ή δικύτταρα, υαλώδη, μικρότερα από τα μακροκονίδια, ωσειδή - ελλειψοειδή, κυλινδρικά. (Παναγόπουλος, 1995)

Το γένος *Fusarium* είναι ένα από τα τρία κυριότερα που παράγουν μυκοτοξίνες (Pitt et al., 2009). Οι περισσότερο διαδεδομένες του συγκεκριμένου γένους είναι οι τριχοθεσίνες και οι φουμονισίνες ενώ άλλες γνωστές είναι η μονιφορμίνη και το φουσαρικό οξύ. Οι φουμονισίνες σχετίζονται με πρόκληση καρκίνου του οισοφάγου στον ανθρώπινο οργανισμό.



Εικόνα 3. 4: *Fusarium* spp. (a) μεγένθυση μακροκονιδίων τμήματος d b-c χαρακτηριστικός χρωματισμός υποστρώματος (μαύρα βέλη) (b) αποικία σε PDA, 6 d, 25°C (c) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (d) μακροκονίδια μεγέθυνση x 400, 4 d, 25°C

♦ *Penicillium* spp.

Οι αποικίες είναι ταχέως αναπτυσσόμενες, Οι εξανθήσεις έχουν χαρακτηριστικό πράσινο ή μπλε χρώμα. (Εικόνα 3.5 a-b) (Τζάμος, 2007)

Μικροσκοπικά, διακρίθηκε η παραγωγή αλυσίδων μονοκύτταρων κονιδίων από το φιαλίδιο. Τα φιαλίδια μπορούν να παραχθούν μεμονωμένα σε ομάδες ή από διακλαδώσεις, αποδίδοντας εμφάνιση παρόμοιας με πινέλο. (Τζάμος, 2007) Η διακλάδωση μπορεί να είναι είτε απλή (μη-διακλαδισμένο ή μονοσπονδυλωτό), ενός σταδίου διακλαδισμένο (δισπονδυλώδες-συμμετρικό), δύο σταδίων διακλαδισμένη (δισπονδυλώδες-ασύμμετρο) ή τριών έως περισσότερων σταδίων

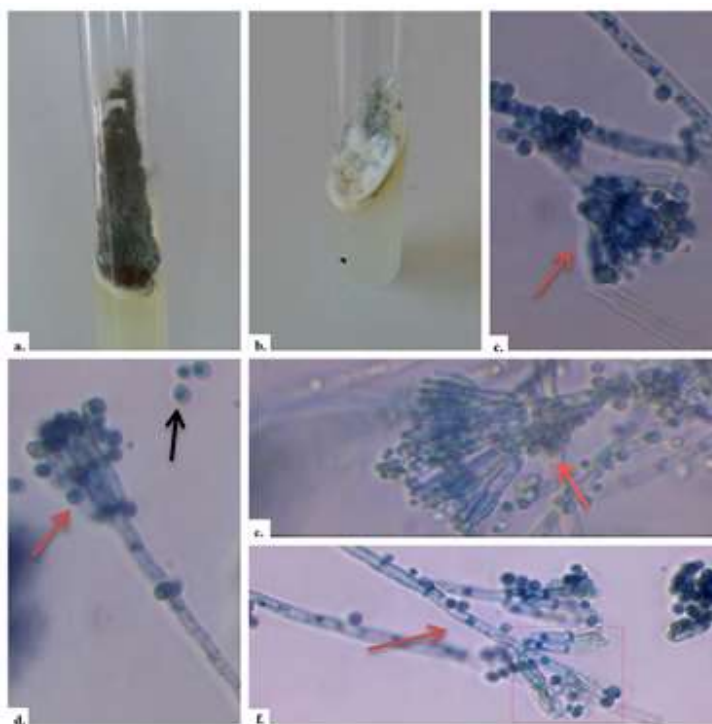
διακλαδισμένο. Βάση της μορφής της διακλάδωσης πραγματοποιείται η ταυτοποίηση του είδους. (Pitt *et al.*, 2009) (Εικόνα 3.5 c-f)

Οι κονιδιοφόροι είναι υαλώδεις, με λεία ή τραχιά τοιχώματα. Τα κονίδια είναι σφαιρικά ή ωοειδή, υαλώδη. (Τζάμος, 2007)

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει πολλά τοξικογενή είδη και το εύρος των μυκοτοξινών που παράγουν είναι μεγαλύτερο από κάθε άλλο γένος (Pitt *et al.*, 2009). Οι τοξίνες του συγκεκριμένου γένους κατηγοριοποιούνται βάσει της δράσης τους:

- σε όσες επιδρούν στη λειτουργία των νεφρών και του συκωτιού και
- σε όσες επιδρούν ως νευροτοξίνες

Από τις πιο σημαντικές είναι η οχρατοξίνη A (*P. verrucosum*), η πατουλίνη (*P. expansum*) και η κιτρινίνη (*P. citrinum*).



Εικόνα 3. 5: *Penicillium* spp. (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (b) αποικία σε PDA, 6 d, 25°C c-f 4 d, 25°C μεγέθυνση x 400 διάφορα είδη διακλάδωσης (κόκκινα βέλη), στρογγυλά υαλώδη λεία κονίδια (μαύρο βέλος) (c,d) μονοσπονδυλωτά (e) δισπονδυλώδες συμμετρικό (f) δισπονδυλώδες ασύμμετρο

- *Aspergillus* spp.

Το γένος *Aspergillus* υπολείπεται της ποικιλομορφίας του *Penicillium* όμως υπερτερεί ως προς την ικανότητα να αναπτύσσεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και χαμηλότερη ενεργότητα ύδατος.

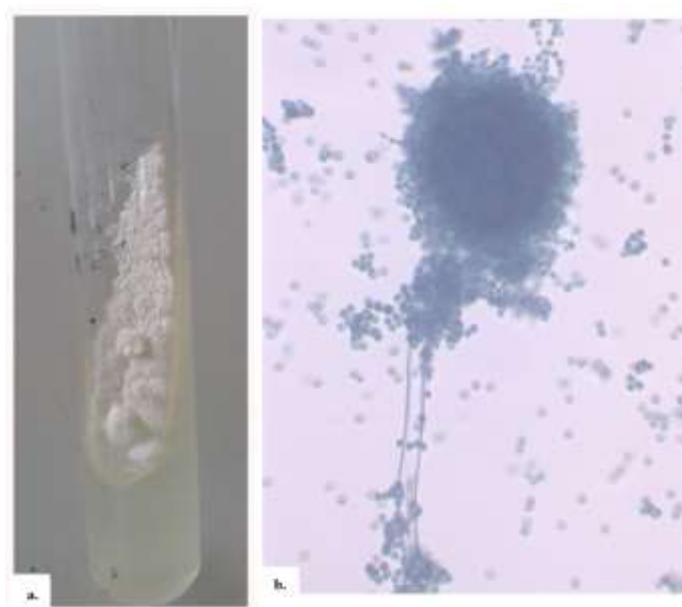
Σύμφωνα και με τους Ellis *et al.* (2007) και Τζάμος (2007), οι αποικίες *Aspergillus* είναι ταχέως αναπτυσσόμενες, λευκές, κίτρινες, καφέ έως μαύρες ή σε αποχρώσεις του πράσινου. Ως επί το πλείστο αποτελούνται από ένα πυκνό στρώμα όρθιων κονιδιοφόρων. Οι κονιδιοφόροι καταλήγουν σε σφαιροειδή διογκωμένη βάση (κεφαλή) στην οποία προσφύονται στηρίγματα που φέρουν κονίδια σε αλυσίδες.

Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, σφαιροειδή, με επιφάνεια λεία ή με δακτυλοειδείς προεξοχές χρώματος σκούρου καστανού ή μαύρου.

♦ *Aspergillus section flavi*

Οι αποικίες είναι κοκκώδεις, κίτρινες φωτεινές έως σκούρες κίτρινοπράσινες. Οι κονιδιοφόροι είναι υαλώδεις και τραχείς κοντά στην κύστη. Τα κονίδια είναι στρογγυλά, ελαφρώς τραχιά ή λεία. (Εικόνα 3.6) (Ellis *et al.*, 2007)

Τα είδη του γένους *Aspergillus section flavi* παράγουν τις αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>. Η B<sub>1</sub> βρίσκεται συνήθως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση και θεωρείται ότι προκαλεί καρκίνο του ήπατος (Ellis *et al.*, 2009).



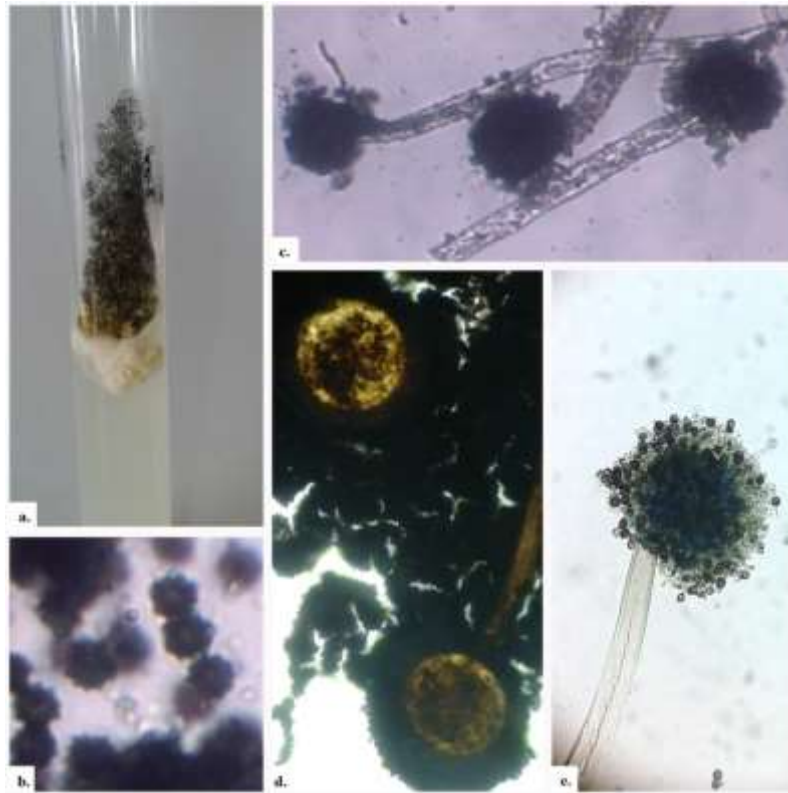
Εικόνα 3. 6: *Aspergillus section flavi* (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C b-c 8 d, 25°C (b) κονιδιοφόρος με σφαιροειδή διογκωμένη βάση με κονίδια μεγέθυνση x 400

♦ *Aspergillus section nigri*

Οι αποικίες αποτελούνται από ένα συμπαγές λευκό έως κίτρινο υπόστρωμα που καλύπτονται από ένα πυκνό στρώμα κονιδιακών κεφαλών. Οι κονιδιακές κεφαλές είναι μεγάλες, σφαιρικές, σκούρες καφέ. Οι κονιδιοφόροι έχουν λείο

τοίχωμα, είναι υαλώδεις ή σκουραίνουν κοντά στην βάση. Τα κονίδια είναι σφαιρικά, σκούρα καφέ - μαύρα και τραχιά. (Ellis *et al.*, 2007) (Εικόνα 3.7)

Σύμφωνα με τους Abarca *et al.* (1994) 2 από 19 απομονώσεις *A. niger* βρέθηκε ότι παράγουν την οχρατοξίνη Α.



Εικόνα 3. 7: *Aspergillus section nigri* (a) αποικία σε PDA, 13 d, 25°C (b) κονίδια c-e 5 d, 25°C κονιδιοφόροι με σφαιροειδή διογκωμένη βάση με κονίδια μεγέθυνση x 400

Εκτός από τα ανωτέρω γένη *Aspergillus* απομονώθηκαν δύο ακόμη τα οποία λήφθηκαν υπόψη ως *Aspergillus* spp.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των απομονώσεων θεωρήθηκαν ως πιθανά καθώς απαιτούνται τεχνικές γενετικής ταυτοποίησης προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2 από τις 68 αποικίες που απομονώθηκαν συνολικά οι 16 (23.5%) αποτελούσαν ζύμες και οι 52 (76,5%) μύκητες.

