



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



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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνού στην αύξηση της  
*Yersinia enterocolitica*»**

**Βασιλική Α. Τόρτοκα**

**ΒΟΛΟΣ 2020**

«Επίδραση υγρών εναιωρημάτων καπνού στην αύξηση της *Yersinia enterocolitica*»

**Effect of liquid smoke suspensions on growth of *Yersinia enterocolitica***



**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Γεώργιος Μιχαήλ**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Φωτεινή Παρλαπάνη**, Συμβασιούχος Διδάσκοντας ΠΔ 407/80, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.



*Στην οικογένειά μου,  
Άνθιμο, Αγάπη, Όλγα & Σωτηρία,  
που δεν σταμάτησαν να με στηρίζουν και να με συμβουλεύουν*



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*«Τά ἀγαθὰ κόποις κτῶνται»*

*Αριστοτέλης, 384-322 π.Χ., Αρχαίος Έλληνας φιλόσοφος*

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

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου και Επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη ο οποίος ήταν διαθέσιμος και υποστηρικτικός κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μιχαήλ Γεώργιο μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, για τις συμβουλές και παρατηρήσεις του.

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

Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστώ στην υποψήφια διδάκτορα κα. Συροπούλου Φαίδρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της η οποία ήταν καταλυτική και πολύτιμη. Το αποτέλεσμα της εργασίας αυτής ανήκει στην κοινή προσπάθεια μέχρι τέλους.



Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κακάση Στέφανο του οποίου η βοήθεια στο πειραματικό κομμάτι υπήρξε άκρως σημαντική.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια καθ'όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου οι οποίοι με στήριζαν όταν εγώ έχανα την πίστη μου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε διερεύνηση της επίδρασης και αποτελεσματικότητας των υγρών εναιωρημάτων καπνών. Οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων – παραγωγή καπνιστών αλιευτικών προϊόντων έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* στελέχους CITY 844. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο της απορροφητικότητας ή οπτικής πυκνότητας (OD). Μελετήθηκαν έξι (6) συνολικά υγροί καπνοί, οι L9, G6, C3, D4, A1 και E5, για την αποτελεσματικότητά τους έναντι στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* στελέχους CITY 844. Το κάθε εναιώρημα υγρού καπνού μελετήθηκε σε τρεις (3) διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις για τους μικροβιακούς πληθυσμούς  $10^3$ ,  $10^5$  και  $10^7$  CFU. Το πείραμα εξελίχθηκε μέσω της πλήρωσης των microplates υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα δείγματα έπειτα από την παραμονή τους για σαράντα οκτώ (48) ώρες στο Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, έδειξαν ότι ο καπνός C3 σε συγκέντρωση 0,1% είχε επίδραση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού, στον μικροβιακό πληθυσμό  $10^3$ , δεδομένου ότι ο χρόνος προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυξήθηκε κατά έντεκα (11) ώρες. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, ο καπνός C3 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα πολλά υποσχόμενο «όπλο» έναντι του παθογόνου αυτού.

**Λέξεις – Κλειδιά:** κάπνιση, υγρή κάπνιση, *Yersinia enterocolitica*, οπτική πυκνότητα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
1.1 Γενικές έννοιες για την μεταποίηση και συντήρηση αλιευμάτων .....	1
1.2 Κάπνιση.....	1
1.2.1 Ψυχρή κάπνιση .....	2
1.2.2 Θερμή κάπνιση .....	2
1.2.3 Υγρή κάπνιση .....	2
1.3 Ασφάλεια και ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων. ....	3
1.4 Σύσταση καπνού.....	4
1.5 Καπνιστά είδη.....	5
1.6 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων.....	7
1.7 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων.....	8
1.8 Αρχή Μεθόδου Οπτικής Πυκνότητας .....	11
1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας .....	12
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	13
2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός .....	13
2.2 Απομόνωση μικροβιακών πληθυσμών.....	13
2.3 Χαρακτηρισμός συγκεντρώσεων.....	13
2.4 Πλήρωση των Microplates .....	15
2.5 Λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας με Microplate Reader .....	15
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	17



3.1	Αποτελέσματα πρώτου (1 <sup>ου</sup> ) Microplate .....	18
3.2	Αποτελέσματα δεύτερου (2 <sup>ου</sup> ) Microplate.....	23
3.3	Αποτελέσματα τρίτου (3 <sup>ου</sup> ) Microplate .....	28
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	<b>1</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές έννοιες για την μεταποίηση και συντήρηση αλιευμάτων

Μεταποίηση νοείται το σύνολο των διεργασιών κατά τις οποίες οι πρώτες ύλες (δηλ. τα αλιεύματα) μετατρέπονται σε προϊόντα (δηλ. τρόφιμα). Όλα τα αλιευτικά προϊόντα τα οποία διατίθενται στην αγορά έχουν υποστεί κάποιου είδους διεργασία με σκοπό να μετατραπούν από αλιεύματα σε προϊόντα. Σκοπός της μεταποίησης των αλιευμάτων είναι κατά κύριο λόγο η συντήρηση των προϊόντων και αυτός ο όρος περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της ποιοτικής υποβάθμισης και την εξασφάλιση της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων. Μερικές μέθοδοι συντήρησης τροφίμων και ειδικά αλιευμάτων είναι: η ψύξη, η κατάψυξη, η συσκευασία σε μείγματα αερίων (MAP), η θερμική επεξεργασία, η αλάτιση, το μαρινάρισμα, η κάπνιση (Μποζιάρης Ι. 2013, Μποζιάρης Ι. 2012). Η κάθε μέθοδος συντήρησης ακολουθείται από πρωτόκολλα και διαδικασίες με κοινό σκοπό την εξόντωση παθογόνων μικροοργανισμών και την διασφάλιση της ποιότητας του τροφίμου. Στην παρούσα εργασία η κύρια μέθοδος η οποία μελετήθηκε στο εργαστήριο είναι η κάπνιση με υγρούς καπνούς.

### 1.2 Κάπνιση

Με τον όρο κάπνιση νοείται η συντήρηση των αλιευμάτων μέσω της διαδικασίας της αλάτισης και ενίοτε αποξήρανσης και έπειτα κάπνισης. Το κάπνισμα συνεισφέρει στο άρωμα, στη γεύση και στην χρωματική εμφάνιση του προϊόντος, ενώ ταυτόχρονα στοχεύει στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του. Τόσο η πτώση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) όσο και η περιεκτικότητα του φυσικού καπνού σε οργανικές ουσίες (φαινολικές ουσίες) με αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση, καθιστούν την κάπνιση μία πολύ συχνή μέθοδο για τη συντήρηση των τροφίμων. Ακόμα, το είδος του ξύλου, η θερμοκρασία

και ο χρόνος καύσης, το ποσοστό οξυγόνου, η ροή του αέρα και η υγρασία επηρεάζουν τη σύσταση του καπνού και κατά συνέπεια και το τρόφιμο. Η τεχνολογία της κάπνισης χωρίζεται σε ψυχρή, θερμή και υγρή κάπνιση (Μποζιάρης Ι. 2012).

#### 1.2.1 Ψυχρή κάπνιση

Κατά τη διαδικασία της ψυχρής κάπνισης η θερμοκρασία του θαλάμου κυμαίνεται έως τους +37°C και η διάρκεια είναι δυνατό να διαρκέσει από μερικές ώρες μέχρι μερικές εβδομάδες. Τα προϊόντα συνηθίζεται να υπόκεινται σε μια προεργασία με αλάτισμα (νιτρικά/νιτρώδη άλατα) και κατόπιν να καπνίζονται. Στην ψυχρή κάπνιση, τα προϊόντα δεν υφίστανται ψήσιμο αλλά ξήρανση και η συντήρησή τους πραγματοποιείται στο ψυγείο (Μποζιάρης Ι. 2012).

#### 1.2.2 Θερμή κάπνιση

Κατά τη διαδικασία της θερμής κάπνισης η θερμοκρασία του θαλάμου κυμαίνεται έως τους +120°C και χωρίζεται σε δύο (2) στάδια. Στο πρώτο στάδιο, οι ιχθύες αφυδατώνονται σε θερμοκρασίες από +30°C έως +55°C. Στο δεύτερο στάδιο, της κύριας κάπνισης, οι ιχθύες ψήνονται σε θερμοκρασίες από +80°C έως +120°C. Η θερμοκρασία στο κέντρο του ιχθύος φθάνει σε θερμοκρασίες από +70°C έως +80°C. Τέλος, το προϊόν ψύχεται και συσκευάζεται (Μποζιάρης Ι. 2012).

#### 1.2.3 Υγρή κάπνιση

Κατά τη διαδικασία της υγρής κάπνισης πραγματοποιείται ψεκάσμος, διαπότιση ή εμβάπτιση σε διάλυμα υγρού καπνού. Ο τύπος αυτός του καπνού μπορεί ακόμα να εισαχθεί στο καπνιστήριο μέσω του συστήματος ανακυκλώσεως του αέρα. Ο υγρός καπνός παράγεται από καπνό καύσης ξύλων έπειτα από συμπύκνωση και κλασματική

απόσταξη. Το διάλυμα καπνού διαλύεται σε νερό, λάδι ή οργανικούς διαλύτες. Το κόστος κάπνισης σε αυτήν την μέθοδο είναι μικρότερο και είναι δυνατός ο έλεγχος των ποσοτήτων των συστατικών αρωμάτων που διοχετεύονται στο προϊόν. Ακόμα η γεύση είναι ελεγχόμενη και δεν διαφέρει στην εξωτερική και εσωτερική συγκέντρωση της κάπνισης της πρώτης ύλης (Maga J. 1988). Με την υγρή κάπνιση επιτυγχάνεται η ολική απομάκρυνση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) καθώς τα κλάσματα του καπνού υπόκεινται σε καθαρισμό πριν την χρήση τους (Μποζιάρης Ι. 2012).