Πίνακας 3. 2: Αποτελέσματα ταυτοποίησης απομονώσεων αρχικού μικροβιακού φορτίου. Με την επισήμανση «x» χαρακτηρίζονται τα άγνωστα είδη. Με την επισήμανση «-» χαρακτηρίζεται η μη περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας

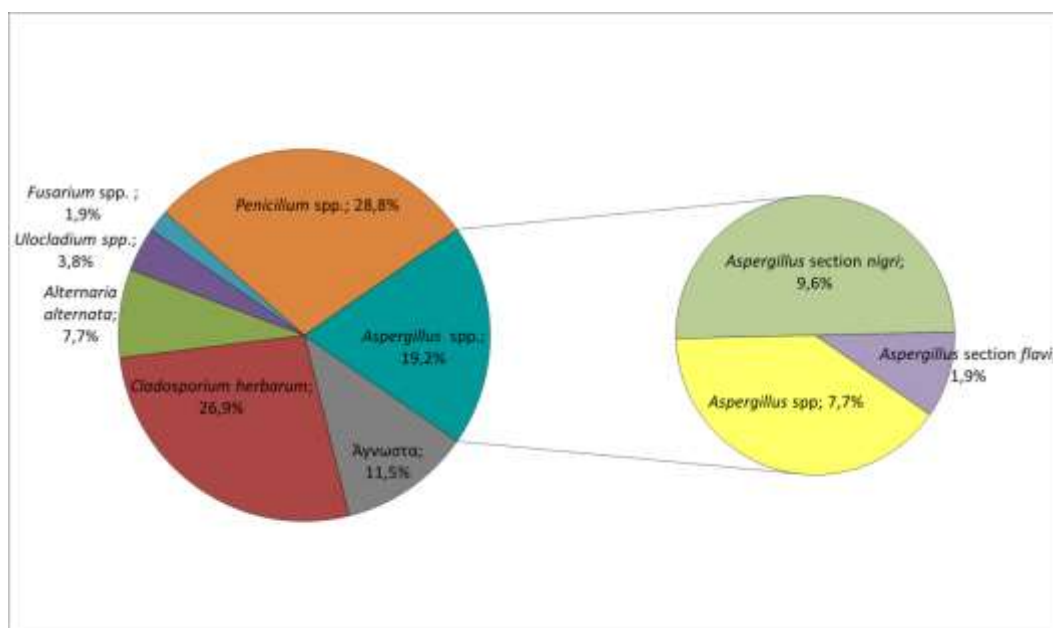
A/A	A/A ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	A/A	A/A ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
1	1	Λουίζα 1 -1	34	Ζύμη	35	14	Τσάι 3 -1	12	<i>Alternaria</i> sp.
2	2		35	<i>Alternaria</i> sp.	36	15		13	<i>Cladosporium herbarum</i>
3	3		36	<i>Cladosporium herbarum</i>	37	16		14	Ζύμη
4	4		37	Ζύμη	38	17		15	<i>Cladosporium herbarum</i>
5	5		38	Ζύμη	39	18	Τσάι 3 -2	10	x
6	6	Λουίζα 1 -2	39	x	40	19		11	Ζύμη
7	7	Λουίζα 2 -1	16	<i>Aspergillus</i> sp.	41	1	Θυμάρι 1 -1	58	<i>Penicillium</i> sp.
8	8		17	<i>Alternaria</i> sp.	42	2		59	Ζύμη
9	9		18	<i>Cladosporium herbarum</i>	43	3		60	<i>Penicillium</i> sp.
10	10		19	<i>Cladosporium herbarum</i>	44	4		61	<i>Penicillium</i> sp.
11	11	Λουίζα 2 -2	20	<i>Cladosporium herbarum</i>	45	5		62	<i>Fusarium</i> sp.
12	12		21	<i>Penicillium</i> sp.	46	6		68	<i>Penicillium</i> sp.
13	13	Λουίζα 3 -1	1	<i>Cladosporium herbarum</i>	47	7	Θυμάρι 1 -2	23	<i>Penicillium</i> sp.
14	14		2	Ζύμη	48	8		24	Ζύμη
15	15		3	<i>Cladosporium herbarum</i>	49	9	Θυμάρι 2 -1	25	<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>
16	16		4	<i>Cladosporium herbarum</i>	50	10		26	<i>Penicillium</i> spp.
17	17		5	<i>Alternaria</i> sp.	51	11		27	<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>
18	18		6	Ζύμη	52	12		28	<i>Penicillium</i> sp.
19	19	Λουίζα 3 -2	7	<i>Cladosporium herbarum</i>	53	13		29	<i>Ulocladium</i> sp.
20	20		8	<i>Aspergillus</i> sp.	54	14	Θυμάρι 2 -2	22	<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>
21	21		9	Ζύμη	55	15	Θυμάρι 3 -1	30	<i>Penicillium</i> sp.
22	1	Τσάι 1 -1	50	<i>Cladosporium herbarum</i>	56	16		31	<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>
23	2		51	Ζύμη	57	17		32	<i>Penicillium</i> spp.
24	3		52	Ζύμη	58	18		33	<i>Ulocladium</i> spp.
25	4		53	Ζύμη	59	1	Χαμομήλι 1 -1	40	<i>Aspergillus</i> section <i>nigri</i>
26	5	Τσάι 1 -2	46	<i>Penicillium</i> sp.	60	2	Χαμομήλι 2 -1	41	<i>Cladosporium herbarum</i>
27	6		47	x	61	3		42	<i>Cladosporium herbarum</i>
28	7		48	<i>Penicillium</i> sp.	62	4	Χαμομήλι 3 -1	64	Ζύμη
29	8		49	Ζύμη	63	5		65	<i>Penicillium</i> sp.
30	9	Τσάι 2 -1	54	x	64	6		66	-
31	10		55	<i>Penicillium</i> sp.	65	7	Χαμομήλι 3 -2	67	<i>Aspergillus</i> sp.
32	11		56	<i>Aspergillus</i> sp.	66	1	Ρίγανη 2 -1	43	x
33	12		57	<i>Cladosporium herbarum</i>	67	2		44	<i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>
34	13	Τσάι 2 -2	63	Ζύμη	68	3	Ρίγανη 2 -2	45	<i>Penicillium</i> sp.

Αναλυτικά οι μύκητες που ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των 52 απομονώσεων όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1 είναι *Penicillium* spp. (28,8%), *Cladosporium herbarum*. (26,9%), *Aspergillus* spp. (19,2%), *Alternaria* spp. (7,7%),

*Ulocladium* spp. (3,8%) και *Fusarium* spp. (1,9%). Από τα είδη *Aspergillus* ταυτοποιήθηκαν τα εξής: *Aspergillus* section *nigri* (9,6%) και *Aspergillus* section *flavi* (1,9%). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. (Wojcik-Stopczynska *et al.*, 2009, Bugno *et al.*, 2006, Zukiewicz-Sobczak *et al.*, 2013)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι τα δείγματα περιείχαν εκτός από φυτοπαθογόνους μύκητες και μύκητες αποθήκευσης. Ως μύκητες αποθήκευσης αναφέρονται εκείνα τα γένη (πχ. *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* spp.) που είναι κατάλληλα προσαρμοσμένα ώστε να αναπτύσσονται σε συνθήκες αποθήκευσης ξηρών προϊόντων.

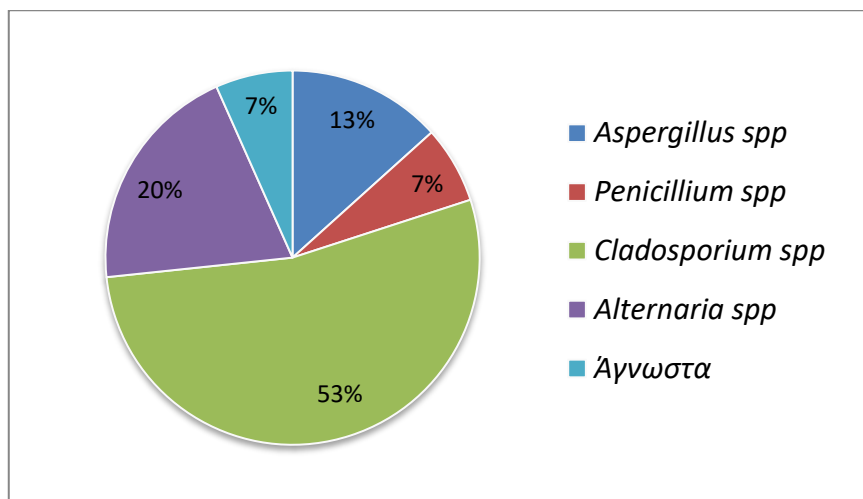
Από τα έξι γένη που ταυτοποιήθηκαν, τα τέσσερα (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) είναι γνωστό ότι περιέχουν είδη υπεύθυνα για παραγωγή μυκοτοξινών. Φαίνεται λοιπόν, ότι τα συγκεκριμένα γένη καταλαμβάνουν πάνω από το 50% του συνόλου των δειγμάτων με αποτέλεσμα, υπό κατάλληλες συνθήκες, να είναι αυξημένος ο κίνδυνος παραγωγής μυκοτοξινών στο φυτικό υλικό.



Διάγραμμα 3. 1: Ποσοστά ταυτοποίησης συνόλου απομονώσεων μυκήτων αρχικά

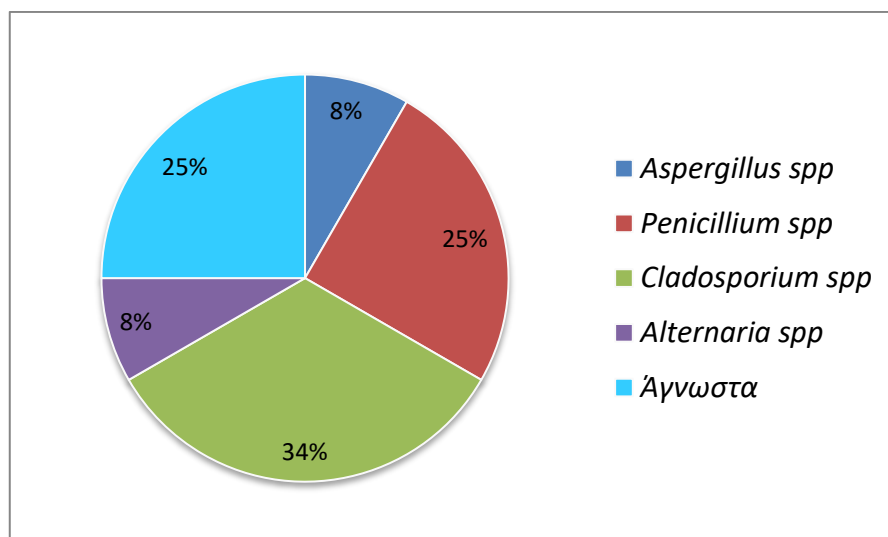
Αναφορικά με τις 15 απομονώσεις που έγιναν σε δείγματα λουίζας, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2, το είδος του μύκητα που επικράτησε φάνηκε να είναι το *Cladosporium herbarum* (8 απομονώσεις). Σημαντικά ποσοστά κατείχαν και τα γένη *Alternaria* spp. (3 απομονώσεις) και *Aspergillus* spp. (2 απομονώσεις). Επομένως, φαίνεται ότι η Λουίζα περιέχει σε ποσοστό 40% πιθανούς τοξικογενείς μύκητες.





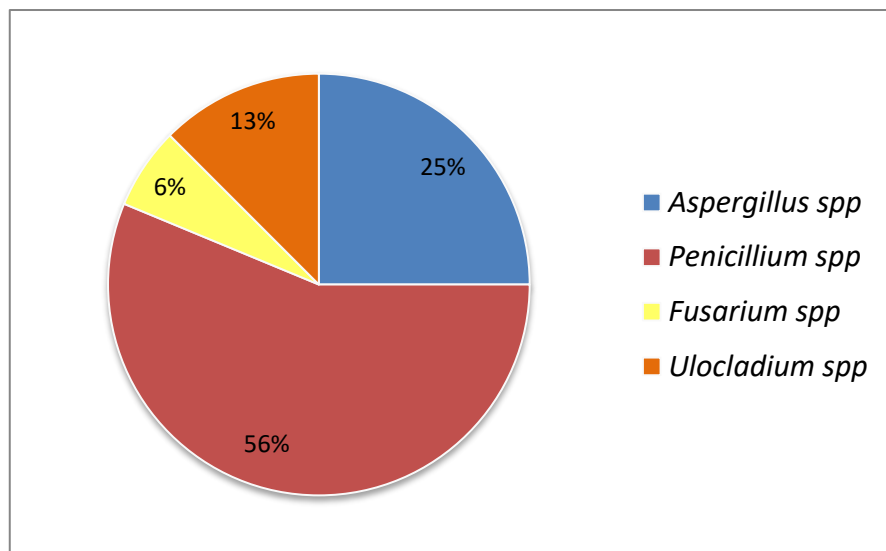
Διάγραμμα 3. 2: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα της λουίζας

Σχετικά με το τσάι, στις 12 απομονώσεις του δείγματος, οι μύκητες που επικράτησαν φάνηκε να ανήκουν στο είδος *Cladosporium herbarum*. (4 απομονώσεις). Ενώ σημαντικό ποσοστό φάνηκε να έχει και το γένος *Penicillium spp*. (3 απομονώσεις). Έτσι το τσάι στο σύνολό του φαίνεται να περιέχει σε ποσοστό 41% πιθανούς τοξικογενείς μύκητες. Επιπλέον, 3 δείγματα παρέμειναν άγνωστα εμπεριέχοντας την πιθανότητα αύξησης του ποσοστού τοξικογενών μυκήτων. (Διάγραμμα 3.3)



Διάγραμμα 3. 3: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του τσαγιού

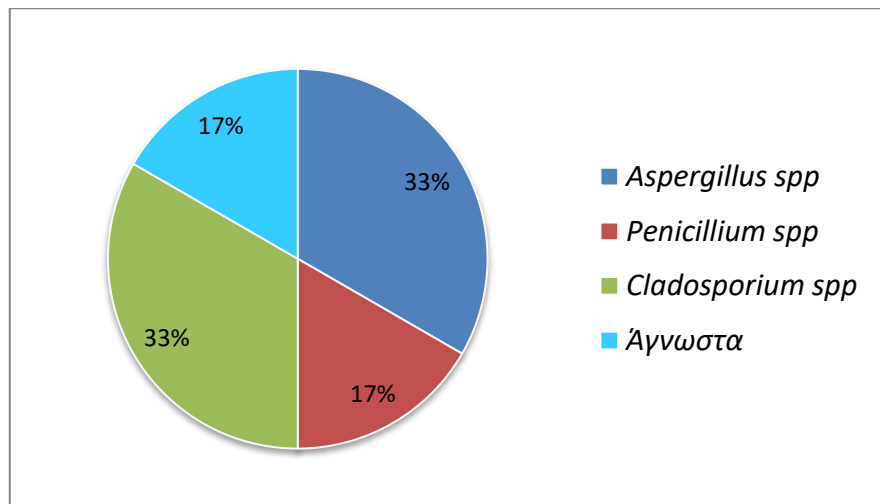
Σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα δείγματα, από τις 16 απομονώσεις του θυμαριού, οι μύκητες που επικράτησαν φάνηκαν να ανήκουν στο γένος *Penicillium* spp. (9 απομονώσεις) ενώ το αμέσως μικρότερο ποσοστό φάνηκε να ανήκει στο γένος *Aspergillus* section *nigri* (4). Το θυμάρι στο σύνολό του φαίνεται να περιέχει σε ποσοστό 87% πιθανούς τοξικογενείς μύκητες. (Διάγραμμα 3.4)



Διάγραμμα 3. 4: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του θυμαριού

Από τις 6 αποικίες που απομονώθηκαν από το δείγμα χαμομηλιού, φάνηκε να επικρατούν το γένος *Aspergillus* spp. (2 απομονώσεις) και το είδος *Cladosporium herbarum* (2 απομονώσεις) αντίστοιχα. Όσον αφορά το γένος *Aspergillus* spp. η μία απομόνωση φάνηκε να αντιστοιχεί στο section *nigri*. Επιπλέον, μία αποικία, φάνηκε να προήλθε από το γένος *Penicillium* spp. ενώ μια ακόμη παρέμεινε άγνωστη. (Διάγραμμα 3.5)

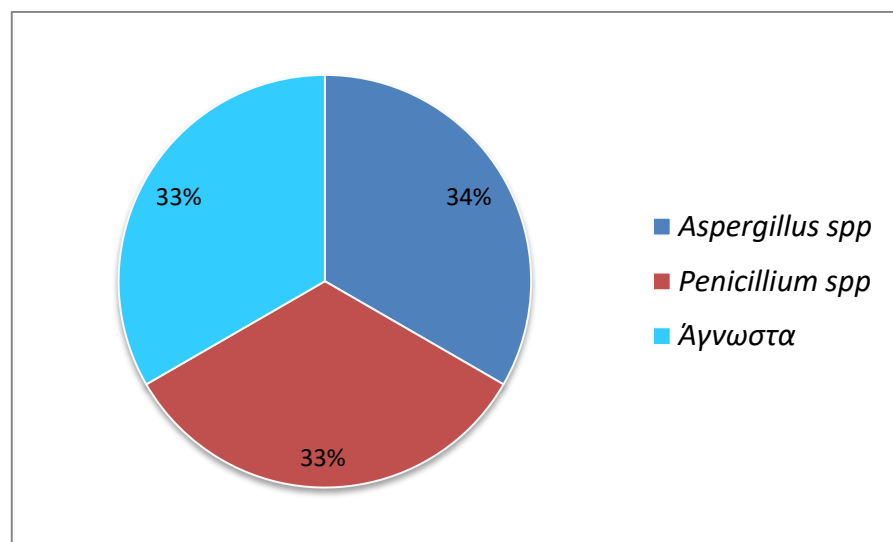
Το περιεχόμενο ποσοστό του χαμομηλιού σε πιθανούς τοξικογενείς μύκητες, φαίνεται να είναι 66%. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο φυτικό υλικό δεν παρουσίασε μεγάλη επιμόλυνση από μύκητες επομένως το ποσοστό αυτό πιθανά να μη συνιστά ενδεχόμενο κίνδυνο.



Διάγραμμα 3. 5: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα του χαμομηλιού

Από το δείγμα της ρίγανης απομονώθηκαν 3 αποικίες εκ των οποίων, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.6, η μία απομόνωση φάνηκε να ανήκει στο γένος *Aspergillus* section *flavi*, η δεύτερη στο γένος *Penicillium* sp. ενώ στην περίπτωση της τρίτης δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση.

Το περιεχόμενο ποσοστό της ρίγανης σε πιθανούς τοξικογενείς μύκητες, φαίνεται να είναι 66%, με πιθανότητα να φτάνει έως και 100% καθώς δεν ταυτοποιήθηκαν και οι τρεις απομονώσεις. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο φυτικό υλικό, όπως και το χαμομήλι, δεν παρουσίασε μεγάλη επιμόλυνση από μύκητες επομένως το ποσοστό αυτό πιθανά να μη συνιστά ενδεχόμενο κίνδυνο.



Διάγραμμα 3. 6: Ποσοστά (%) ταυτοποιημένων μυκήτων στο δείγμα της ρίγανης

Επιπλέον με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, γίνεται αντιληπτό ότι όλες οι δρόγες παρουσίασαν επιμόλυνση από *Penicillium* spp. και *Aspergillus* spp. σε

μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Μόνο στην περίπτωση του θυμαριού ταυτοποιήθηκαν μύκητες που φάνηκε να ανήκουν στα γένη *Ulocladium* spp. και *Fusarium* spp. Το είδος *Cladosporium herbarum* φάνηκε να απομονώθηκε από όλα τα δείγματα εκτός από αυτά της ρίγανης και του θυμαριού.

Τέλος, σχετικά με τα πιθανά ποσοστά παρουσίας τοξικογενών μυκήτων της κάθε δρόγης που παρατέθηκαν παραπάνω, θα πρέπει να αναφερθούν τα εξής:

- Δεν παράγουν όλα τα στελέχη ενός είδους μυκοτοξίνες
- Το κάθε είδος μύκητα, απαιτεί διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες προκειμένου να οδηγηθεί στην παραγωγή μυκοτοξινών. Ακόμη και με κατάλληλες συνθήκες δεν συνεπάγεται απαραίτητως και η παραγωγή τους

Προκειμένου να καθοριστεί η πιθανότητα ύπαρξης μυκοτοξινών ή στελεχών των μυκήτων που μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες απαιτούνται εξειδικευμένες αναλύσεις με μοριακές τεχνικές, χρήση κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων καθώς και η διερεύνηση των συνθηκών κάτω από τις οποίες τα στελέχη αυτά μπορούν να παραγάουν μυκοτοξίνες. .

Με βάση τα παραπάνω, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της επίδρασης του όζοντος στα γένη των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν, προκειμένου να μειωθεί ο ενδεχόμενος κίνδυνος παραγωγής μυκοτοξινών.

### 3.1.3. Παραλαβή αιθέριων ελαίων

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων από τα δείγματα της κάθε δρόγης πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διευκρινιστεί η περιεχόμενη σε αυτό ποσότητα καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Κατόπιν, οζονισμού τα αποτελέσματα θα αποτελέσουν αναφορά προκειμένου να διευκρινιστεί η ενδεχόμενη επίδρασή του O<sub>3</sub> σε αυτά.

Στον πίνακα 3.3 φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη απόδοση σε ποσοστό ξηρού βάρους παρουσίασε η ρίγανη ενώ τη μικρότερη το τσάι. Επίσης το τσάι χρειάστηκε τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια απόσταξης ώστε να παραληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα αιθέριου ελαίου.

Τα αποτελέσματα συμφωνούν με όσα αναφέρουν οι Κατσιώτης *et al.*, (2010), Σαμαρά, (2003), Tzakou, (2002), Vogel *et al.*(1999).

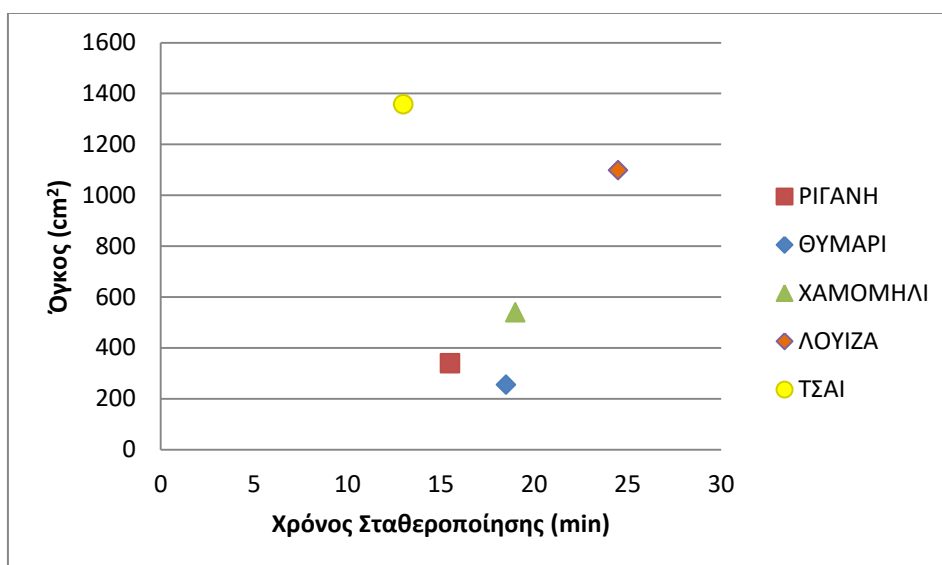
Πίνακας 3.3: Αρχική απόδοση δρογών σε αιθέριο έλαιο

προ οζονισμού	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (%) Ξ. Β.	SD	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟΣΤΑΞΗΣ (min)
ΡΙΓΑΝΗ	3,29	0,45	50
ΘΥΜΑΡΙ	1,00	0,20	60
ΛΟΥΙΖΑ	0,39	0,04	100
ΧΑΜΟΜΗΛΙ	0,20	0,01	200
ΤΣΑΙ	0,04	0,00	210

### 3.2. Χρήση όζοντος ως απολυμαντικό μέσο

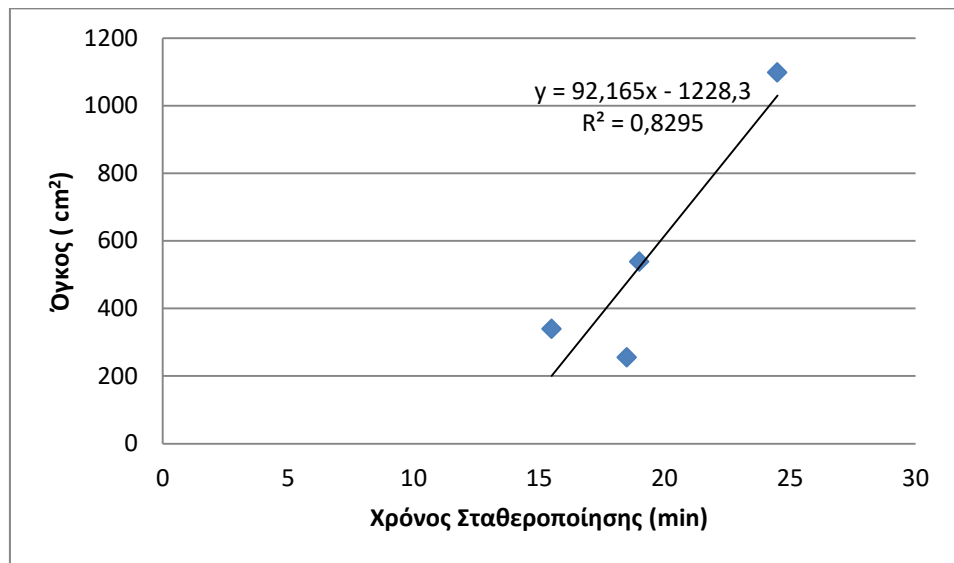
Από τις μετρήσεις που καταγράφηκαν αναφορικά με τον χρόνο που απαιτείται για τη σταθεροποίηση της συγκέντρωσης του όζοντος στην τιμή στόχο (4 ppm) και τον όγκο του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην κάθε συσχέτιση, προκύπτει ότι δεν παρατηρείται συσχέτιση των δύο παραμέτρων μόνο στα δείγματα τσαγιού, σε αντίθεση με τη γραμμική συσχέτιση που παρουσίασε ο χρόνος σταθεροποίησης της τιμής του  $O_3$  με τον όγκο του δείγματος κατά την μεταχείριση των υπόλοιπων δρογών (Διάγραμμα 3.7). Αυτό πιθανά οφείλεται στη μορφή της συγκεκριμένης δρόγης καθώς αποτελείται από ανομοιογενή φυτικά μέρη (φύλλα, ταξιανθία και βλαστούς), σε αντίθεση με τις υπόλοιπες δρόγες που παρουσιάζουν ομοιογένεια ως προς τη δομή της μάζας τους (μόνο φύλλα ή μόνο άνθη, παρόμοιο μέγεθος).

Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να εξαιρεθεί το δείγμα τσαγιού και να μελετηθεί η συσχέτιση όγκου - χρόνου σταθεροποίησης ως προς τις υπόλοιπες δρόγες. (διάγραμμα 3.8)



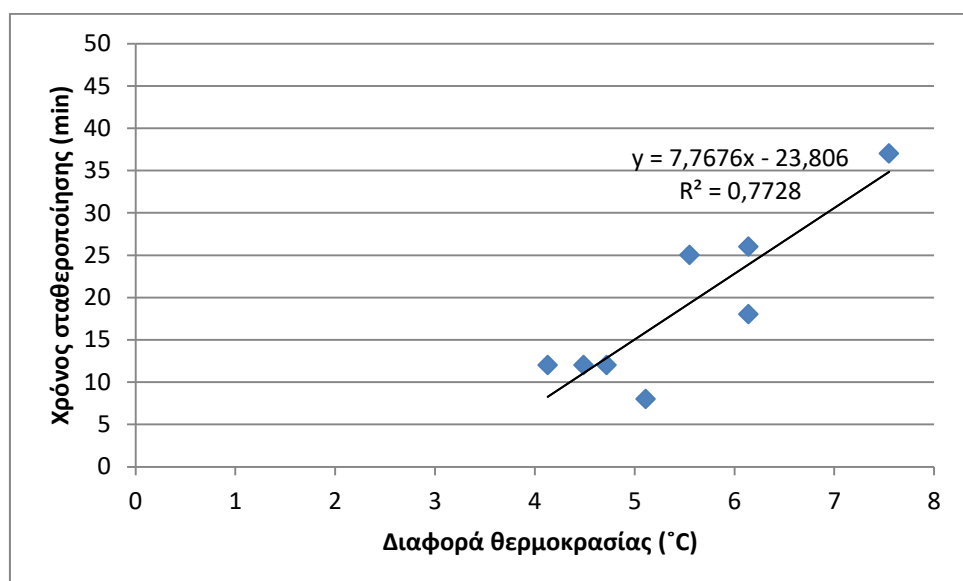
Διάγραμμα 3.7: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της τιμής του  $O_3$  με τον όγκο των δειγμάτων ρίγανης, θυμαριού, χαμομηλιού, λουίζας και τσαγιού

Αναφορικά με τη ρίγανη, το θυμάρι, το χαμομήλι και τη λουίζα, παρουσιάζεται μια γραμμική συσχέτιση ( $R^2 = 0,8$ ).