### 1.3 Ασφάλεια και ποιότητα των καπνιστών αλιευμάτων

Η μεγάλη διάρκεια ζωής των καπνιστών τροφίμων είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού της μειωμένης ενεργότητας νερού, της δράσης των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του καπνού καθώς επίσης και της θερμικής επεξεργασίας. Η θερμική επεξεργασία στην οποία υπόκεινται τα αλιεύματα, δημιουργούν ένα πλαίσιο μεγαλύτερης ασφάλειας για το τρόφιμο. Με την κάπνιση επιδιώκεται η μείωση του βακτηριακού φορτίου των ιχθύων, ο περιορισμός της υγρασίας του αλιεύματος, η αδρανοποίηση των ενζύμων και σπορίων και ο εμπλουτισμός των ιστών με βακτηριοστατικές ή βακτηριοκτόνες ιδιότητες οι οποίες προέρχονται από τον καπνό.

Για παράδειγμα, στον ελαφρά αλατισμένο καπνιστό σολομό ο οποίος θα συσκευασθεί υπό κενό, απαιτούνται τριάντα (30) λεπτά τουλάχιστον στους +83 °C ώστε να αδρανοποιηθούν τα σπόρια του *Clostridium botulinum* (Μποζιάρης Ι. 2013, Μποζιάρης Ι. 2012).

Ωστόσο, είναι δυνατό να βρεθούν χημικές ουσίες στα καπνιστά αλιεύματα πέρα από αυτές που θα περιείχε ο ιχθύς ως πρώτη ύλη. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί

υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι δυνατό να δημιουργηθούν από την καύση ξύλων σε θερμοκρασίες άνω των 400 °C. Η θερμοκρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό PAHs καθώς η συγκέντρωση των PAHs αυξάνεται αναλογικά κατά την διάρκεια της πυρόλυσης από τους 400 °C έως τους 1000 °C. Γνωστό είναι επίσης ότι από τα διακόσια (200) είδη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων όχι όλοι αλλά ορισμένοι είναι καρκινογόνοι, όπως το 3,4-βενζοπυρένιο (Belichovska K. et al. 2019). Ακόμα καρκινογόνες είναι και οι νιτροζαμίνες (NNAs) οι οποίες σχηματίζονται από την χημική αντίδραση των νιτρικών/νιτρωδών αλάτων με τις τριτοταγείς αμίνες της σάρκας των ψαριών (διμεθυλαμίνη, τριμεθυλαμίνη).

#### 1.4 Σύσταση καπνού

Ο καπνός αποτελεί το πιο κομβικό σημείο για την επιτυχία του αρώματος, της γεύσης και της εμφάνισης καθώς επίσης και των βακτηριοστατικών και βακτηριοκτόνων ιδιοτήτων του. Τα ξύλα ως πρώτη ύλη σε μορφή πριονιδιού αναμειγνύονται με ροκανίδια και δημιουργούν τα χαρμάνια τα οποία θα καούν κατά την διαδικασία του καπνίσματος. Η σύσταση του καπνού εξαρτάται από το είδος του ξύλου, την χημική του σύνθεση, από την θερμοκρασία της ατελούς καύσεως και από την ποσότητα του διαθέσιμου για την καύση αέρα (Belichovska K. et al. 2019). Είδη ξύλων όπως η οξιά, η μηλιά, η κερασιά, ο δρυς ή βελανιδιά και η καρυδιά με προσθήκη αρωματικών φυτών όπως θυμάρι, δάφνη, δενδρολίβανο έχουν καλύτερα αποτελέσματα στην κάπνιση. Τα ξύλα των ρητινοφόρων δένδρων (κέδρο, έλατο, πεύκο, ελάτη Douglas) περιέχουν σημαντικές ποσότητες ρητινών οι οποίες προσδίδουν μία δυσάρεστη, πικρή γεύση και άρωμα ενώ το χρώμα που προσδίδουν στα ψάρια είναι σκούρο (Belichovska K. et al. 2019). Ο καπνός εμπεριέχει, πτητικές ουσίες, αλκοόλες (μεθανόλη), εστέρες, καρβονύλια, λακτόνες, κρεσόλες, αλδεΐδες, κετόνες, διάφορες φαινολικές ενώσεις, είδη

οξέων (οξικό οξύ και μυρμηγκικό οξύ) και φορμαλδεΐδη σε μικρό ποσοστό. Από αυτές, οι φαινολικές ενώσεις έχουν κυρίαρχο ρόλο καθώς εισχωρούν στην μυϊκή μάζα ενώ ταυτόχρονα επικάθονται στην επιφάνεια του προϊόντος. Η συντήρηση του τροφίμου πραγματοποιείται από τα είδη των οξέων με την πτώση του pH και της επίδρασης της φορμαλδεΐδης και των φαινολικών ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση. Το χρώμα των καπνιστών προϊόντων δημιουργείται από την επίδραση των καρβονυλίων και τις αντιδράσεις τους με τις πρωτεΐνες. Ενώ η οσμή των καπνιστών προϊόντων οφείλεται κατά κύριο λόγο στις αλδεΐδες, ωστόσο συμβάλλουν και οι καρβονυλικές ενώσεις.

### 1.5 Καπνιστά είδη

Ανά τον κόσμο και μέσα στους αιώνες αρκετοί πληθυσμοί είχαν υιοθετήσει την τεχνική της κάπνισης και έχουν μάθει να συντηρούν με αυτόν τον τρόπο τα τρόφιμά τους. Οι κυριότερες οικογένειες αλιευμάτων οι οποίες χρησιμοποιούνται στην κάπνιση είναι οι σολομονίδες (Salmonidae), οι κυπρινίδες (Cyprinidae), οι κλουπεΐδες (Clupeidae), οι σκομβρίδες (Scombridae), οι μερλουκίδες (Merlucciidae) και ορισμένα δίθυρα όπως τα στρείδια και τα χτένια.

**Πίνακας 1.5:** Είδη αλιευμάτων ανά τον κόσμο υπό συντήρηση μέσω κάπνισης

Επιστημονική ονομασία	Κοινή ονομασία
<i>Anguilla mossmbica</i>	Μακρύ χέλι (African longfin eel)
<i>Melanogrammus aegiefinus</i>	Εγκλεφίνος (Haddock)
<i>Scomber scombrus</i>	Σκουμπρί
<i>Chelon richardsonii</i>	Χειλονάρι (South African mullet)
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Παλαμίδα
<i>Salmo salar</i>	Σολομός
<i>Cyprinus carpio</i>	Κυπρίνος
<i>Acipenser sturio</i>	Οξύρρυγχος
<i>Merlangius merlangus</i>	Ταούκι
<i>Merluccius merluccius</i>	Μπακαλιάρος
<i>Clupea pallasii</i>	Ρέγγα του Ειρηνικού
<i>Sardina pilchardus</i>	Σαρδέλα
<i>Mugil cephalus</i>	Κέφαλος
<i>Thunnus thynnus</i>	Ερυθρός τόνος
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Κόκκινος σολομός
<i>Trachurus picturatus</i>	Μαυροσαύριδο

## 1.6 Μικροβιακή αλλοίωση αλιευμάτων

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών που συνεισφέρουν περισσότερο στην αλλοίωση των αλιευμάτων επιχειρήθηκε από τον Van Spreekens (1974), τον Levin (1968) και τους Jensen και Schulz (1980). Τα θαλασσινά είναι πιο ευπαθή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το βοδινό και χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, κλπ, για το λόγο αυτό απαιτείται πιο προσεκτικός χειρισμός και αποθήκευση (Ashie et al. 1996).

Η αλλοίωση των εν λόγω τροφίμων μπορεί να οριστεί ως οι αλλαγές στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (όψη, γεύση, οσμή και υφή) ώστε να τα καθιστά ακατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Gram & Huss 1996). Η αλλοίωση των αλιευμάτων μπορεί να προκληθεί από ένζυμα, αφυδάτωση, οξείδωση, μόλυνση και φυσική βλάβη (Harbell 1988). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).

Έρευνες αναφέρουν ότι η αλλοίωση των ψαριών δεν εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών στα ψάρια, αλλά μάλλον από ένα μικρό τμήμα της μικροβιακής τους χλωρίδας, τους «ειδικούς οργανισμούς αλλοίωσης» (specific spoilage organisms, SSO) (Dalgaard 2003, Dalgaard 1995).



## 1.7 Παθογόνοι μικροοργανισμοί καπνιστών αλιευμάτων

Συνηθισμένο φαινόμενο και ένα σημαντικό πεδίο μελέτης στη μικροβιολογία των τροφίμων είναι ο ανταγωνισμός και η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο εκάστοτε τρόφιμο (Gram 1992). Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι συνήθως συναντώνται σε καπνιστά προϊόντα συνοψίζονται παρακάτω.

### *Listeria monocytogenes*

Είναι ένα ευρέως γνωστό στη βιομηχανία των τροφίμων Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο και αποτελεί κίνδυνο για πρόκληση τροφοδηλητηριάσης. Μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες +1 έως +45 °C με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους +30 έως +37 °C. Ως ψυχρότροφος μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει και σε ακραίες συνθήκες, όπως σε μεγάλη αλατότητα ή χαμηλό pH. Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί επανειλημμένα από νωπά και κατεψυγμένα ψάρια, ενώ έχει βρεθεί σε επιφανειακά και θαλάσσια ύδατα (Economou et al. 2013). Στα αλιεύματα μπορεί να εισχωρήσει είτε μέσω του νερού είτε μέσω της διαχείρισής των αλιευμάτων από τη βιομηχανία. Τα καπνιστά αλιεύματα μεταφέρουν ένα συγκεκριμένο ρίσκο λιστερίωσης, ειδικότερα τα καπνιστά προϊόντα κάπνισης υπό ψύξη (Ericsson et al. 1997). Αν και υπάρχουν ελάχιστες αποδείξεις ότι ένας πολύ χαμηλός αριθμός της *L. monocytogenes* ( $<10^2$  cfug<sup>-1</sup>) στα τρόφιμα προκαλεί ασθένεια (Chen et al. 2003), οι περισσότερες χώρες και οργανισμοί απαιτούν την απουσία της σε 25g δείγματος όπως στην πολιτική του FDA που αναφέρει «μηδενική ανοχή» στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα. Η ΕΕ έχει ανοχή κάτω των 100 cfug<sup>-1</sup> για ορισμένα τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη ή ειδικά ιατρικούς σκοπούς και μηδενική ανοχή για άλλα τρόφιμα τα οποία υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (EC 2005). Ο Καναδάς και η Αυστραλία αφήνουν

επίσης ένα περιθώριο  $100 \text{ cfug}^{-1}$  (Donn 2001). Αυτές οι επισημάνσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα έτοιμα για κατανάλωση καπνιστά ψάρια δεν πρέπει να έχουν ανιχνεύσιμη *L. monocytogenes* ανά 25g καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Είναι ένα πολύ μεγάλο ζήτημα ο έλεγχος της *L. monocytogenes* για επιμόλυνση σε καπνιστά αλιεύματα (Lin H. et al. 2008).