Διάγραμμα 3.8: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της τιμής του  $O_3$  με τον όγκο των δειγμάτων ρίγανης, θυμαριού, χαμομηλιού και λουίζας.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνεται μια γραμμική συσχέτιση του χρόνου που απαιτείται για την σταθεροποίηση της συγκέντρωσης του  $O_3$  με την μεταβολή της θερμοκρασίας μέσα στο θάλαμο οζονισμού, η οποία αυξάνονταν από 4 έως 7,5 °C από την έναρξη της διαδικασίας μέχρι τη σταθεροποίησης της συγκέντρωσης του  $O_3$  (Διάγραμμα 3.9). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη συμμεταβολή με την υγρασία του χώρου όπου έγινε ο οζονισμός των δειγμάτων.



Διάγραμμα 3.9: Συσχέτιση του χρόνου σταθεροποίησης της συγκέντρωσης του  $O_3$  στην τιμή των 4 ppm με την μεταβολή της θερμοκρασίας από την έναρξη της μεταχείρισης

### 3.3. Αποτελέσματα των μετρήσεων μετά τον οζονισμό των δειγμάτων

#### 3.3.1. Επίδραση στο μικροβιακό φορτίο

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνεται η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου για κάθε μεταχείριση σε σχέση με τις τιμές αναφοράς. Επιπλέον πραγματοποιείται έλεγχος της συνθήκης στην οποία αναφέρθηκε ότι προκειμένου να θεωρηθεί ένα μέσο ως απολυμαντικός παράγοντας πρέπει να επιφέρει μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά τουλάχιστον 2 λογάριθμους.

##### ❖ Λουίζα

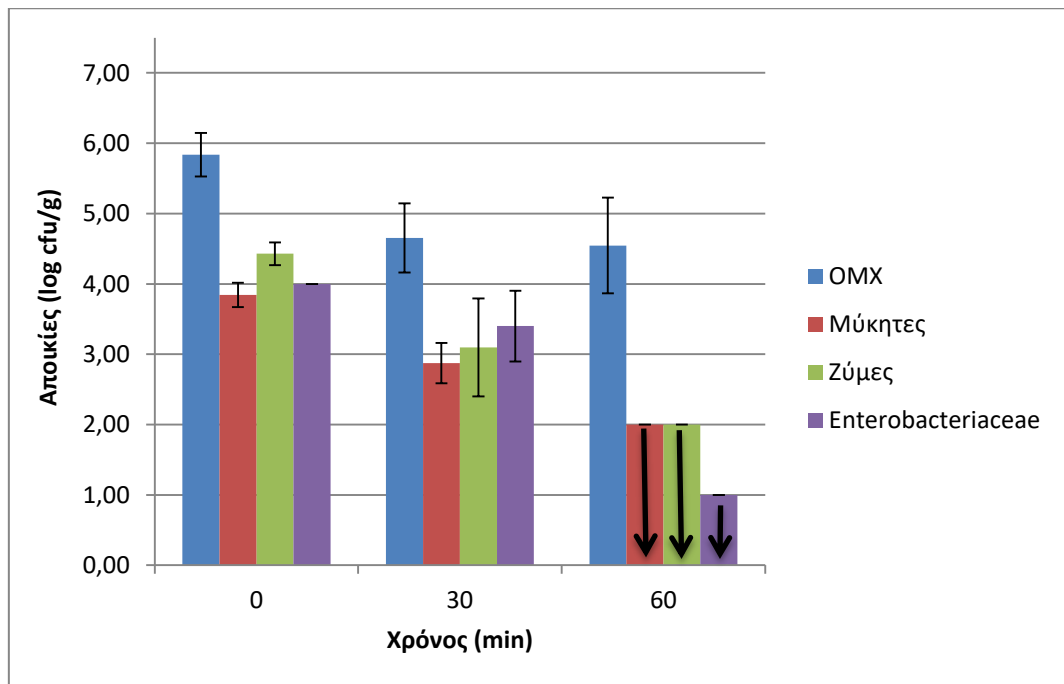
Στο Διάγραμμα 3.10 φαίνεται η μείωση του φορτίου της OMX κατά 1,2 λογάριθμους, όταν τα δείγματα υπέστησαν οζονισμό για 30 min. Οζονισμός των δειγμάτων για 60 min μείωσε τον πληθυσμό της OMX κατά 1,3 λογάριθμους χωρίς ωστόσο να επιφέρει στατιστικώς σημαντική διαφορά στον περιορισμό του, σε σχέση με αυτή που επιτευχθεί όταν το δείγμα υπέστη οζονισμό για 30 min.

Παρατηρήθηκε επίσης μια τάση περιορισμού του πληθυσμού των μυκήτων στα δείγματα λουίζας. Συγκεκριμένα, οζονισμός για χρονικό διάστημα 30 min επέφερε σημαντική μείωση του αρχικού πληθυσμού (κατά 1 λογάριθμο), ενώ οζονισμός για χρονικό διάστημα 60 min επέφερε τελικά διαφορά κατά τουλάχιστον 1,8 λογάριθμους. Οι δύο προηγούμενες μεταχειρίσεις διέφεραν στατιστικώς σημαντικά.

Μείωση παρατηρήθηκε επίσης, στον πληθυσμό των ζυμών κατά 1,3 λογάριθμους στην περίπτωση εφαρμογής  $O_3$  για 30 min και σημαντικός περιορισμός του μικροβιακού φορτίου (τουλάχιστον 2,4 λογάριθμους) στην μεταχείριση των 60 min. Τα αποτελέσματα των δύο εφαρμογών διέφεραν στατιστικώς σημαντικά.

Αναφορικά με τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, η μεταχείριση των 30 λεπτών επέφερε μείωση του αρχικού πληθυσμού τους κατά 0,6 λογάριθμους ενώ πενταπλάσια μείωση της ανάπτυξης του πληθυσμού (τουλάχιστον κατά 3 λογάριθμους) παρατηρήθηκε με εφαρμογή  $O_3$  για 60 min. Και στην περίπτωση αυτή, οι μεταχειρίσεις διέφεραν στατιστικώς σημαντικά.





Διάγραμμα 3. 10: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη λουίζας πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O<sub>3</sub>, για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι η εφαρμογή του O<sub>3</sub> επέδρασε θετικά στον περιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού της λουίζας. Ωστόσο η μείωση του πληθυσμού της OMX δεν επαρκεί ώστε να θεωρηθεί το O<sub>3</sub> απολυμαντικός παράγοντας για τη συγκεκριμένη μικροχλωρίδα, όταν εφαρμόζεται σε δρόγη λουίζας ακόμη και για 60 min σε συγκέντρωση 4ppm. Αυτό ενδεχομένως παρατηρήθηκε γιατί στην OMX συμμετέχουν και μικροοργανισμοί εκτός από αυτούς που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (μύκητες, ζύμες, βακτήρια). Επίσης τα αυξημένα επίπεδα μπορεί να προήλθαν από σπόρια βακτηρίων, τα οποία όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο όζον, καθώς και στρεσαρισμένων επιζώντων μικροοργανισμών οι οποίοι δεν ήταν δυνατό να αναπτυχθούν στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (DG-18, VRBGA) και να καταμετρηθούν.

Αντίθετα, η εφαρμογή O<sub>3</sub> υπήρξε αποτελεσματική στην περίπτωση των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας Enterobacteriaceae για χρόνο εφαρμογής 60 min. Συγκεκριμένα, η μείωση του πληθυσμού των μυκήτων κατά τουλάχιστον 1,8 λογάριθμους κρίθηκε επαρκής για την απολύμανση του δείγματος, γιατί οι 2 λογάριθμοι που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.10 για τον πληθυσμό των

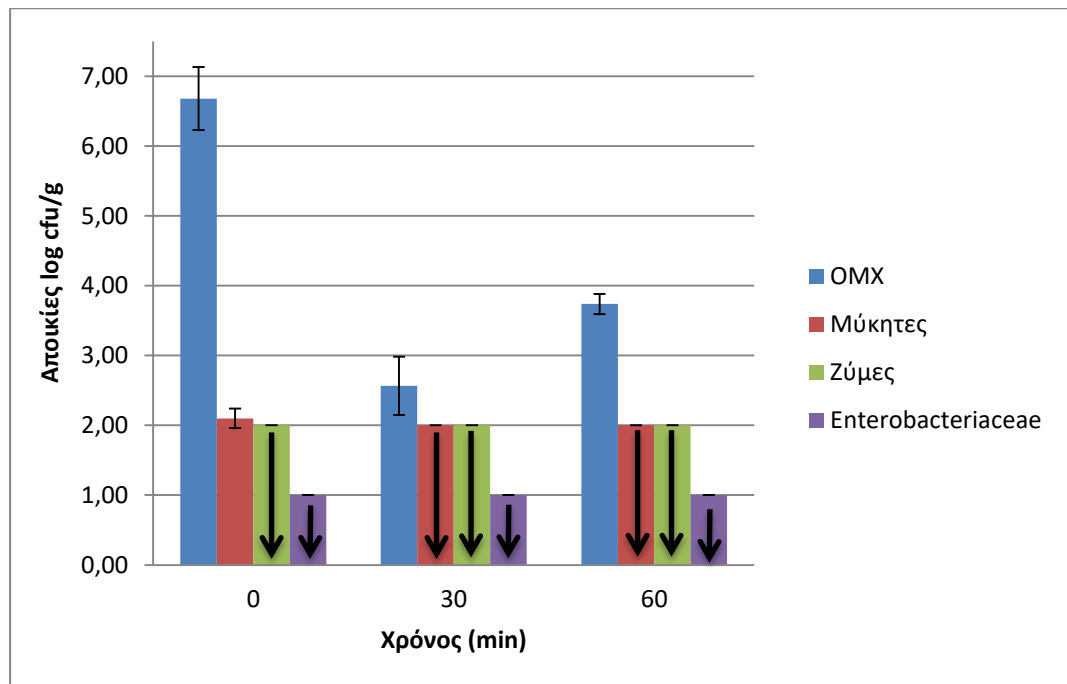
μυκήτων και των ζυμών, αντιστοιχούν στο μικρότερο επίπεδο ανίχνευσης. Ακόμη, η εφαρμογή O<sub>3</sub> για 60 min οδήγησε σε επαρκή μείωση των ζυμών (> 2 λογάριθμους) ώστε να μπορεί να θεωρηθεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας για τη συγκεκριμένη μικροχλωρίδα. Τέλος, η επίδραση του O<sub>3</sub> για 60 min στον πληθυσμό της οικογένειας Enterobacteriaceae το καθιστά αντιμικροβιακό παράγοντα καθώς οδήγησε σε επαρκή μείωση του πληθυσμού τους (> 2 λογάριθμους).

#### ❖ Ρίγανη

Στην περίπτωση της ρίγανης σε ότι αφορά τον πληθυσμό της OMX, η μεταχείριση των 30 λεπτών οδήγησε σε μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 4,1 λογάριθμους. (Διάγραμμα 3.11) Το αυξημένο μικροβιακό φορτίο στη μεταχείριση των 60 min πιθανά οφείλεται στο αυξημένο αρχικό μικροβιακό φορτίο του συγκεκριμένου δείγματος. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην έρευνα του (Torlak *et al.*, 2013) για την περίπτωση του πληθυσμού της *Salmonella*.

Το αρχικό φορτίο των μυκήτων στη ρίγανη υπήρξε ιδιαίτερα χαμηλό και επομένως το αποτέλεσμα του οζονισμού για διάστημα 30 και 60 min δεν μπορεί να αξιολογηθεί γιατί ήταν κάτω από τα ελάχιστα επίπεδα ανίχνευσης.

Τα δείγματα της ρίγανης που δεν υπέστησαν μεταχείριση, δεν παρουσίασαν ανάπτυξη πληθυσμών ζυμών και βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae πάνω από τα ελάχιστα επίπεδα ανίχνευσης, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη δράση των συστατικών του αιθέριου ελαίου της κατά των ζυμών (Beuchat, 1996) και των βακτηρίων (De Oliveira *et al.*, 2015).



Διάγραμμα 3. 11: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη ρίγανης πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O<sub>3</sub>, για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Με βάση τα παραπάνω, δηλαδή, το μικρό αρχικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων, τη πιθανότητα αυτό να οφείλεται στη δράση των αιθέριων ελαίων του φυτού και τον περεταίρω περιορισμό με οζονισμό για 30 min, καθιστούν τον οζονισμό της ρίγανης επαρκή μέθοδο απολύμανσης.

#### ❖ Τσάι του βουνού

Στο Διάγραμμα 3.12 φαίνεται η επίδραση της εφαρμογής όζοντος στη δρόγη τσαγιού. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκαν μεγάλες τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των μετρήσεων για όλες τις μεταχειρίσεις, πράγμα που δηλώνει εμμέσως και την ανομοιομορφία του υλικού που λήφθηκε ως δείγμα.