### *Clostridium botulinum*

Αυστηρά αναερόβιο βακτήριο το οποίο συναντάται υπό φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό των ιχθύων. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του *C. botulinum* είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση NaCl, τα νιτρώδη άλατα, η σύνθεση και μικροχλωρίδα των τροφίμων και η ενεργότητα νερού. Συναντάται άφθοο στην στα ιζήματα και σε μέρη του σώματος των ιχθύων όπως τα βράγχια και τα σπλάχνα. Ο τύπος E του *C. botulinum* είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος σε θαλάσσια οικοσυστήματα και ψάρια στα οποία βρίσκεται σε γενικά χαμηλά επίπεδα. (Huss 1980, Hielm et al. 1998). Διαπιστώνεται ότι το *C. botulinum* εμφανίζεται τόσο σε καπνιστά αλιεύματα υπό ψύξη όσο και σε καπνιστά αλιεύματα υπό θερμική επεξεργασία παράγοντας σπόρια και τοξίνες (Lin H. et al. 2008). Τα καπνιστά αλιεύματα θερμικής επεξεργασίας φαίνεται να έχουν υψηλότερο ρίσκο για εμφάνιση *C. botulinum* E από ότι τα καπνιστά αλιεύματα ψυχρής επεξεργασίας πιθανότατα λόγω της θερμικής επεξεργασίας η οποία πυροδοτεί την ενεργοποίηση σπορίων (Southcott & Razzell 1973, Eklund 1992). Ο FDA (2001) προτείνει ότι ο έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί μέσω του συνδυασμού θερμοκρασίας, αλατίσματος, συσκευασίας και νιτρωδών.

*Yersinia enterocolitica*

Είναι ένα Gram αρνητικό προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο της οικογένειας Enterobacteriaceae. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* είναι ένα αρκετά διαδεδομένο βακτήριο που απαντάται στη φύση, στα υδάτινα οικοσυστήματα, αλλά και σε δεξαμενές εκτροφής ζώων. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* είναι η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση NaCl. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ +28 έως +37 °C ενώ τα στελέχη της καταστρέφονται με θέρμανση στους +60 °C. Οι πιθανότητες μόλυνσης του ανθρώπου με *Y. enterocolitica* αυξάνονται με κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου. Μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, όπως γαστρεντερίτιδα, εντεροκολίτιδα, σηψαιμία (Bottone 1997). Λόγω του ψυχρότροφου χαρακτήρα της έχει χαρακτηριστεί ως ένα δυναμικά αναπτυσσόμενο παθογόνο βακτήριο στα τρόφιμα (Davies et al. 2001).

### 1.8 Αρχή Μεθόδου Οπτικής Πυκνότητας

Το πείραμα βασίστηκε στην μέθοδο της φασματοφωτομετρίας και το νόμο των Lambert-Beer για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

Οπτική πυκνότητα (ή Απορροφητικότητα), OD (optical density), ονομάζεται το μέγεθος  $\log I/I_0$  και συνδέεται με τα υπόλοιπα μεγέθη σύμφωνα με τον τύπο παρακάτω.

$$OD_\lambda = - \log I/I_0$$

Όπου,

$\lambda$ : το μήκος κύματος

$I_0$ : η ένταση του μήκους κύματος

$I$ : η ένταση της ακτινοβολίας

Ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία σε ορισμένη περιοχή μήκους κύματος. Το φάσμα απορρόφησης (absorption spectrum) είναι το διάγραμμα απορρόφησης του φωτός από ένα μόριο σε συνάρτηση με το μήκος κύματος. Για να γίνει το διάγραμμα μετράται η απορρόφηση ενός μορίου σε όλο το φάσμα μήκους κύματος από 400-800 nm. Με τη διαδικασία αυτή βρίσκουμε το μήκος κύματος όπου ένα μόριο εμφανίζει την μέγιστη απορρόφηση (Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Πατρών).

Η εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω της μέτρησης της απορρόφησης φωτός (ή διαφορετικά οπτικής πυκνότητας) έχει πλεονεκτήματα όπως, τη γρήγορη, μη καταστροφική, φθηνή εφαρμογή και είναι σχετικά εύκολη να αυτοματοποιηθεί σε σχέση με άλλες τεχνικές όταν συγκρίνονται με κλασικές μεθόδους καταμέτρησης ζωντανών κυττάρων (Dalgaard P. & Koutsoumanis K. 2001).

Επιπλέον ο συνδυασμός των δεδομένων μεθόδου απορροφητικότητας (ή οπτικής πυκνότητας) με μεθόδους καταμέτρησης κυττάρων συστήνεται για την εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης (Breand et al. 1997; Stephens et al. 1997; Augustin et al. 1999).

Τα μοντέλα μέτρησης απορροφητικότητας (ή οπτικής πυκνότητας) είναι ικανά να προβλέψουν τον χρόνο που απαιτείται για τη δημιουργία αλλοίωσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα και της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στα κρίσιμα σημεία υπό διάφορες συνθήκες ανάπτυξης (Dalgaard P. & Koutsoumanis K. 2001).

### 1.9 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης έξι διαφορετικών καπνών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων – παραγωγής καπνιστών αλευρικών προϊόντων, στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* CITY 844.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) διαφορετικά είδη υγρών καπνών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, για τη διερεύνηση της επίδρασης και αποτελεσματικότητας τους έναντι του παθογόνου στελέχους *Yersinia enterocolitica* CITY 844. Το πείραμα εξελέχθη μέσω της πλήρωσης των microplates και της εξαγωγής αποτελεσμάτων με Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader.

### 2.2 Αναζωογόνηση παθογόνου μικροοργανισμού

Έγινε αναζωογόνηση του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 από τους -80 °C σε 9 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth, 30g σκόνης TSB/1L απιονισμένου νερού) και επωάστηκε στους 37 °C για 24 ώρες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των 9 ml σε 5000 στροφές (rpm) για 12 min σε θερμοκρασία 20 °C. Λήφθηκε ίζημα το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 8,5g NaCl και 1 g πεπτόνη/1L απιονισμένου νερού) απ' όπου πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια του πειράματος, αντιστοιχούσαν σε μικροβιακούς πληθυσμούς  $10^7$ ,  $10^5$  και  $10^3$ .

### 2.3 Χαρακτηρισμός συγκεντρώσεων

Χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) υγροί καπνοί, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, σε τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις ο καθένας (Πίν. 2.3): α) καπνός L9 συγκεντρώσεων 0.05% (5μl), 0.1% (10μl) και 0.15% (15μl), β) καπνός G6 συγκεντρώσεων 0.1% (10μl), 0.2% (20μl) και 0.35%

(35μl), γ) καπνός C3 συγκεντρώσεων 0.5% (100μl), 0.75% (150μl) και 1% (200μl), δ) καπνός D4 συγκεντρώσεων 0.5% (50μl), 0.75% (75μl) και 1% (100μl), ε) καπνός A1 συγκεντρώσεων 0.6% (60μl), 0.8% (80μl) και 1% (100μl), στ) καπνός E5 συγκεντρώσεων 0.6% (60μl), 0.9% (90μl) και 1.2% (120μl).

**Πίνακας 2.3:** Είδη καπνών και συγκεντρώσεις

Καπνός	Συγκεντρώσεις καπνών		
<b>L9</b>	0.05% (5μl)	0.1% (10μl)	0.15% (15μl)
<b>G6</b>	0.1% (10μl)	0.2% (20μl)	0.35% (35μl)
<b>C3 (50%)</b>	0.5% (100μl)	0.75% (150μl)	1% (200μl)
<b>D4</b>	0.5% (50μl)	0.75% (75μl)	1% (100μl)
<b>A1</b>	0.6% (60μl)	0.8% (80μl)	1% (100μl)
<b>E5</b>	0.6% (60μl)	0.9% (90μl)	1.2% (120μl)

#### 2.4 Πλήρωση των Microplates

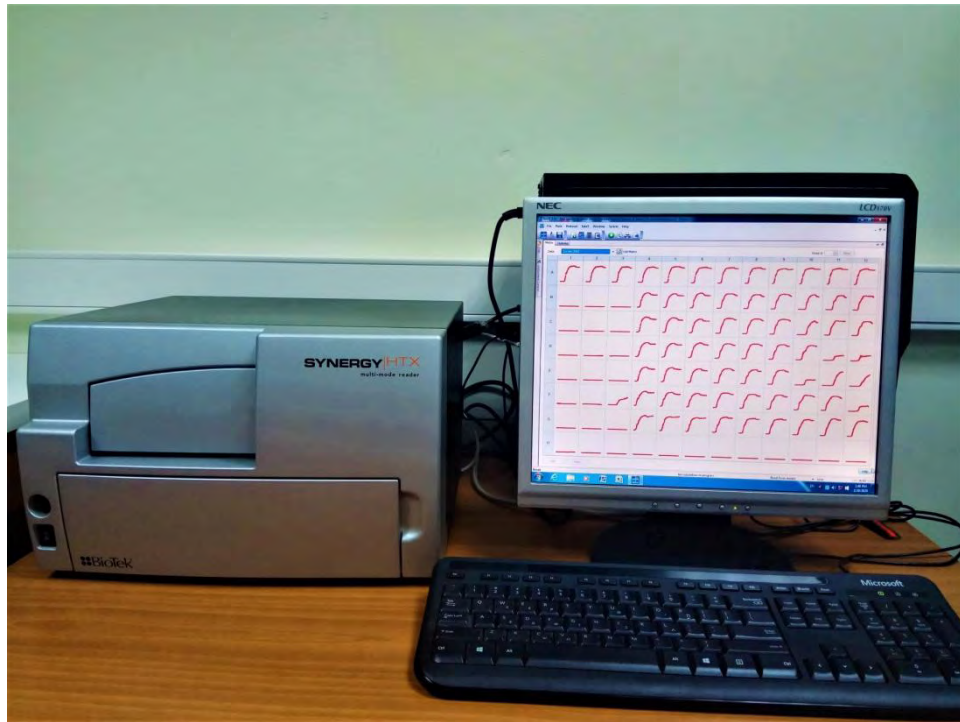
Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) microplates στο καθένα από τα οποία μελετήθηκαν δύο (2) υγροί καπνοί. Η πλήρωση των microplates γινόταν υπό άσηπτες συνθήκες. Στα πηγαδάκια της πρώτης σειράς του microplate τοποθετούνταν ανά τέσσερα πηγαδάκια, 180 μl TSB και 20 μl από τους μικροβιακούς πληθυσμούς  $10^3$ ,  $10^5$  και  $10^7$  αντίστοιχα. Στις επόμενες σειρές, στα τρία πρώτα πηγαδάκια τοποθετούνταν 200 μl του διαλύματος TSB με την επιθυμητή συγκέντρωση καπνού, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ο μάρτυρας, και στα υπόλοιπα τοποθετούνταν ανά τρία πηγαδάκια, 180 μl του ίδιου διαλύματος TSB-καπνού και 20 μl από τους μικροβιακούς πληθυσμούς  $10^7$ ,  $10^5$  και  $10^3$  αντίστοιχα.

#### 2.5 Λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας με Microplate Reader

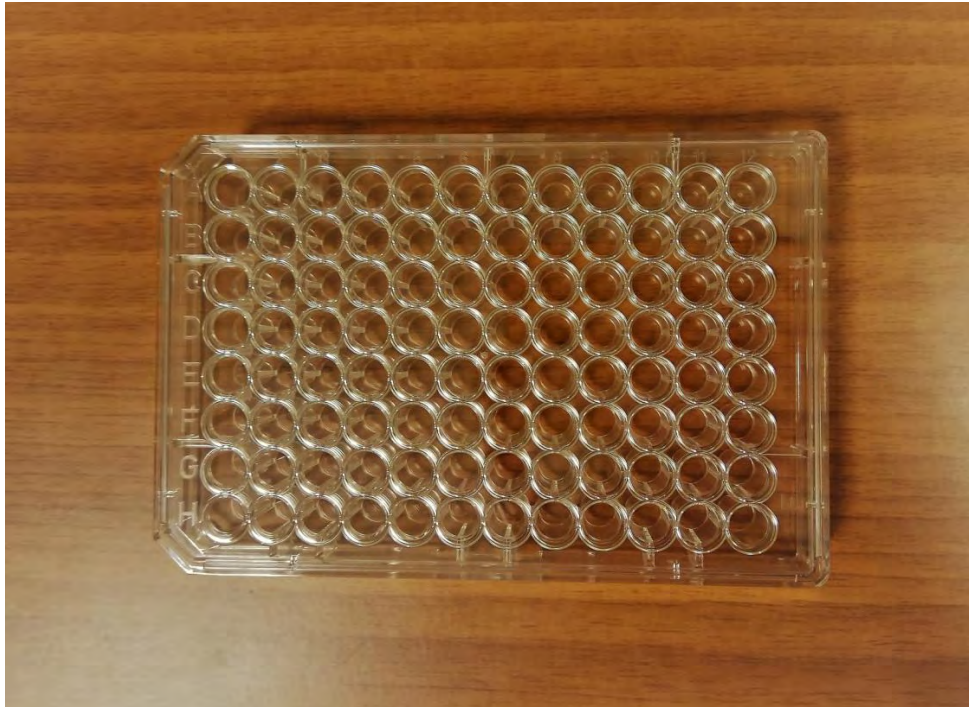
Στο τέλος κάθε πλήρωσης των microplates, τοποθετήθηκαν στο Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (Εικ 2.5.1 & 2.5.2). Το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε ήταν το ίδιο και για τα τρία (3) microplates. Η λήψη των μετρήσεων απορρόφησης γινόταν στα 580 nm, κάθε 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 30 °C για 48 ώρες. Το στέλεχος *Y. enterocolitica* CITY 844 αναπτυσσόταν παράλληλα στα πηγαδάκια του microplate έχοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις μικροβιακού φορτίου και συγκέντρωσης καπνού, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με την χρήση λογισμικού Gen5™ Data Analysis Software και σχηματίστηκαν διαγράμματα.





Εικόνα 2.5.1: Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader



Εικόνα 2.5.2: Microplate

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έδειξε σημαντική επίδραση του καπνού στην αύξηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* στελέχους CITY 844. Στις πυκνότητες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο υγρός καπνός ανέστειλε την ταχεία αύξηση του μικροοργανισμού. Ωστόσο ο κάθε καπνός είχε την δική του επίδραση και η δράση του διέφερε ανάλογα με τον μικροβιακό πληθυσμό. Παρακάτω παρουσιάζονται τρεις (3) πίνακες με τις επιδράσεις των καπνών στον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και τον χρόνο προσαρμογής (Lagtime) συνοπτικά για κάθε microplate καθώς επίσης και τα διαγράμματα για τους καπνούς και τις συγκεντρώσεις καπνών: α) L9 0,1%, β) G6 0.35%, γ) C3 1%, δ) D4 0,75%, ε) A1 1% ζ) E5 0,9%.

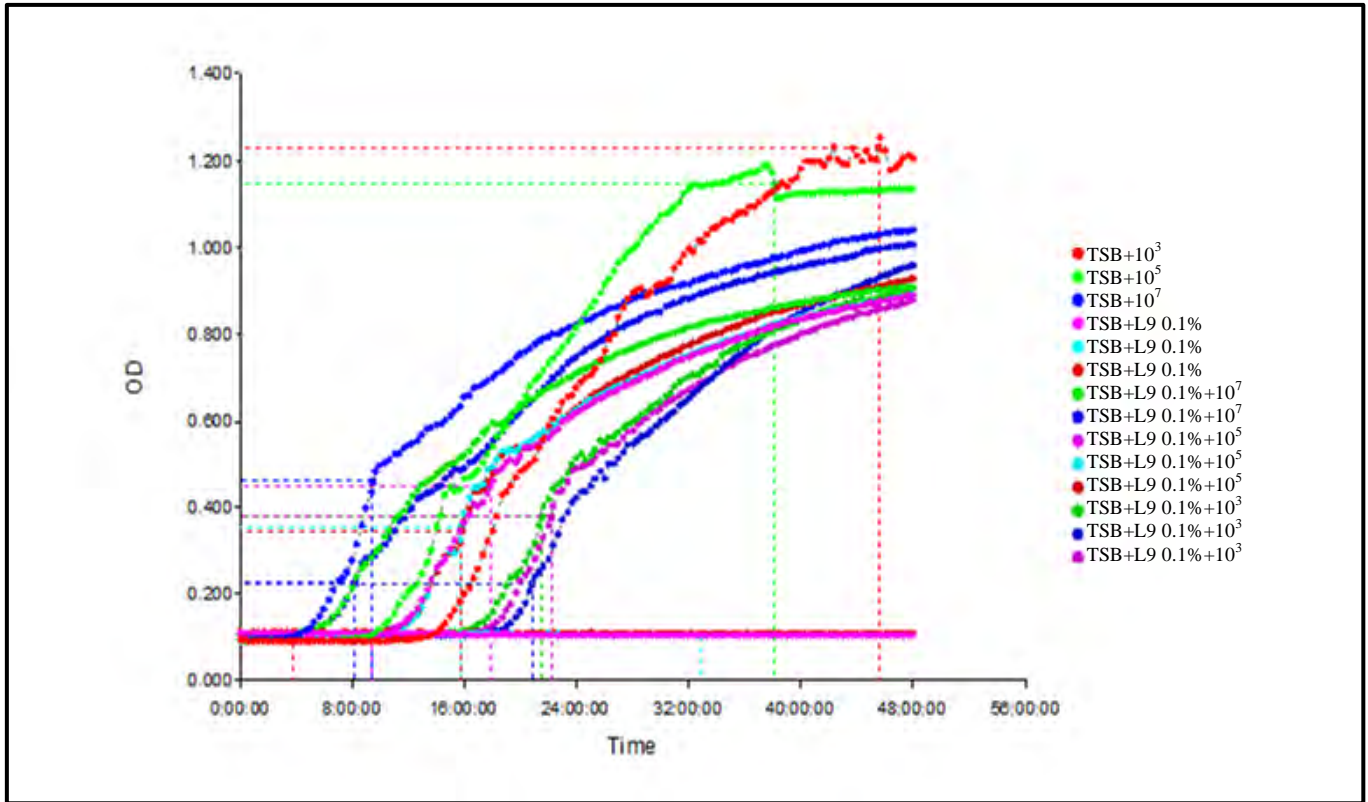
Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι ανάλογα πειράματα με την μέθοδο της οπτικής πυκνότητας και την επίδραση αντιμικροβιακών παραγόντων γίνονται και σε άλλες πρώτες ύλες.