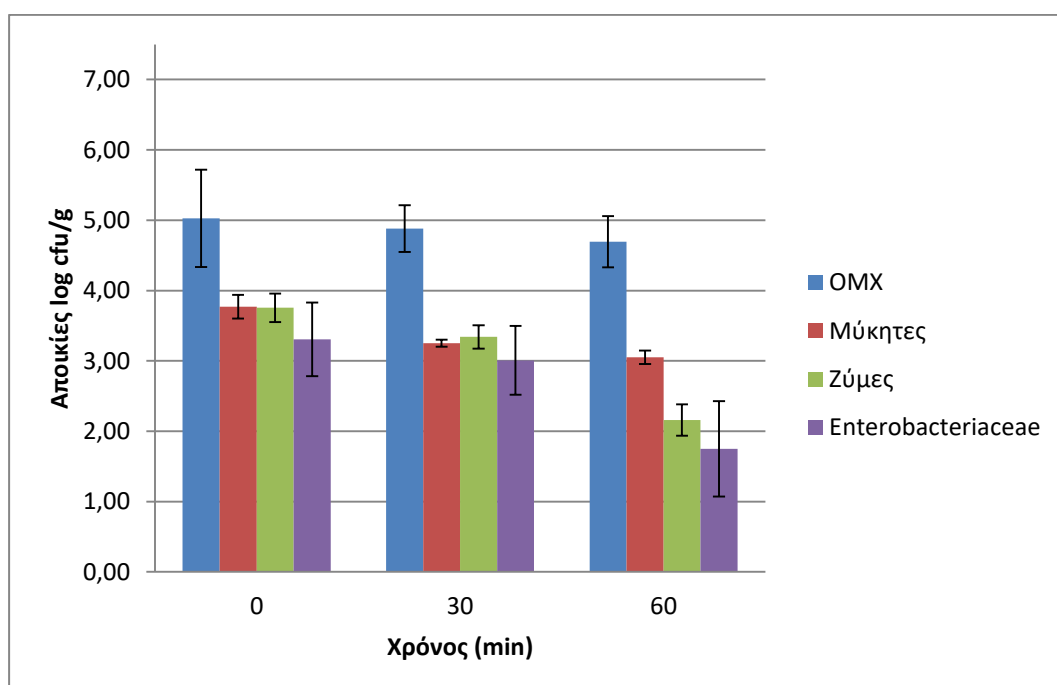
Ο πληθυσμός της OMX δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του αρχικού φορτίου και του φορτίου των δύο μεταχειρίσεων. Επομένως φαίνεται πως το O<sub>3</sub> δεν είχε κάποια επίδραση στον πληθυσμό της OMX.

Σχετικά με τον πληθυσμό των μυκήτων υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο αρχικό φορτίο και στο φορτίο που αναπτύχθηκε κατόπιν των μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή O<sub>3</sub> για 30 min η μείωση

του πληθυσμού των μυκήτων ήταν 0,5 λογάριθμοι και αντίστοιχα μετά την εφαρμογή του O<sub>3</sub> για 60 min η μείωση του πληθυσμού ήταν 0,7 λογάριθμοι.

Στον πληθυσμό των ζυμών, το O<sub>3</sub> φάνηκε να έχει μεγαλύτερη επίδραση γιατί μετά από την εφαρμογή του για 60 min ο πληθυσμός των ζυμών διέφερε στατιστικώς σημαντικά καθώς μειώθηκε κατά 1,6 λογάριθμους. Αντίθετα, μετά από οξονισμό για 30 min δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά από το αρχικό φορτίο με τη μείωση να είναι μόλις 0,4 λογάριθμους.

Ο οξονισμός για 30 min, μείωσε τον πληθυσμό των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae μόλις 0,3 λογάριθμους, μη διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από τον αρχικό πληθυσμό. Η εφαρμογή όζοντος για 60 min όμως, μείωσε τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό κατά 1,6 λογάριθμους. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 3. 12: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteriaceae σε δρόγη τσαγιού πριν και μετά τον οξονισμό του δείγματος με 4 ppm O<sub>3</sub>, για 30 και 60 min. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, γίνεται αντιληπτό ότι η εφαρμογή του όζοντος έχει μικρή μόνο επίδραση στο φορτίο της OMX και των μυκήτων του τσαγιού. Αντίθετα, στην περίπτωση των ζυμών και των εντεροβακτηρίων, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση, χωρίς όμως να ικανοποιείται η συνθήκη (μείωση > 2 log) ώστε να θεωρηθεί το O<sub>3</sub> επαρκής απολυμαντικός παράγοντας για το τσάι.

Η μικρή επίδραση του όζοντος στο μικροβιακό φορτίο του τσαγιού, μπορεί να αποδοθεί:

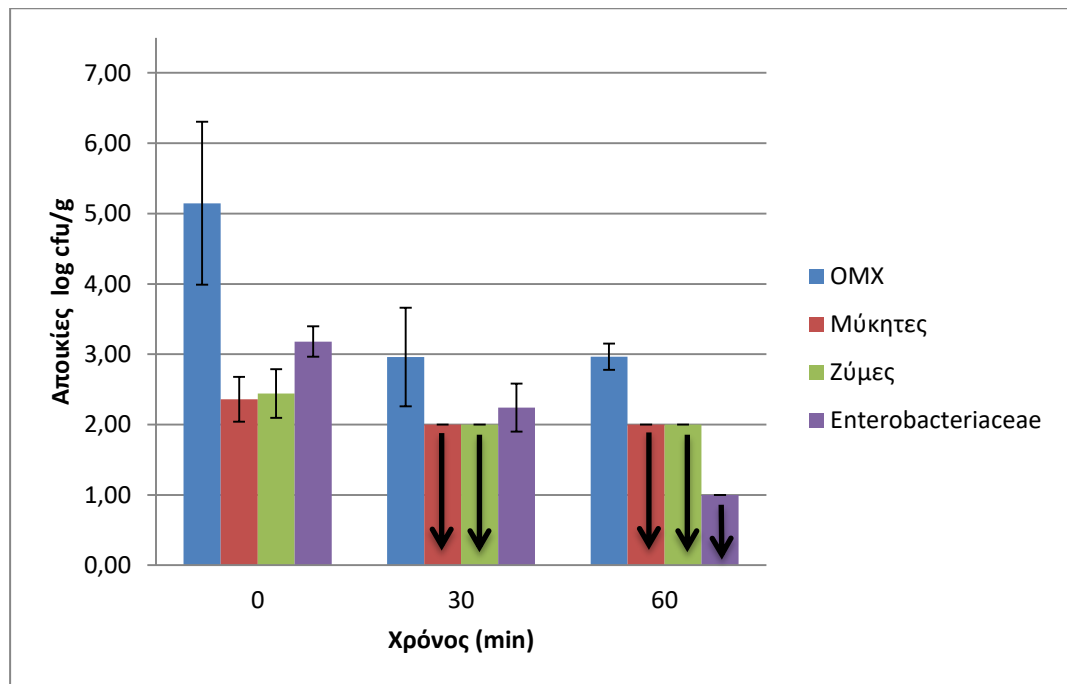
- ♦ στη μορφή του φυτικού υλικού γιατί οι τραχιές επιφάνειες του μίσχου και των φύλλων του τσαγιού, οι εγκολλώσεις της ταξιανθίας και οι τρίχες των φύλλων πιθανά αποτέλεσαν θέσεις στις οποίες το O<sub>3</sub> δεν ήταν εύκολο να διεισδύσει.
- ♦ στην ανθεκτικότητα των στελεχών των μικροοργανισμών που περιείχε
- ♦ στην πιθανή παρουσία μεγάλου ποσοστού σπορίων βακτηρίων και μυκήτων.

#### ❖ Χαμομήλι

Στο Διάγραμμα 3.13 παρατηρείται ότι, ο οζονισμός για 30 min της δρόγης χαμομηλιού οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού της OMX κατά 2,2 λογάριθμους διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από τον αρχικό πληθυσμό. Οζονισμός για 60 min όμως, δεν επέφερε περεταίρω μείωση του πληθυσμού της OMX και δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τη μεταχείριση των 30 min.

Το αρχικά χαμηλό φορτίο των μυκήτων και των ζυμών μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, συγκεκριμένα τουλάχιστον 0,4 λογάριθμους αντίστοιχα, με εφαρμογή O<sub>3</sub> για 30 min. Ίδια επίδραση παρουσίασε και η εφαρμογή O<sub>3</sub> για 60 min.

Ο αρχικός πληθυσμός των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae μειώθηκε κατά 0,9 λογάριθμους με οζονισμό για 30 min, διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά με τον μάρτυρα. Αντίστοιχη εφαρμογή O<sub>3</sub> για 60 min μείωσε το μικροβιακό φορτίο τουλάχιστον κατά 2,2 λογάριθμους, καθώς αυτό μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης, διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά και από τη μεταχείριση των 30 min.



Διάγραμμα 3. 13: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteraceae σε δρόγη χαμομηλιού πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O<sub>3</sub>, για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Η μείωση των πληθυσμών των ζυμών, των μυκήτων και των εντεροβακτηρίων κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης, καθώς και η μείωση του πληθυσμού της OMX πάνω από 2 λογάριθμους, κατέστησαν την εφαρμογή όζοντος στο χαμομήλι ως επαρκές απολυμαντικό μέσο (παρότι οι ανθοκεφαλές της δρόγης δεν αποτελούν ομοιογενή επιφάνεια). Σε αυτό φαίνεται να συνηγόρησε το χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο του χαμομηλιού πιθανά λόγω της δράσης του αιθέριου ελαίου του.

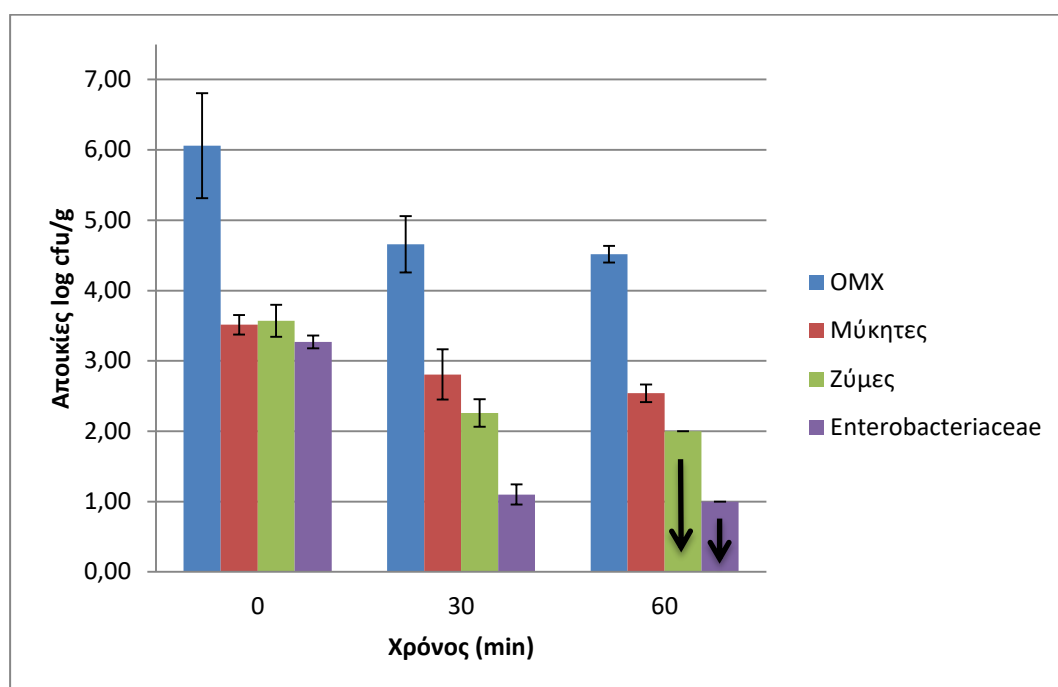
#### ❖ Θυμαρί

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.14, ο πληθυσμός της OMX του θυμαριού μειώθηκε κατά 1,4 λογάριθμους μετά από οζονισμό για 30 min και 1,5 λογάριθμους μετά από οζονισμό για 60 min. Στην περίπτωση αυτή οι δύο μεταχειρίσεις διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από το αρχικό φορτίο αλλά όχι μεταξύ τους.

Η εφαρμογή O<sub>3</sub> για 30 min μείωσε τον πληθυσμό των μυκήτων κατά 0,7 λογάριθμους ενώ η μεταχείριση των 60 min κατά 1 λογάριθμο. Και σε αυτή τη περίπτωση οι δύο μεταχειρίσεις διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από το αρχικό φορτίο αλλά όχι μεταξύ τους.

Αναφορικά με τον πληθυσμό των ζυμών, η εφαρμογή όζοντος για 30 min προκάλεσε μείωση κατά 1,3 λογάριθμους διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από τον αρχικό πληθυσμό. Ο οζονισμός για 60 min όμως, μείωσε το μικροβιακό φορτίο κάτω του επιπέδου ανίχνευσης.

Αντίστοιχα, το φορτίο των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης με εφαρμογή O<sub>3</sub> για 60 min. Ο οζονισμός για 30 min επέφερε στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον αρχικό πληθυσμό εντεροβακτηρίων με μείωση κατά 2,2 λογάριθμους.



Διάγραμμα 3. 14: Μέσος όρος του πληθυσμού (log cfu/g) της OMX, των μυκήτων, των ζυμών και της οικογένειας των Enterobacteriaceae σε δρόγη θυμαριού πριν και μετά τον οζονισμό του δείγματος με 4 ppm O<sub>3</sub>, για 30 και 60 min. Τα βέλη δηλώνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μικρότερος των ελάχιστων ποσοστών ανίχνευσης 2 και 1 log cfu/g. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η εφαρμογή όζοντος ήταν επαρκής μόνο για την περίπτωση των ζυμών και των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae καθώς μειώθηκαν κάτω των επιπέδων ανίχνευσης. Στην περίπτωση του πληθυσμού της OMX και των μυκήτων, η μείωση δεν ήταν μεγαλύτερη από 2 λογάριθμους και επομένως η εφαρμογή του O<sub>3</sub> δεν ήταν επαρκής σε καμία από τις δύο μεταχειρίσεις.

Φαίνεται ότι στην περίπτωση του θυμαριού απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση η οποία θα αφορά την ανθεκτικότητα των στελεχών του μικροβιακού

φορτίου του, τα ποσοστά παρουσίας σπορίων βακτηρίων και μυκήτων, καθώς και των συνθηκών οζονισμού.