### 3.1 Αποτελέσματα πρώτου (1<sup>ου</sup>) Microplate

Όλες οι μετρήσεις του πρώτου (1<sup>ου</sup>) microplate συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.1). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι L9 και G6 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των διαγραμμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

**Πίνακας 3.1:** Σύνοψη 1<sup>ου</sup> Microplate

Θέση microplate	$\mu_{\max}$	Lagtime (h)
<b>TSB + 10<sup>3</sup></b>	2,66	15,7
<b>TSB + 10<sup>5</sup></b>	2,38	9,42
<b>TSB + 10<sup>7</sup></b>	2,26	4,8
<b>TSB + L9 (0,05%) + 10<sup>5</sup></b>	3,60	21,07
<b>TSB + L9 (0,05%) + 10<sup>3</sup></b>	3,25	26,23
<b>TSB + L9 (0,1%) + 10<sup>7</sup></b>	1,35	5,67
<b>TSB + L9 (0,1%) + 10<sup>5</sup></b>	2,37	11,26
<b>TSB + L9 (0,1%) + 10<sup>3</sup></b>	2,02	17,17
<b>TSB + L9 (0,15%) + 10<sup>7</sup></b>	1,71	4,64
<b>TSB + L9 (0,15%) + 10<sup>5</sup></b>	2,31	9,11
<b>TSB + L9 (0,15%) + 10<sup>3</sup></b>	2,40	15,49
<b>TSB + G6 (0,1%) + 10<sup>7</sup></b>	2,08	4,72
<b>TSB + G6 (0,1%) + 10<sup>5</sup></b>	1,64	8,73
<b>TSB + G6 (0,1%) + 10<sup>3</sup></b>	1,99	14,85
<b>TSB + G6 (0,2%) + 10<sup>7</sup></b>	1,86	4,39
<b>TSB + G6 (0,2%) + 10<sup>5</sup></b>	2,11	9,03
<b>TSB + G6 (0,2%) + 10<sup>3</sup></b>	2,33	15,44
<b>TSB + G6 (0,35%) + 10<sup>7</sup></b>	1,59	4,71
<b>TSB + G6 (0,35%) + 10<sup>5</sup></b>	1,79	9,19
<b>TSB + G6 (0,35%) + 10<sup>3</sup></b>	1,84	14,02



Σχήμα 3.1.1: Καπνός L9 0,1%

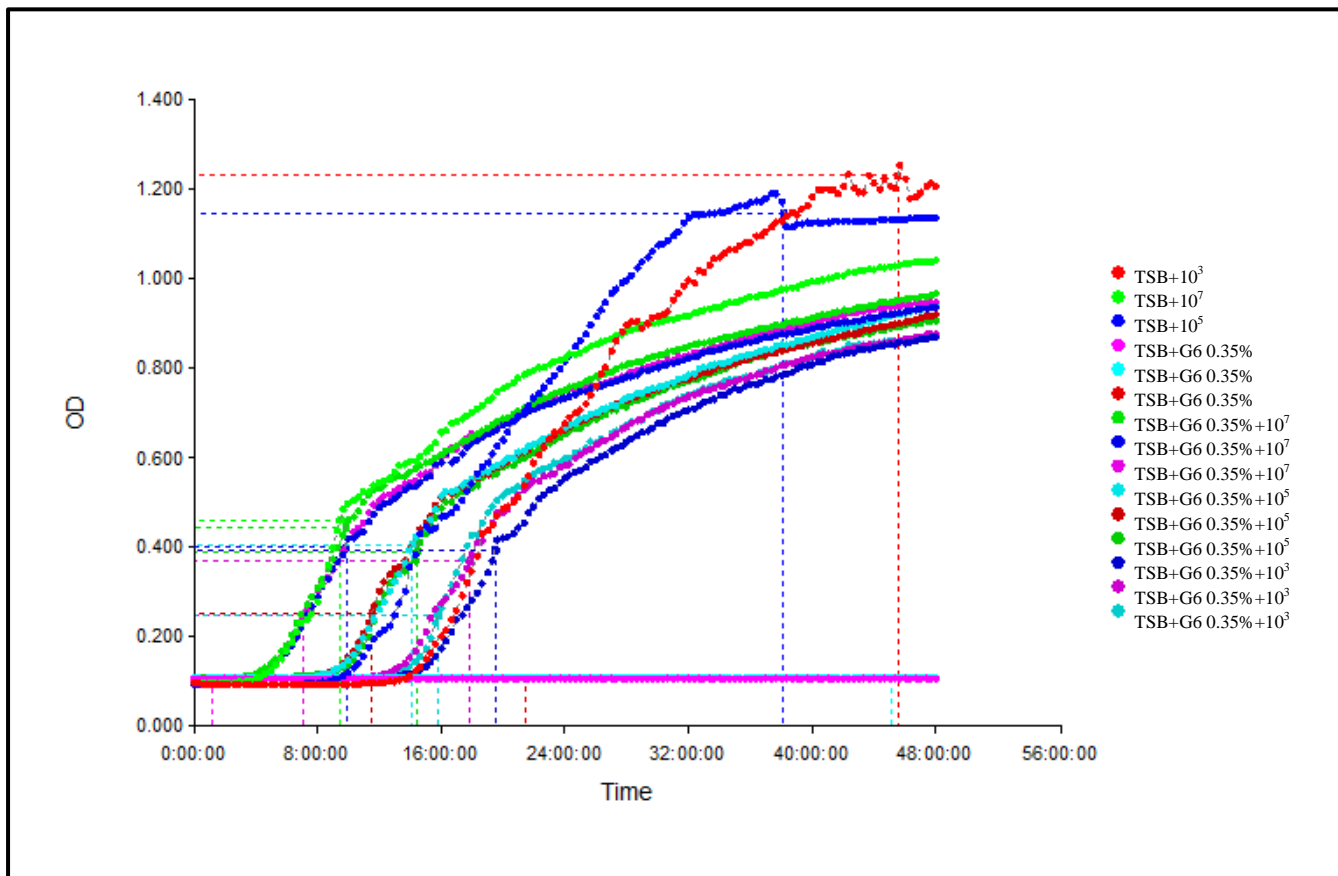
Στο σχήμα 3.1.1 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές όπως επηρεάστηκαν από τον καπνό L9 0,1%. Η πρώτη μπλε σκούρο καμπύλη και η πρώτη πράσινη σκούρο καμπύλη με την ταχεία αύξηση είναι οι μετρήσεις με τον υψηλότερο πληθυσμό ( $10^7$ ). Όπως φαίνεται στο σχήμα, η έναρξη της ανάπτυξης του πληθυσμού ξεκίνησε νωρίτερα των οκτώ (8) ωρών και ειδικότερα στις πέντε (5) ώρες και σαράντα (40) λεπτά. Η μπλε και πράσινη καμπύλη συνέχισαν την ανοδική τους πορεία, επομένως και την αύξηση του πληθυσμού, μέχρι και τις σαράντα οκτώ (48) ώρες, οι οποίες ήταν και η λήξη του πειράματος.

Στη συνέχεια, στο μέσο του διαγράμματος διακρίνονται οι καμπύλες χρώματος ματζέντα, γαλάζιο και κόκκινο με μικρότερο μικροβιακό πληθυσμό ( $10^5$ ) να αναπτύσσονται μετά τις πρώτες οκτώ (8) ώρες και ειδικότερα στις έντεκα (11) ώρες και δεκαπέντε (15) λεπτά.

Ακολούθως, οι καμπύλες χρώματος πράσινο σκούρο, μπλε σκούρο και ματζέντα, με πληθυσμό ( $10^3$ ) παρουσιάζουν την έναρξη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού μετά τις δεκαέξι (16) ώρες και συγκεκριμένα, στις δεκαεπτά (17) ώρες και δέκα (10) λεπτά.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

Διαπιστώνεται κάποια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού έπειτα από την επίδραση του υγρού καπνού L9 0,1% αλλά όχι κάποια σημαντική διαφορά. Ο χρόνος προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την προσθήκη του καπνού αυξάνεται κατά μέσο όρο στις δύο (2) ώρες και για τους τρεις (3) μικροβιακούς πληθυσμούς.



Σχήμα 3.1.2: Καπνός G6 0.35%

Στο σχήμα 3.1.2 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές όπως επηρεάστηκαν από τον καπνό G6 0,35%. Ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^7$ ) ξεκίνησε την ανάπτυξη του στις τέσσερις (4) ώρες και σαράντα δύο (42) λεπτά και οι καμπύλες ανάπτυξής του παρουσιάζονται στο σχήμα με χρώμα μπλε και πράσινο σκούρο και ματζέντα.

Στη συνέχεια ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^5$ ) ξεκίνησε την ανάπτυξη του στις εννέα (9) ώρες και έντεκα (11) λεπτά και συνέχισε την πορεία του αυξανόμενος σταθερά.

Ακολούθως ο πληθυσμός ( $10^3$ ) ξεκίνησε την ανάπτυξη του στις δεκατέσσερις (14) ώρες και δώδεκα (12) λεπτά. Η σταθερή αυξανόμενη πορεία του είναι ορατή στο σχήμα με τις καμπύλες χρώματος μπλε σκούρο, ματζέντα και γαλάζιο.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

Διαπιστώνεται ότι δεν ασκείται ιδιαίτερη επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού από τον υγρό καπνό G6 0,35% έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού. Ο χρόνος προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την προσθήκη του καπνού δεν αυξάνεται για κανέναν μικροβιακό πληθυσμό.

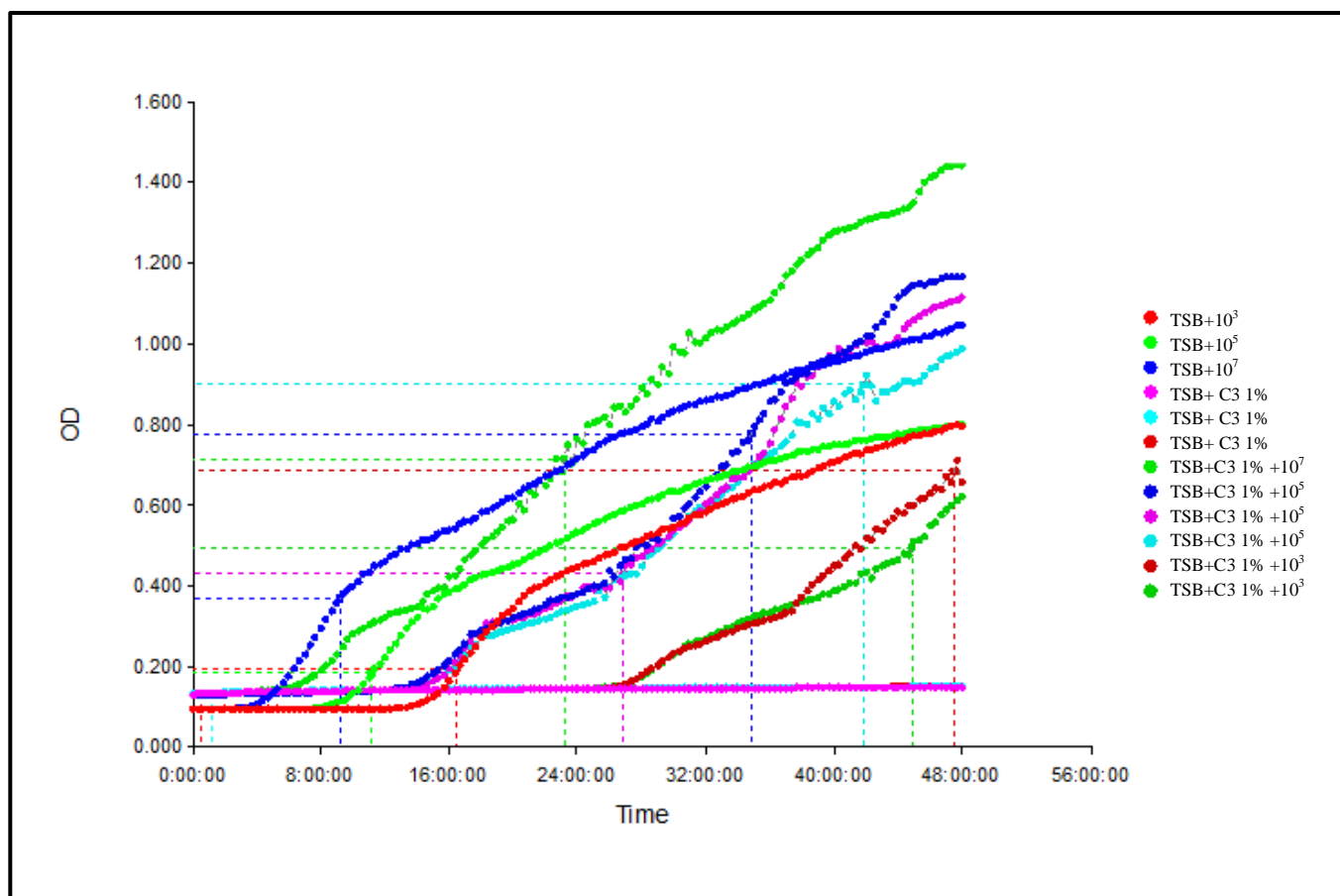
### 3.2 Αποτελέσματα δεύτερου (2<sup>ου</sup>) Microplate

Όλες οι μετρήσεις του δεύτερου (2<sup>ου</sup>) microplate συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 3.2). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις και τα διαγράμματα του εκάστοτε καπνού. Οι καπνοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι C3 και D4 σε όλες τις συγκεντρώσεις και πληθυσμούς. Για την παρουσίαση των διαγραμμάτων επιλέχθηκαν διαγράμματα στα οποία γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές οι μεταβολές.

Πίνακας 3.2: Σύνοψη 2<sup>ου</sup> Microplate

Θέση microplate	$\mu_{\max}$	Lagtime (h)
<b>TSB + 10<sup>3</sup></b>	1,045	15,42
<b>TSB + 10<sup>5</sup></b>	1,185	9,03
<b>TSB + 10<sup>7</sup></b>	1,215	5,17
<b>TSB + C3 (0,9%) + 10<sup>7</sup></b>	1,28	5,52
<b>TSB + C3 (0,9%) + 10<sup>5</sup></b>	1,17	10,34
<b>TSB + C3 (0,9%) + 10<sup>3</sup></b>	1,81	20,33
<b>TSB + C3 (0,75%) + 10<sup>7</sup></b>	1,42	5,75
<b>TSB + C3 (0,75%) + 10<sup>5</sup></b>	1,23	12,22
<b>TSB + C3 (0,75%) + 10<sup>3</sup></b>	1,14	19,40
<b>TSB + C3 (1%) + 10<sup>7</sup></b>	1,3	6,7
<b>TSB + C3 (1%) + 10<sup>5</sup></b>	1,82	14,51
<b>TSB + C3 (1%) + 10<sup>3</sup></b>	1,83	26,32
<b>TSB + D4 (0,5%) + 10<sup>7</sup></b>	1,21	4,94
<b>TSB + D4 (0,5%) + 10<sup>5</sup></b>	1,13	8,77
<b>TSB + D4 (0,5%) + 10<sup>3</sup></b>	1,22	14,28
<b>TSB + D4 (0,75%) + 10<sup>7</sup></b>	1,06	4,65
<b>TSB + D4 (0,75%) + 10<sup>5</sup></b>	1,17	8,14
<b>TSB + D4 (0,75%) + 10<sup>3</sup></b>	1,69	13,17
<b>TSB + D4 (1%) + 10<sup>7</sup></b>	1,283	4,87
<b>TSB + D4 (1%) + 10<sup>5</sup></b>	1,195	8,9
<b>TSB + D4 (1%) + 10<sup>3</sup></b>	1,115	14,23





Σχήμα 3.2.1: Καπνός C3 1%

Στο σχήμα 3.2.1 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και η δράση του υγρού καπνού C3 1%.

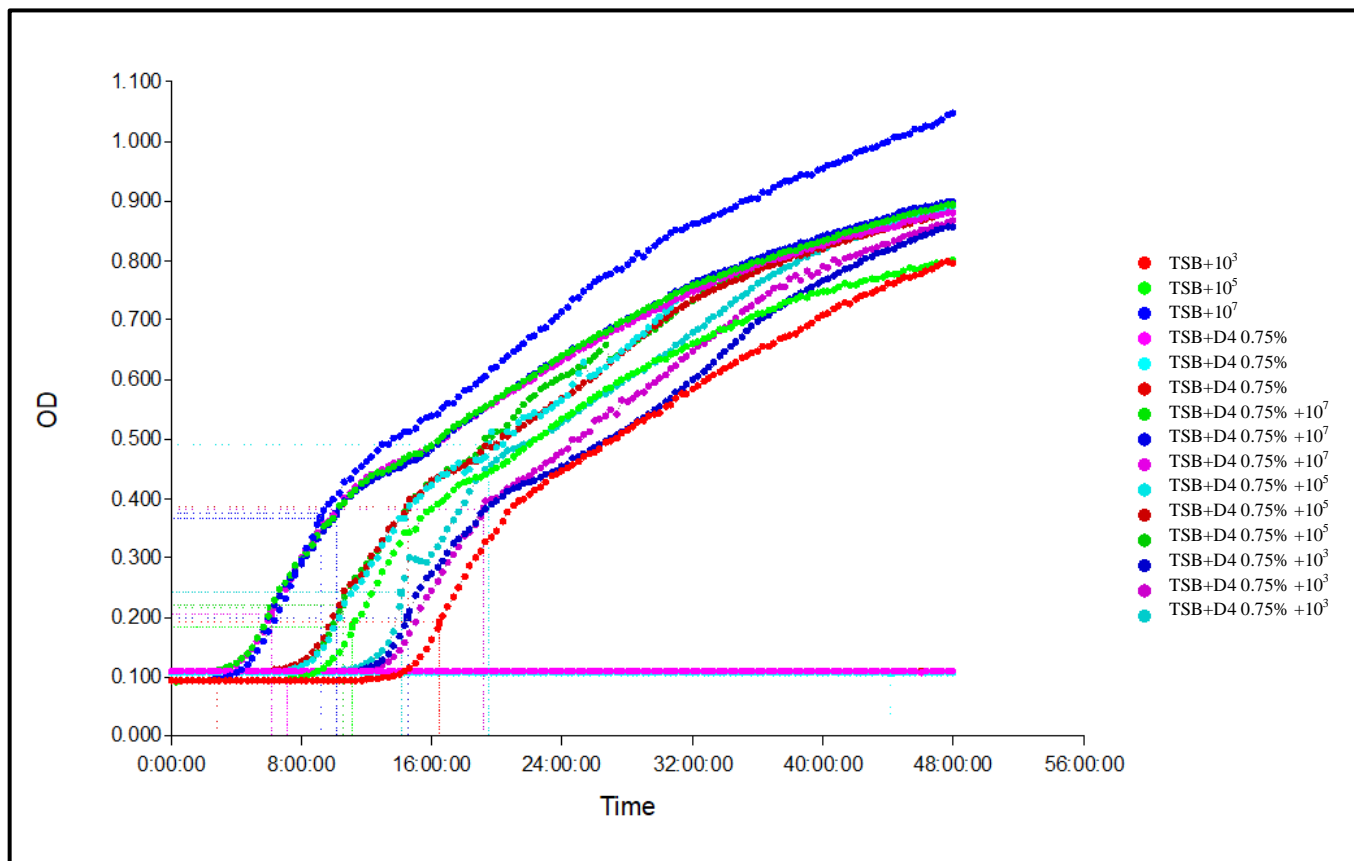
Αρχικά ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^7$ ) εμφανίζεται στην πρώτη καμπύλη χρώματος πράσινο σκούρο και διαπιστώνεται η επίδραση του υγρού καπνού διότι συγκριτικά με τις καμπύλες που δεν περιέχουν υγρό καπνό, η αύξηση του πληθυσμού καθυστέρησε. Ειδικότερα, η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού ξεκίνησε στις έξι (6) ώρες και σαράντα δύο (42) λεπτά.

Στη συνέχεια, η μικροβιακή συγκέντρωση ( $10^5$ ) εμφανίζεται στις ενδιάμεσες καμπύλες χρώματος μπλε σκούρο, ματζέντα και γαλάζιο και η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού ξεκινά στις δεκατέσσερις (14) ώρες και τριάντα ένα (31) λεπτά.

Τέλος, ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^3$ ) εμφανίζεται στις τελευταίες καμπύλες χρώματος πράσινο και κόκκινο σκούρο και ξεκινά στις είκοσι έξι (26) ώρες και δεκαεννέα (19) λεπτά.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

Παρατηρούμε ότι η επίδραση του καπνού C3 1% στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού όταν ο αρχικός πληθυσμός είναι  $10^3$  είναι σημαντική. Ο χρόνος προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού με την προσθήκη του καπνού αυξάνεται κατά έντεκα (11) ώρες.



Σχήμα 3.2.2: Καπνός D4 0.75%

Στο σχήμα 3.2.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και οι επιδράσεις του υγρού καπνού D4 0.75% στην αύξηση του.

Οι καμπύλες με μικροβιακό φορτίο ( $10^7$ ) χρώματος σκούρο μπλε, πράσινο και ματζέντα εμφανίζουν ταχεία ανάπτυξη και ειδικότερα στις πρώτες τέσσερις (4) ώρες και τριάντα εννέα (39) λεπτά.