Από τον Πίνακα 3.1 και τα Διαγράμματα 3.10 έως 3.15 προκύπτει ότι:

- Το αρχικό φορτίο των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δείγματα του τσαγιού, του χαμομηλιού και του θυμαριού και τη σύγκριση των πληθυσμών των εντεροβακτηρίων στα τρία προαναφερθέντα είδη, μετά τον οζονισμό των δειγμάτων προκύπτει ότι η μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού εμφανίστηκε στο χαμομήλι και στο θυμάρι (2,2 λογάριθμους) και μικρότερη στο τσάι (1,6 λογάριθμους).
- Σε σχέση με το αρχικό φορτίο της OMX καμία από τις δρόγες δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά. (Πίνακας 3.1) Μετά τον οζονισμό, η μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού εμφανίστηκε στη ρίγανη (3 λογάριθμους) ακολούθησε το χαμομήλι (2,2 λογάριθμους) και τέλος το θυμάρι (1,5 λογάριθμο). Στη λουίζα και στο τσάι δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση πληθυσμού καθώς δεν υπερέβη τους 1,3 και 0,7 λογάριθμους αντίστοιχα.
- Το αρχικό φορτίο των μυκήτων, στη λουίζα, στο τσάι και στο θυμάρι δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά. Μετά τον οζονισμό, η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού παρατηρήθηκε στη λουίζα (1,8 λογάριθμο), ακολούθησε το θυμάρι (1 λογάριθμο) και τέλος το τσάι με (0,7 λογάριθμο). Επίσης το αρχικό φορτίο των μυκήτων δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά στη ρίγανη με στο χαμομήλι όπου κατόπιν οζονισμού το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε κάτω των επιπέδων ανίχνευσης. Το αρχικό φορτίο ζυμών δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά για τα δείγματα τσαγιού και θυμαριού στα οποία η μείωση μετά από οζονισμό για 60 min ήταν ίδια, συγκεκριμένα 1,6 λογάριθμοι.
- Η λουίζα δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το τσάι όσον αφορά τα αρχικά φορτία της OMX και των μυκήτων. Επιπλέον, στις δύο δρόγες ταυτοποιήθηκαν τα ίδια γένη μυκήτων σε διαφορετικές αναλογίες. Παρόλα αυτά οι δύο δρόγες δεν παρουσίασαν τα ίδια αποτελέσματα ως προς τον οζονισμό τους.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν παραπάνω ανάμεσα στα διαφορετικά είδη δρόγης για το ίδιο είδος μικροβιακού πληθυσμού μπορεί να οφείλονται

- ♦ στην αυξημένη οξειδωτική δράση του  $O_3$  κατά συγκεκριμένων μικροοργανισμών όταν υπάρχει απουσία πληθυσμού άλλων



- ♦ στην μορφολογία και το πορώδες του φυτικού υλικού
- ♦ στον μεγαλύτερο αριθμό σπορίων των μικροοργανισμών
- ♦ στην ανθεκτικότητα των διαφορετικών στελεχών

Με βάση τα ανωτέρω κρίνεται σκόπιμη η συνέχιση της έρευνας ως προς την επίδραση του όζοντος στο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με την ομοιογένεια και τον όγκο του φυτικού υλικού, την ανθεκτικότητα της μικροχλωρίδας του και τις συνθήκες οζονισμού.

### 3.3.2. Επιλογή δειγμάτων για απόσταξη και περαιτέρω μικροβιακή ανάλυση

Για το κάθε είδος δρόγης, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα του οζονισμού των δειγμάτων για 30 min ( $T_{30}$ ), για 60 min ( $T_{60}$ ), καθώς και του αρχικού δείγματος ( $T_0$ ), που αφορούσαν το μικροβιακό φορτίο τους ώστε να διευκρινιστεί αν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής φαίνονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3. 4: : Συγκεντρωτικός πίνακας των στατιστικώς σημαντικών διαφορών που αφορούν το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων στις διάφορες μεταχειρίσεις

	Μεταχειρίσεις	OMX	μύκητες	ζύμες	Enterobacteriaceae	< 2 log
Λουίζα	$T_0 - T_{30}$	*	*	*	*	#
	$T_0 - T_{60}$	*	*	*	*	-
	$T_{30} - T_{60}$	-	*	*	*	-
Ρίγανη	$T_0 - T_{30}$	*	-	-	-	-
	$T_0 - T_{60}$	*	-	-	-	-
	$T_{30} - T_{60}$	*	-	-	-	-
Τσάι	$T_0 - T_{30}$	-	*	-	-	#
	$T_0 - T_{60}$	-	*	*	*	#
	$T_{30} - T_{60}$	-	*	*	-	-
Χαμομήλι	$T_0 - T_{30}$	*	-	-	*	#
	$T_0 - T_{60}$	*	-	-	*	-
	$T_{30} - T_{60}$	-	-	-	*	-
Θυμάρι	$T_0 - T_{30}$	*	*	*	*	#
	$T_0 - T_{60}$	*	*	*	*	#
	$T_{30} - T_{60}$	-	-	-	-	-

Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων και η δίεση (#) υποδηλώνει μείωση <2 log σε τουλάχιστον μία από τις παραμέτρους

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, και με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν στο υποκεφάλαιο 2.4, οι μεταχειρίσεις T60 για όλες τις δρόγες εκτός από τη ρίγανη, επιλέχθηκαν τελικά για :

- απόσταξη προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση του οζονισμού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του δείγματος
- μικροβιολογική ανάλυση ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση στο μικροβιακό φορτίο τους. Από τα δείγματα αυτά έγινε απομόνωση και ταυτοποίηση των αποικιών των μυκήτων που επιβίωσαν του οζονισμού.

### 3.3.3. Ταυτοποίηση μυκήτων

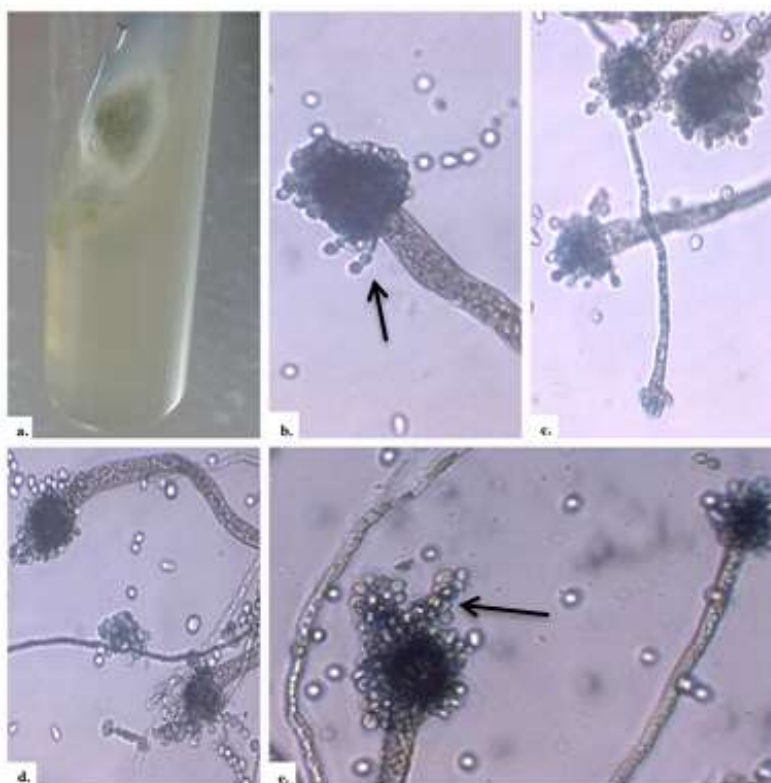
Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε βάση των χαρακτηριστικών ταυτοποίησης που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 3.1.2.

Όπως προαναφέρθηκε, ανάπτυξη μυκήτων παρουσιάστηκε στα δείγματα της λουίζας, του τσαγιού και του θυμαριού.

Από τις απομονώσεις τις λουίζας δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση λόγω μη ανάπτυξης των αποικιών μετά την απομόνωσή τους.

- *Aspergillus* spp.

Οι αποικίες είναι ταχέως αναπτυσσόμενες σε αποχρώσεις του πράσινου, οι κονιδιοφόροι κατέληγαν σε σφαιροειδή διογκωμένη βάση που φέρει μονοκύτταρα σφαιροειδή κονίδια. (Εικόνα 3.8)



Εικόνα 3. 8: *Aspergillus* spp. (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-e 4 d, 25°C μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν κεφαλές με κονίδια σε αλυσίδες (μαύρα βέλη)

- *Aspergillus section nigri*

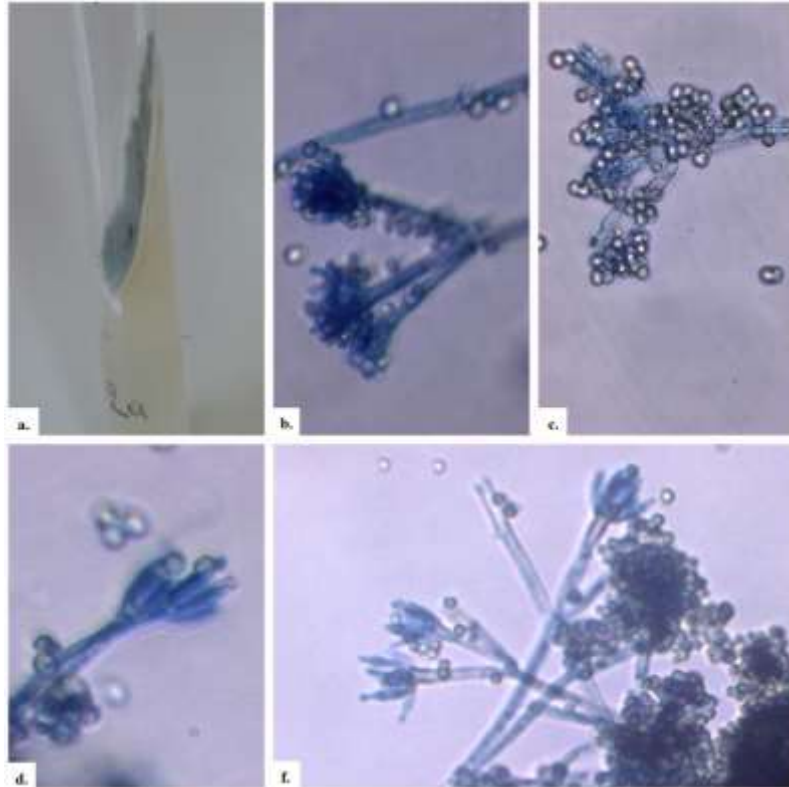
Οι αποικίες είναι ταχέως αναπτυσσόμενες, καλύπτονται από ένα πυκνό στρώμα μαύρων κονιδιακών κεφαλών. Οι κονιδιοφόροι είναι υαλώδεις με λείο τοίχωμα. Οι κεφαλές φέρουν μονοκύτταρα σφαιροειδή τραχιά κονίδια. (Εικόνα 3.9)



Εικόνα 3. 9: *Aspergillus section nigri* (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-f 4 d, 25°C (b) κονίδια c-d μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν κεφαλές με κονίδια (f) κατακερματισμένο τμήμα κεφαλής, σύμπλοκο φιαλιδίων που φέρουν κονίδια

- *Penicillium spp.*

Οι αποικίες είναι ταχέως αναπτυσσόμενες με εξανθήσεις πράσινου χρώματος. Μικροσκοπικά παρατηρούνται χαρακτηριστικές διακλαδώσεις υαλώδων κονιδιοφόρων, παρόμοιες με πινέλο. Τα κονίδια είναι σφαιρικά, υαλώδη και λεία. (Εικόνα 3.10)



Εικόνα 3. 10: *Penicillium* spp. (a) αποικία σε PDA, 4 d, 25°C b-f 4 d, 25°C μεγέθυνση x400 κονιδιοφόροι που φέρουν διακλαδώσεις τύπου πινέλου και κονίδια

Δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του O<sub>3</sub> στα χαρακτηριστικά των μυκήτων που αναπτύχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.6 από τις 23 αποικίες που απομονώθηκαν συνολικά οι 4 αποτέλεσαν ζύμες, οι 7 δεν αναπτύχθηκαν και οι 12 αποτέλεσαν μύκητες.

Πίνακας 3. 5: Αποτελέσματα ταυτοποίησης τελικού μικροβιακού φορτίου

Α/Α	Α/Α ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
1	1	Λουίζα 1 -1	1	δεν αναπτύχθηκε
2	1	Θυμάρι 1 -1	2	<i>Aspergillus section nigri</i>
3	2		3	x
4	3		4	ζύμη
5	1	Θυμάρι 2 -1	5	<i>Penicillium</i> sp.
6	2		6	x
7	3		7	<i>Penicillium</i> sp.
8	4		8	<i>Aspergillus section nigri</i>
9	5		9	x
10	6		10	<i>Penicillium</i> sp.
11	1	Τσάι 1 -1	11	ζύμη
12	2		12	ζύμη
13	3		13	ζύμη
14	4		14	δεν αναπτύχθηκε
15	5		15	δεν αναπτύχθηκε
16	6	Τσάι 2 -1	16	δεν αναπτύχθηκε
17	7		17	δεν αναπτύχθηκε
18	8		18	<i>Aspergillus</i> sp.
19	1	Τσάι 1 -1	19	<i>Aspergillus</i> sp.
20	2	Τσάι 2 -1	20	<i>Aspergillus</i> sp.
21	3		21	δεν αναπτύχθηκε
22	4		22	<i>Aspergillus</i> sp.
23	5		23	δεν αναπτύχθηκε

Επομένως, οι μύκητες που ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των απομονώσεων τσαγιού και θυμαριού αφορούσαν τα γένη *Aspergillus* spp. (50.0 %), *Penicillium* spp. (25.0 %) ενώ άγνωστο παρέμεινε το 25.0 % των απομονώσεων.

Το τσάι παρουσίασε ανάπτυξη *Aspergillus* sp. σε ποσοστό 100.0%. Στο θυμάρι ταυτοποιήθηκε το γένος *Aspergillus section nigri* σε ποσοστό 25%, το γένος *Penicillium* spp. σε ποσοστό 37,5% ενώ 37,5% των απομονώσεων παρέμειναν άγνωστες.