Στη συνέχεια ακολουθούν οι καμπύλες με μικροβιακό φορτίο ( $10^5$ ) χρώματος γαλάζιο, σκούρο πράσινο και κόκκινο. Ο μικροβιακός αυτός πληθυσμός μαζί με τις επιδράσεις του καπνού ξεκινά την ανάπτυξή του στις οκτώ (8) ώρες και εννέα (9) λεπτά.

Τέλος, οι καμπύλες ανάπτυξης για τον μικροβιακό πληθυσμό ( $10^3$ ) εμφανίζονται με χρώμα μπλε σκούρο, ματζέντα και γαλάζιο. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ξεκινά

στις δεκατρείς (13) ώρες και δέκα (10) λεπτά και εμφανίζει σταθερή αυξητική τάση μέχρι και το τέλος του πειράματος (48h).

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

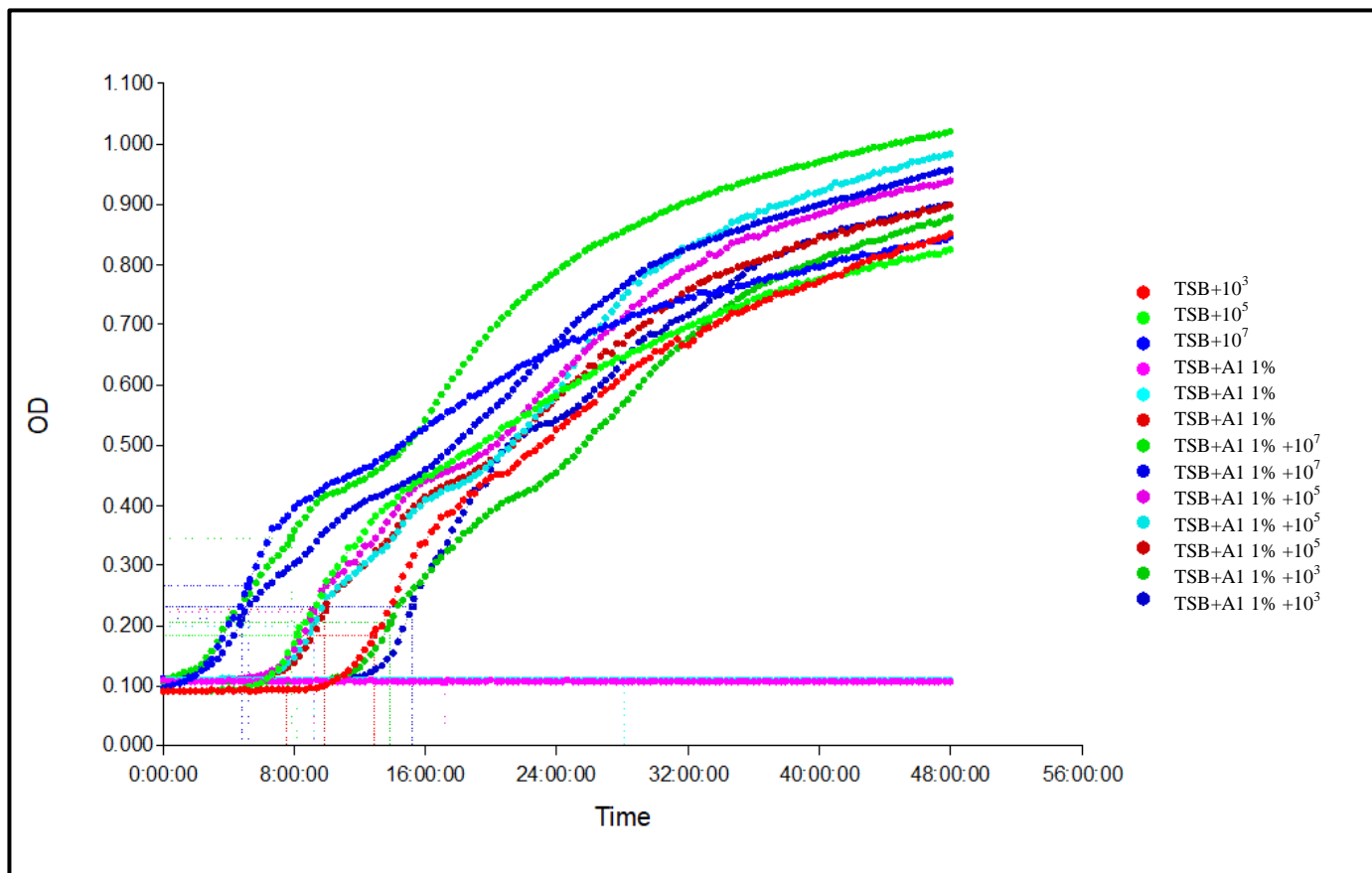
Παρατηρούμε ότι ο υγρός καπνός D4 σε συγκέντρωση 0,75% δεν ασκεί καμία επίδραση στην ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* CITY 844, ανεξαρτήτως του αρχικού πληθυσμού.

### 3.3 Αποτελέσματα τρίτου (3<sup>ου</sup>) Microplate

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

Πίνακας 3.3: Σύνοψη 3<sup>ου</sup> Microplate

Θέση microplate	$\mu_{\max}$	Lagtime (h)
<b>TSB + 10<sup>3</sup></b>	1,16	11,53
<b>TSB + 10<sup>5</sup></b>	1,325	6,98
<b>TSB + 10<sup>7</sup></b>	1,245	1,23
<b>TSB + A1 (0,6%) + 10<sup>7</sup></b>	1,155	2,08
<b>TSB + A1 (0,6%) + 10<sup>5</sup></b>	1,24	6,45
<b>TSB + A1 (0,6%) + 10<sup>3</sup></b>	1,02	12,87
<b>TSB + A1 (0,8%) + 10<sup>7</sup></b>	1,01	1,48
<b>TSB + A1 (0,8%) + 10<sup>5</sup></b>	1,63	7,81
<b>TSB + A1 (0,8%) + 10<sup>3</sup></b>	1,06	12,73
<b>TSB + A1 (1%) + 10<sup>7</sup></b>	1,12	2,39
<b>TSB + A1 (1%) + 10<sup>5</sup></b>	1,11	7,80
<b>TSB + A1 (1%) + 10<sup>3</sup></b>	1,20	12,97
<b>TSB + E5 (0,6%) + 10<sup>7</sup></b>	1,14	1,13
<b>TSB + E5 (0,6%) + 10<sup>5</sup></b>	1,13	6,33
<b>TSB + E5 (0,6%) + 10<sup>3</sup></b>	1,22	11,00
<b>TSB + E5 (0,9%) + 10<sup>7</sup></b>	1,29	1,07
<b>TSB + E5 (0,9%) + 10<sup>5</sup></b>	1,22	6,21
<b>TSB + E5 (0,9%) + 10<sup>3</sup></b>	1,64	10,68
<b>TSB + E5 (1,2%) + 10<sup>7</sup></b>	1,14	1,35
<b>TSB + E5 (1,2%) + 10<sup>5</sup></b>	2,37	6,58
<b>TSB + E5 (1,2%) + 10<sup>3</sup></b>	0,90	10,61



Σχήμα 3.3.1: Καπνός A1 1%

Στο σχήμα 3.3.1 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και οι επιδράσεις του υγρού καπνού A1 1% στην αύξηση του.

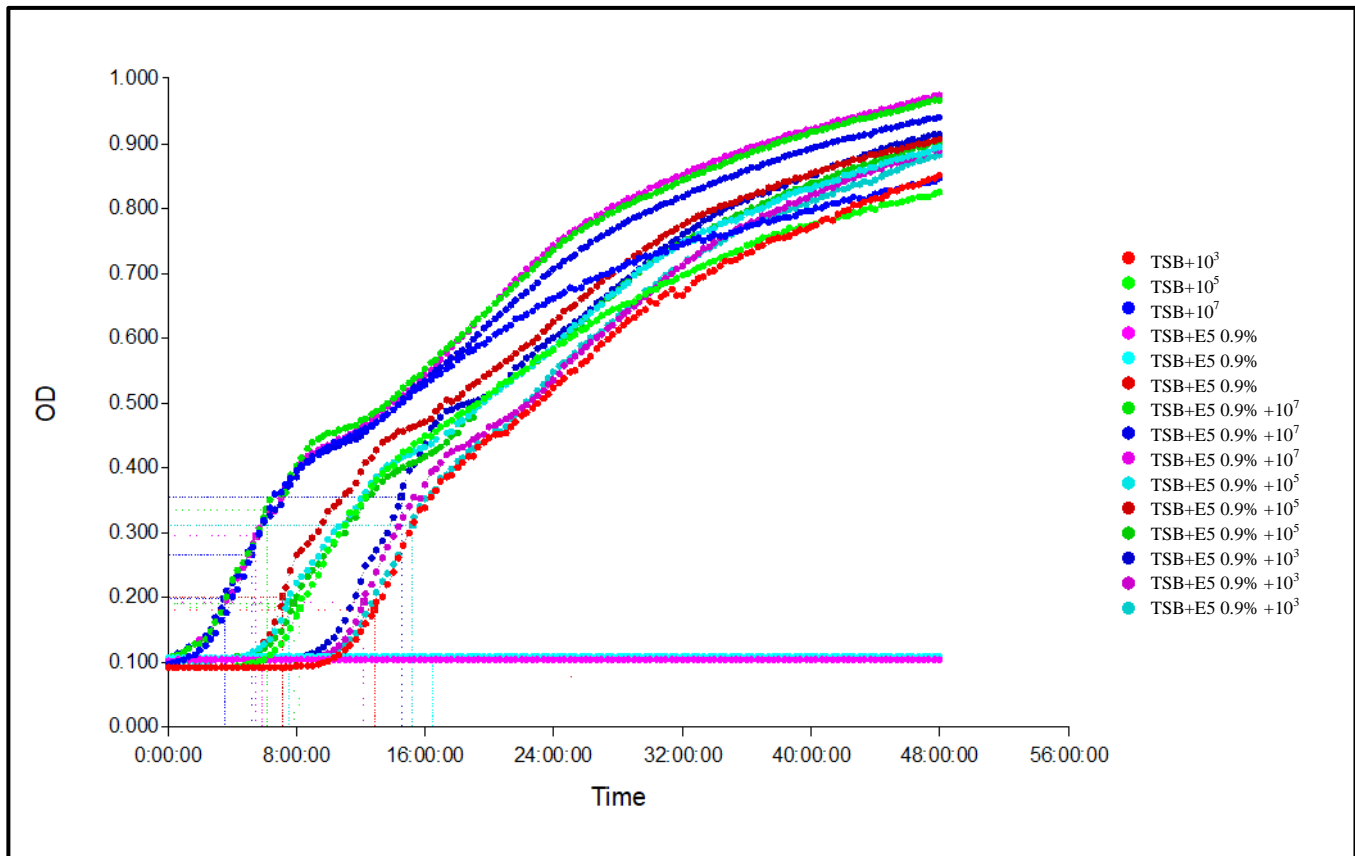
Αρχικά ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^7$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος σκούρο πράσινο και μπλε και παρότι έχει την ίδια έναρξη με την μέτρηση χωρίς επίδραση καπνού στο πέρας των καμπυλών, δεν φαίνεται να ασκεί επίδραση στην ανάπτυξη. Η ώρα έναρξης της ανάπτυξης σημειώνεται στις δύο (2) ώρες και είκοσι τρία (23) λεπτά.