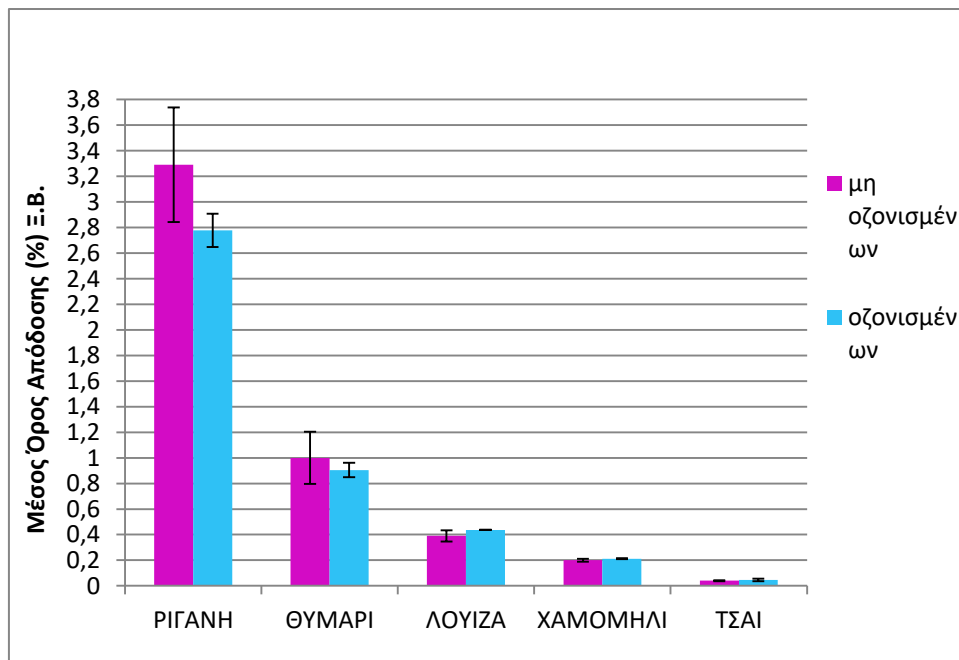
Το γεγονός ότι το σύνολο των αποικιών του δείγματος τσαγιού αποτέλεσε το γένος *Aspergillus* spp. ενδεχομένως υποδηλώνει πιθανή ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων στελεχών.

Το αρχικό φορτίο μυκήτων του τσαγιού αποτελούνταν από *Aspergillus* spp.(8,3%), *Penicillium* spp. (25.0%), *Cladosporium* spp. (33,3%) και *Alternaria* spp. (8,3%). Κατόπιν οξονισμού αναπτύχθηκαν μόνο ορισμένες αποικίες *Aspergillus* spp. Τα γένη *Penicillium* spp. και *Cladosporium* spp. που βρίσκονταν σε μεγαλύτερα ποσοστά καθώς και το γένος *Alternaria* spp. δεν ανιχνεύτηκαν. Επομένως τα στελέχη του *Aspergillus* spp. πιθανά να εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην επίδραση του όζοντος.

Το αρχικό φορτίο μυκήτων του θυμαριού αποτελούνταν από *Aspergillus* section *nigri* (25,0%), *Penicillium* spp. (56,3%), *Fusarium* spp. (6,3%) και *Ulocladium* spp. (12.5%). Κατόπιν οξονισμού, από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν το μεγαλύτερο ποσοστό άνηκε στο γένος *Penicillium* spp. (37,5%) και το μικρότερο στο γένος *Aspergillus* section *nigri* (25%). Παρατηρήθηκε επομένως η διατήρηση της αναλογίας στα δυο γένη παρόλη τη σαφή μείωση του πληθυσμού τους.

### 3.3.4. Παραλαβή αιθέριων ελαίων

Στο Διάγραμμα 3.15 φαίνονται οι μέσοι όροι του αιθέριου ελαίου των δρογών που παραλήφθηκε με απόσταξη μετά τον οζονισμό των δειγμάτων.



Διάγραμμα 3. 15: Μέσοι όροι ποσότητας αιθέριων ελαίων που παραλήφθηκαν μετά τον οζονισμό των δρογών (n=3) Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD) των μέσων όρων (n=3)

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η απόδοση των αιθέριων ελαίων ποσοτικά δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά πριν και μετά την εφαρμογή όζοντος σε καμία από τις δρόγες που μελετήθηκαν.

Επομένως, η εφαρμογή όζοντος συγκέντρωσης 4 ppm για 60 min δεν παρουσιάζει ποσοτική υποβάθμιση του αιθέριου ελαίου για τις περιπτώσεις της λουίζας, του θυμαριού, του χαμομηλιού και του τσαγιού. Αντίστοιχα, και για την περίπτωση της ρίγανης δεν παρουσιάστηκε ποσοτική υποβάθμιση του αιθέριου ελαίου με εφαρμογή 4 ppm όζοντος για 30.



### 3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αρχική μικροβιολογική ανάλυση και των πέντε δρογών υπέδειξε υψηλά ποσοστά μικροβιακής επιμόλυνσης κυρίως στις περιπτώσεις της λουίζας, του τσαγιού και του θυμαριού. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές για ύπαρξη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες και στα πέντε είδη φυτικού υλικού άλλοτε σε μεγαλύτερα ποσοστά και άλλοτε σε μικρότερα.

Η εφαρμογή όζοντος παρουσίασε θετικά αποτελέσματα ως προς τη μείωση του μικροβιακού φορτίου στο σύνολό του καθώς και στην μείωση του πληθυσμού των μυκήτων που θεωρήθηκαν ύποπτοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Ωστόσο, δεν παρουσιάστηκε η ίδια επίδραση στο μικροβιακό φορτίο της κάθε δρόγης.

Αναφορικά με το φορτίο των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, προέκυψε ότι τη μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού εμφάνισε το χαμομήλι και το θυμάρι (2,2 λογάριθμους) και τέλος το τσάι (1,6 λογάριθμους).

Σε σχέση με το φορτίο της OMX, τη μεγαλύτερη μείωση εμφάνισε η ρίγανη (3 λογάριθμους) ακολούθησε το χαμομήλι (2,2 λογάριθμους) και τέλος το θυμάρι (1,5 λογάριθμο). Η λουίζα και το τσάι δεν εμφάνισαν μείωση μεγαλύτερη από 1,5 (1,3 και 0,7 αντίστοιχα). Το αυξημένο φορτίο της OMX και κατόπιν οξονισμού πιθανά να οφείλεται σε αυξημένο πληθυσμό σπορίων.

Όσον αφορά το σύνολο του φορτίου ζυμών μυκήτων, η μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού παρατηρήθηκε στη λουίζα (1,6 λογάριθμο), ακολούθησε το θυμάρι (1 λογάριθμο) και τέλος το τσάι με (0,7 λογάριθμο). Ακόμη, στην περίπτωση της ρίγανης και του χαμομηλιού το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης.

Παρόλα τα κοινά χαρακτηριστικά του αρχικού μικροβιακού φορτίου της λουίζας και του τσαγιού, δεν παρουσίασαν τα ίδια αποτελέσματα ως προς τον οξονισμό τους. Ενδεχομένως τα στελέχη μυκήτων του τσαγιού να υπήρξαν πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα στελέχη μυκήτων της λουίζας. Επιπλέον, το γεγονός αυτό να μπορεί να αποδοθεί στην ανομοιογένεια, τη δομή και το πορώδες του φυτικού υλικού. Οι τραχιές επιφάνειες του μίσχου και των φύλλων του τσαγιού καθώς και οι εγκολπώσεις της ταξιανθίας πιθανά αποτέλεσαν εστίες μικροβίων στις οποίες δεν ήταν δυνατό να διεισδύσει το O<sub>3</sub>.

Όσον αφορά την επίδραση του οξονισμού στην περιεκτικότητα των αιθέριων ελαίων των δρογών, η εφαρμογή όζοντος φάνηκε να μην επιδρά αρνητικά.

Με βάση τα ανωτέρω φαίνεται ότι το όζον μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική μέθοδο απολύμανσης για τη ρίγανη, το χαμομήλι και τη λουίζα. Στις περιπτώσεις όμως του θυμαριού και του τσαγιού θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα που θα λαμβάνουν υπ' όψιν επιπλέον παραμέτρους για τα συγκεκριμένα φυτικά υλικά.

Η χρήση του όζοντος, πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες μεθόδους απολύμανσης καθώς δεν αφήνει βλαβερά υπολείμματα ενώ με την τήρηση των κατάλληλων προδιαγραφών θεωρείται ασφαλές. Η απολύμανση με όζον επιτρέπει να δημιουργηθούν προϊόντα που καλύπτουν όλα τα κριτήρια ενός καινοτόμου προϊόντος με λειτουργικές ιδιότητες που διαφέρει από τα ανταγωνιστικά προϊόντα της σημερινής αγοράς.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αγγελής, Γ. Δ. (2007). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας*. [Πανεπιστημιακές σημειώσεις] Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Πατρών. (pdf)
- Ανδρίτσος, Ν. Δ. (2012). *Βιοποικιλότητα & ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* σε νωπό κρέας και τα προϊόντα του*. Διδακτορική Διατριβή. Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών. Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Βαρναβάς, Κ., (2013) *Α) Ανάλυση αιθέριων ελαίων Β) Φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Calendula officinalis* και έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής του ενζύμου LOX (φυτικής προέλευσης)*. Μεταπτυχιακή Διατριβή Τομέας φαρμακογνωσίας - Φαρμακολογίας. Τμήμα φαρμακευτικής. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Βλάσση, Ε. (2012) *Μελέτη της απολυμαντικής δράσης του όζοντος σε αρωματικά φυτά: Η περίπτωση της ρίγανης*. ΜΔΕ Εργαστήριο βιοχημικής μηχανικής και τεχνολογίας περιβάλλοντος. Τμήμα χημικών μηχανικών. Πολυτεχνική Σχολή. Πανεπιστήμιο Πατρών
- Γαρδέλη, Χ. (2009). *Μελέτη της Χημικής Σύστασης Αιθέριων Ελαίων Ορισμένων Αρωματικών Φυτών της Ελληνικής Χλωρίδας*. Διδακτορική Διατριβή. Εργαστήριο Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων. Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Δόρδας, Χ., (2009) *Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών*. [Πανεπιστημιακές Σημειώσεις] Εργαστήριο Γεωργίας. Τομέας φυτών μεγάλης καλλιέργειας και οικολογίας. Γεωπονική σχολή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- Καραγκούνη - Κυρίτσου, Α. Δ. (1999) *Μικροβιολογία*. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα
- Κατσιώτης, Σ.,Θ., & Χατζοπούλου, Π.,Σ., (2010) *Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια*. Αφοι Κυριακίδη: Αθήνα
- Λάζος, Ε., Σ., (2010) *Επεξεργασία Τροφίμων*. Τόμος 1. Interbooks: Αθήνα
- Μαρκάκη, Π. & Μαστρονικολή, Σ. (2008). *Σημειώσεις για το εργαστήριο μικροβιολογίας τροφίμων*. [Πανεπιστημιακές σημειώσεις] Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων. Τμήμα Χημείας Τομέας ΙΙ. Πανεπιστήμιο Αθηνών. (pdf)

*Μικροβιολογία & Υγιεινή Τροφίμων (εργαστήριο)*. [Πανεπιστημιακές Σημειώσεις]. Τμήμα Διατροφής & Διαιτολογίας. ΤΕΙ Κρήτης (pdf)

Σαμαρά, Γ., Χ., (2003) *Βελτιστοποίηση της καλλιέργειας 'Τσάι του βουνού' (Sideritis raeseri) στο χωριό Βρύναινα του νομού Μαγνησίας*. [Μεταπτυχιακή Διατριβή] Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ταούκης, Π., Σ., *Μικροβιολογία Τροφίμων*. [Πανεπιστημιακές σημειώσεις] Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων.

Τζάμος, Κ. Ε. (2007). *Φυτοπαθολογία*. 2<sup>η</sup> εκδ. Αθήνα: Σταμούλης

Παναγόπουλος, Χ. Γ. (1995). *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Αθήνα: Σταμούλης

Χίνη, Θ., Τυμπής, Δ. & Πετράκης, Ε. (2006) *Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων*. [Πανεπιστημιακές Σημειώσεις] Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων. Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής. ΤΕΙ Αθήνας

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella', G. and Caban~ es, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2650–2652

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanara., T., Arsenakis, M., (1998) Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 46 (5):1739–1745

Adams, M., R., & O Moss, M., (2008) *Food microbiology*. 3<sup>rd</sup> Ed. The royal society of chemistry: UK

Anonymous (2014) *Microbiological guidelines for food. For ready to eat food in general and specific food items*. Centre for food safety: Hong Kong

Alexopoulos, C., J., & Mims, C., W., (1979) *Introductory mycology*. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons: Canada

- Ali, H., F., M., El Beltagi, H., S., Nasr, N., F., (2011) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10(11):2689--2699 [online] Available from: [https://www.researchgate.net/publication/225070004\\_Evaluation\\_of\\_antioxidant\\_and\\_antimicrobial\\_activity\\_of\\_Aloysia\\_triphylla](https://www.researchgate.net/publication/225070004_Evaluation_of_antioxidant_and_antimicrobial_activity_of_Aloysia_triphylla) [Accessed: 30 April 2016].
- ASTA (1994) *Spice microbiology hazard background review*. ASTA Technical bulletin No. 2, American Spice Trade Association, Inc., Englewood Cliffs, NJ
- ASTA (2015) HACCP Guide to Spices & Seasonings
- Barnet, H.L. & Hunter, B. B. (1987) *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. 4<sup>th</sup> ed. Macmillan Publishing company New York
- Beuchat L., (1996) Handbook of food spoilage yeasts CRC Press
- Bottalico, A. and Logrieco, A. 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In *Mycotoxins in Agriculture*, eds K.K. Sinha and D. Bhatnagar. New York: Marcel Dekker. pp. 65–108.
- Brodowska, A., Śmigielski, K. & Nowak, A. (2014). Comparison of methods of herbs and spices decontamination. *Chemik*. 68 (2): 97–102.
- Bungo, A., Almodovar, A., A., B., Pereira, T., C., Pinto, T., Sabino, Myrna (2006) Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology* vol.37 no.1
- Cappucino, J.G. & Sherman, N. (2005). *Microbiology. A Laboratory Manual*. 7<sup>th</sup> ed. Benjamin Cummings. San Francisco
- Code of hygienic practice for spices and dried aromatic herbs CAC/RCP 42 – 1995 Adopted 1995. Revision 2014.
- De Hoog, G.S. and Horre', R. 2002. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* 45: 249–276.
- De Oliveira, K.,A., De Sousa., J., P., Da Costa Medeiros, J., A., Et Al. (2015) Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole *Food Control* 47:334–339
- Doyle, M., P., & Beuchat L., R., eds. (2007) *Food Microbiology Fundamentals & Frontiers* 3<sup>rd</sup> Edition ASM Press: Washington DC

- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R. & Bartley, R. (2007). *Descriptions of medical fungi*. Mycology Unit, Women's and Children's Hospital, North Adelaide, USA. 2007.
- Farkas, J., (2000) Spices & herbs. In B.,M., Lund, T., C., Baird - Parker, G., W. Gould, eds. *The microbiological safety & quality of food* Vol. 1 33:897-913 Springer: USA
- Foegeding, P.M. (1985) Ozone inactivation of Bacillus and Clostridium spore populations and the importance of the spore coat to resistance, *Food Microbiology*, 2(2): 123–34 [online] Available from:  
[https://www.researchgate.net/publication/229096227\\_Ozone\\_inactivation\\_of\\_Bacillus\\_and\\_Clostridium\\_spores\\_and\\_the\\_importance\\_of\\_the\\_spore\\_coat\\_to\\_resistance](https://www.researchgate.net/publication/229096227_Ozone_inactivation_of_Bacillus_and_Clostridium_spores_and_the_importance_of_the_spore_coat_to_resistance) [Accessed: 18 March 2016].
- Garbowska, M., Berthold-Pluta, A. & Stasiak-Róžańska, L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of Cronobacter spp. *Food microbiology*. 49: 1–5. [Online]. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015000088>. [Accessed: 18 March 2016].
- Goidanich, C. (1966) *Εγχειρίδιον Φυτοπαθολογίας*. Καραμάνου & Μαρσέλου (μεταφ.) Τόμος Γ. Αθήνα: Εκδόσεις Γκιούρδας
- Greene, A.,K., Guzel-Seydim, Z., B., & Seydim, A., C., (2012) Chemical & Physical Properties of ozone. In C., O'Donnell, B.,K., Tiwari, P., J., Cullen , R., G., Rice, eds. *Ozone in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd. 4 pp 19-32
- Hudson, J.B. & Sharma, M. (2009). The Practical Application of Ozone Gas as an Anti-fungal (Anti-mold) Agent. *Ozone: Science & Engineering*. 31 (4). p.pp. 326–332.
- Icmsf (1986). Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. *Blackwell Scientific Publication*. [Online]. 2. p.pp. 127–278. Available from:  
[http://seafood.oregonstate.edu/.pdf Links/Sampling-for-Microbiological-Analysis-Principles-and-Specific-Applications-ICMSF.pdf](http://seafood.oregonstate.edu/.pdf%20Links/Sampling-for-Microbiological-Analysis-Principles-and-Specific-Applications-ICMSF.pdf). [Accessed: 19 March 2016]
- International Organisation of Spice Trade Associations (2013) *General Guidelines for Good Agricultural Practices on Spices and Culinary herbs*. Issue II
- Julseth, R., M., Deibel, R.,H. (1974) Microbial profile of selected spices and herbs at import. *Journal of Milk and Food Technology* 37,414-419

- Kazemi, M., (2014) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Matricaria chamomilla*. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, Vol 3 (2): 148-153
- Khadre, M. a, Yousef, a E. & Kim, J.G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*. [Online]. 66 (9):1242–1252. [online] Available from: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x/asset/j.1365-2621.2001.tb15196.x.pdf?v=1&t=hvvgp75o0&s=3ee639187185530fcb671322d89e3e4fad198b47>. [Accessed: 1 June 2016].
- Koutsaviti, A., Bazos, I., Milenkovic, M., Pavlovic-Drobac, M., Tzakou, O., (2013) Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of Five *Sideritis* taxa of *Empedoclia* and *Hesiodia* Sect. from Greece. *Records of natural products* 7:1 (2013) 6-14
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G, Moretti, A. and Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109: 645–667.
- Majeus, P., Woller, R., Leevitat, P., and Klintrimas, T. (1985) Gewurze - Schimmelbefall und Gehalt and Aflatoxinen, Ochratoxin A und Sterigmatocystin. *Fleischwirtsch.* 65, 1155-1158
- Moore, G., Griffith, C., Peters, A., (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *Journal of Food Protection*. 63: 1100-1106
- Pasqual, A., Llorca, I., Canut, A., (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in food science and technology*. 18: S29-S35
- Paster, N., Menacherov, M., Ravid, U., Luven, B. (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of food protection*. 58: 81-85
- Patil, S., Cullen, P., J., & Bourke, P. (2014) Ozone a novel microbial inactivation Process. In I. S. Boziaris ed. *Novel Food Preservation & Microbial Assessment Techniques*. CRC Press
- Pitt, John I. & Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer.
- Pryor, B.M. and Bigelow, D.M. 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia* 95:

1141–1154.

Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*. 104: 1312–1321.

Restaino L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. and Palnikar, P. (1995) Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3471–5.

Rice, G., R., & Tapp, C., (2012) Generation & Control of Ozone. In C., O' Donell, B. K. Tiwari, P. J. Cullen, R., G., Rice ed. *Ozone in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd.

Rice, G., R., (2012) Health and safety aspects of ozone processing. In C., O' Donell, B. K. Tiwari, P. J. Cullen, R., G., Rice ed. *Ozone in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd.

Roby M Sarhan M Selim K Khalel K (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare L.*) and chamomile (*Matricaria chamomilla L.*) *Industrial Crops and Products* 44 pp: 437-445

Sagoo, S.K., Little, C.L., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K.A., Mclauchlin, J., Pinna, E. De & Threlfall, E.J. (2009). Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*. [Online]. 26 (1): 39–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.005>.

Schwab, A. B., Harpestad, A., D., Swartzentruber, A., Lanier J., M., Wentz, B., A., Duran, A., P., Barnard, R., J., & Read, R., B. (1982) Microbiological Quality of Some Spices and Herbs in Retail Markets. *Applied & environmental microbiology*. 44.3:627-630

Sharma, K., R., Saxena, B., *Morphology and life cycles of Aspergillus and Penicillium*. Hindu College. Department of Botany. University of Delhi

Sharma, M., & Hudson, J., B., (2008) Ozone is an effective and practical antibacterial agent. *Applied epidemiology in health care settings and the community*. *Ajic* 36:8:559-563

Schwab, A.,H., Harpestad, A., D.,Swartzentruber, A., et al. (1982) Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. *Applied and Enviromental Microbiology* 44:627-630

Silva, M., D., Batista, L., R., Rezende, E., F., Fungaro M.E., P., Sartori, D., Alves, E., (2011) Identification of fungi of the genus aspergillus section nigri using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:761-773



- Simmons, E.G. (2007) *Alternaria: an Identification Manual*. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., (1996) Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal of agricultural and food chemistry.*, 44 (5):1202–1205
- Suite, S.N.W. (2015). *HACCP Guide for Spices & Seasonings*. p.pp. 1–34.
- Tapp, C., & Rice, R.,G., (2012) Generation & Control of Ozone. In C., O'Donnell, B.,K., Tiwari, P., J., Cullen , R., G., Rice, eds. *Ozone in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd. 3 pp 33-54
- Tiwari, B.K., Rice, C.R.G., (2012). Regulatory and legislative issues. In: O'Donnell, C., Tiwari, B.K, Cullen,P.J., Rice, C.R.G. (Eds.) *Ozone in Food Processing*. John Wiley & Sons Ltd., Oxford
- Tolouee M Alinezhad S Saberi R Eslamifar A Zad S et. al. (2010) Effect of Matricaria chamomilla L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem *International Journal of Food Microbiology* 139 (3): 127-133
- Torlak, E., Sert, D. & Ulca, P. (2013). Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. *International Journal of Food Microbiology*. 165 (3):276–280.
- Tzakou, O., (2002) The essential oil of *Sideritis raeseri* Boiss et Heldr. Spp. Attica (Heldr.) Pap et Kok. *Journal of Essential Oil Research*. Volume 14 Issue 5
- Valdramidis, V., P., Cullen, P., J., & Tiwari, B., K., (2012) Modeling approaches for ozone processing. In C., O'Donnell, B.,K., Tiwari, P., J., Cullen , R., G., Rice, eds. *Ozone in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd. 14 pp 241-259
- Vali Asill, R., Azizi, M., Bahreini, H.A. (2013). The Investigation of Decontamination Effects of Ozone Gas on Microbial Load and Essential Oil of Several Medicinal Plants. *Notulae Scientia Biologicae* 5 (1):34–38.
- Vali Asill, R., Azizi, M., Bahreini, M. & Arouie, H. (2014). The Survey of Microbial Quality of the Dry Sample , Extract and Brewing of some Medicinal Plants. *Notulae Scientia Biologicae*. 6 (4):478–482.
- Victorin, K. (1992) Review of the genotoxicity of ozone, *Mutation Research*, 277: 221–38.

- Vitullo, M., Ripabelli, G., Fanelli, I., Tamburro, M., Delfine, S. & Sammarco, M.L. (2011). Microbiological and toxicological quality of dried herbs. *Letters in Applied Microbiology*. 52 (6):573–580.
- Vogel., H., Silva, M.,L., Razmilic, I., (1999) Seasonal fluctuation of essential oil content in Lemon Verbena *Acta Horticulturae* 500:75-80
- Wojcik-Stopczynska, B., Jakubowska, B., Reichelt, M., (2009) Microbiological contamination of dried culinary herbs. *Herba Polonica*. 55(3):206-213
- Zagon, J., Dehne, L. I., Wirz, J., Linke, B., Boegl, K.W., (1992) Ozone treatment for removal of microorganisms from spices as an alternative to ethylene oxide fumigation or irradiation: results of a practical study. *Bundesgesundheitsblatt*. 35: 20-23
- Zealand, N. (2001). *Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods*. p.pp. 1–7.
- Zhao, J., Cranston, P., M., (1995) Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents for the spice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68:11-18
- Żukiewicz-sobczak, W., Sobczak, P., Wróblewska, P., Adamczuk, P., Cholewa, G., Zawiślak, K., Mazur, J. & Panasiewicz, M. (2013). *Assessment of microbiological cleanness of selected medicinal herbs in relations to the level of resource fragmentation*. 20 (4):812–815.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Θρεπτικά υποστρώματα

Πίνακας Π. 1: Θρεπτικά υποστρώματα αρίθμησης μικροοργανισμών.

Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)	Συστατικά, συγκέντρωση (g/L), pH
MRD (Merck)	Peptone 1.0 Sodium chloride 8.5 pH 7.0 ± 0.2 at 25°C
TSA (Conda, CAT: 1138.00)	Casein Tryptic Digest 15.0 Soy Peptone 5.0 Sodium chloride 5.0 Bacteriological Agar 15.0 pH 7.2 ± 0.2 at 25°C
VRBGA (LabM, LAB088)	Yeast extract 3.0 Balanced Peptone No 1. 7.0 Sodium chloride 5.0 Bile Salts No.3 1.5 Glucose 10.0 Neutral red 0.03 Crystal violet 0.002 Agar No. 12. 12.0 pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C
KANAMYCIN AESCULIN AZIDE AGAR BASE (LabM, LAB106)	Tryptone 20.0 Yeast extract 5.0 Sodium chloride 5.0 Sodium citrate 1.0 Aesculin 1.0 Ferric ammonium citrate 0.5 Sodium azide 0.15 Kanamycin sulfate 0.02 Agar No. 1. 10.0 Final pH 7.0 ± 0.2 @ 25°C
DG18 (Conda, Cat. No. 1161)	Dextrose 10 Peptone 5 Monopotassium Phosphate 1

	<p>Magnesium Sulfate 0.5  Chloramphenicol 0.1  Dichloran 0.002  Bacteriological Agar 15  Final pH 5.6 ± 0.2 @ 25°C</p>
<p>MINERALS MODIFIED  GLUTAMATE MEDIUM  (LabM, LAB080A )</p>	<p>Lactose 20.0  Sodium formate 0.5  L-cystine 0.04  L(-)aspartic acid 0.048  L(+)-arginine 0.04  Thiamine 0.002  Nicotinic acid 0.002  Pantothenic acid 0.002  Magnesium sulphate 7H<sub>2</sub>O 0.200  Ferric ammonium citrate 0.020  Calcium chloride 2H<sub>2</sub>O 0.020  Dipotassium hydrogen phosphate 1.80  Bromocresol purple 0.020  pH 6.7 ± 0.1 @ 25°C</p>
<p>TBX  (LabM, HAL003 )</p>	<p>Tryptone 20.0  Bile Salts No. 3 1.5  Agar 15.0  X-glucuronide 0.075  pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C</p>

Πίνακας Π. 2: Θρεπτικό υπόστρωμα ταυτοποίησης ζυμομυκήτων.

Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)	Συστατικά, συγκέντρωση (g/L), pH
<p>PDA  (CONDA, Cat 102200)</p>	<p>Dextrose 20.00  Bacteriological Agar 15.00  Infusion from potatoes (200 g) 4.00  pH 5.6 ± 0.2 @ 25°C</p>

Λόγω μη επαρκούς στερεοποίησης του θρεπτικού υλικού παρασκευάστηκε PDA σύμφωνα με την ακόλουθη συνταγή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υλικά

1000 mL απιονισμένο νερό

200 g καθαρισμένη και κομμένη πατάτα σε κυβάκια

15 g άγαρ

15 g σουκρόζη ή δεξτρόζη

Τρόπος παρασκευής

Βρασμός πατάτας σε 800 mL νερό. Παραλαβή νερού σε ογκομετρική φιάλη και προσθήκη άγαρ που έχει διαλυθεί σε χλιαρό νερό, προσθήκη σουκρόζης και συμπλήρωση νερού έως 1000 mL. Απαιτείται συνεχής ανάδευση. Έτοιμο όταν διαυγάσει.