Στη συνέχεια ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ( $10^5$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος ματζέντα, γαλάζιο και σκούρο κόκκινο και ξεκινάει την ανάπτυξή του στις επτά (7) ώρες και σαράντα οκτώ (48) λεπτά.

Τέλος, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ( $10^3$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος σκούρο πράσινο και μπλε και επηρεαζόμενος ελάχιστα από την επίδραση του καπνού ξεκινά την ανάπτυξή του στις δώδεκα (12) ώρες και πενήντα οκτώ (58) λεπτά.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

Παρατηρούμε ότι ο υγρός καπνός A1 σε συγκέντρωση 1% ασκεί ελάχιστη επίδραση στην ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* CITY 844, ανεξαρτήτως του αρχικού πληθυσμού.



Σχήμα 3.3.2: Καπνός E5 0.9%

Στο σχήμα 3.3.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και οι επιδράσεις του υγρού καπνού E5 0.9% στην αύξηση του.

Αρχικά ο μικροβιακός πληθυσμός ( $10^7$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος σκούρο πράσινο, μπλε και ματζέντα και η ώρα έναρξης της αύξησης του εντοπίζεται στην μία (1) ώρα και τέσσερα (4) λεπτά.

Στη συνέχεια ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ( $10^5$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος γαλάζιο, σκούρο πράσινο και κόκκινο και ξεκινάει την ανάπτυξή του στις έξι (6) ώρες και δεκατρία (13) λεπτά.



Τέλος, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ( $10^3$ ) εμφανίζεται με καμπύλες χρώματος σκούρο μπλε, γαλάζιο και ματζέντα και ξεκινά την ανάπτυξή του στις δέκα (10) ώρες και σαράντα (40) λεπτά.

Η οριζόντια συνεχόμενη γραμμή είναι οι μάρτυρες του πειράματος, οι οποίοι δεν έχουν εμβολιαστεί με κάποιον από τους πληθυσμούς του στελέχους *Y. enterocolitica* CITY 844 και για αυτόν τον λόγο δεν παρουσιάζουν καμπύλη ανάπτυξης.

Παρατηρούμε ότι ο υγρός καπνός E5 σε συγκέντρωση 0,9% δεν ασκεί επίδραση στην ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* CITY 844, ανεξαρτήτως του αρχικού πληθυσμού.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη προπτυχιακή εργασία έγινε διερεύνηση της επίδρασης έξι διαφορετικών καπνών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων – παραγωγής καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, έναντι της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* CITY 844, ο οποίος ευθύνεται σε υψηλό βαθμό για τροφικές δηλητηριάσεις από την κατανάλωση κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων, μολυσμένου νερού και ακατέργαστων προϊόντων κρέατος σε παγκόσμιο επίπεδο. Στα αλιεύματα συναντάται συχνότερα σε ωμά μύδια, στρείδια και γαρίδες αλλά και σε ιχθύες (Bottone E. 1997).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος και της χρήσης της μεθόδου οπτικής πυκνότητας της παρούσας εργασίας αποδείχθηκε ότι πράγματι ο καπνός επιδρά στην ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* με διαφορές ωστόσο στα διάφορα είδη καπνών. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να προκύπτουν λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης σε καρβονύλια και φαινολικές ουσίες στους καπνούς αυτούς, σύμφωνα με τη σύσταση που διατίθεται από την εταιρεία παρασκευής τους στην Ολλανδία

Οι Dien H.A. et al. (2019) αναφέρουν τον τρόπο με τον οποίο ο καπνός επιδρά στα βακτήρια, όπως είναι ο παθογόνος μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες συνιστούν τον καπνό καταστρέφουν τη δομή των βακτηριακών κυττάρων και αναστέλλουν την διαδικασία σχηματισμού του βακτηριακού τοιχώματος, με αυτόν τον τρόπο προκαλείται λύση του βακτηριακού κυτταρικού. Ο μηχανισμός δράσης των αντιβακτηριακών φαινολικών ενώσεων είναι ποικίλος και πολύπλοκος διότι εκτός από βλάβες στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, οι φαινολικές ενώσεις του καπνού

προκαλούν μετουσίωση των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης γεγονός που επιφέρει θανάτωση του βακτηριακού στελέχους. Οι Sikorski et al. (1995) αναφέρουν ότι οι καρβονυλικές ενώσεις ή καρβονύλια, όπως η φορμαλδεΐδη και η μεθυλογλυοξάλη, δρουν βακτηριοκτόνα. Ειδικότερα η φορμαλδεΐδη έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της βακτηριοστατικής ή βακτηριοκτόνου ιδιότητάς της σαφώς με γνώμονα την διασφάλιση της υγιεινής μέσω της χρήσης της. Η συγκέντρωσή της εξαρτάται από τη θερμοκρασία καύσης και το είδος του ξύλου.

Στην παρούσα μελέτη η αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* CITY 844 έγινε περισσότερο αντιληπτή από τον καπνό C3 0,1% στον μικροβιακό πληθυσμό  $10^3$  με τον χρόνο προσαρμογής στην καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού να αυξάνεται κατά έντεκα (11) ώρες.

Οι καπνοί L9 0,1%, G6 0.35%, D4 0,75%, A1 1% και E5 0,9% δεν εμφάνισαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με τον Bottone (1997) η υψηλότερη αντίσταση της *Y. enterocolitica* στα εκχυλίσματα καπνού προσαρμόζεται στην αναγνωρισμένη ικανότητα της να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες αποθήκευσης.

Η χρήση του υγρού καπνού μελετήθηκε και από τους Nithin et al. (2020) οι οποίοι παραδέχονται την σημαντικότητα και βολικότητα της χρήσης υγρών καπνών τόσο στα μειωμένα επίπεδα των κυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) όσο και στην διατήρηση της καλής ποιότητας γεύσης και οσμής καπνιστών προϊόντων. Οι γεύσεις των καπνών χαρακτηρίζονται ως GRAS (Generally Recognized as Safe), μερικά από τα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιπλέον εμπόδια για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης (Sunen E. et al. 2001).

Καθότι ο μικροοργανισμός *Y. enterocolitica* συναντάται σε πολλά οικοσυστήματα και έχει εντοπιστεί τόσο σε άγρια ψάρια και οστρακοειδή όσο και σε εκτροφής δημιουργεί μία ανησυχία για τον τρόπο εξάλειψής του από την βιομηχανία τροφίμων. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, ο καπνός C3 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα πολλά υποσχόμενο «όπλο» έναντι του παθογόνου αυτού. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται σχετικά με την επίδραση του καπνού αυτού σε περισσότερες συγκεντρώσεις.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης και αποτελεσματικότητας των υγρών καπνών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* στελέχους CITY 844. Μέσα από το πείραμα των Microplates, έξι (6) συνολικά υγροί καπνοί μελετήθηκαν για την αποτελεσματικότητα που κατάφεραν στην καθυστέρηση ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Y. enterocolitica* στελέχους CITY 844.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πιο δραστικός καπνός έναντι του *Y. enterocolitica* στελέχους CITY 844 ήταν ο C3 σε συγκέντρωση 1% και πιο συγκεκριμένα στον πληθυσμό  $10^3$  διαπιστώνεται σημαντική διαφορά. Ο πληθυσμός αυτός ( $10^3$ ) είναι πιθανό να ανταποκρίνεται σε πραγματικές συνθήκες από ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί  $10^5$  και  $10^7$ . Οι πληθυσμοί αυτοί είναι αρκετά υψηλοί και τους δεχόμαστε για την πραγματοποίηση του πειράματος. Η επίδραση του καπνού C3 στον πληθυσμό  $10^3$  είναι ένα σημαντικό πόρισμα διότι είναι πιο ρεαλιστική η εμφάνιση μικρών συγκεντρώσεων μικροβιακών πληθυσμών σε αλιεύματα στην πραγματική ζωή.

Οι υπόλοιποι καπνοί δεν άσκησαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην αύξηση της *Y. enterocolitica* στελέχους CITY 844 με συνέπεια η δραστικότητά τους να μην είναι παρατηρήσιμη.

Επιπλέον, οι επιδράσεις των καπνών μελετήθηκαν μέσω του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και του χρόνου προσαρμογής (Lagtime) των πληθυσμών. Αυτές οι δύο παράμετροι επέτρεψαν την ασφαλή εξαγωγή των αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη Βιβλιογραφία

- Adams M.R., Moss M.O. (1995) Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- Ashie I.N., Smith J.P., Simpson B.K. (1996) Spoilage and Self-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1–2): 87–121.
- Augustin J.C., Rosso L., Carlier V. (1999) Estimation of storage temperature growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 38, 137–146.
- Belichovska K., Belichovska D., Pejkovski Z. (2019) Smoke and Smoked Fish Production, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, *Meat Technology* 60 (1), 37–43.
- Bottone E.J. (1997) *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 257-276.
- Breand S., Fardel G., Flandois J.P., Rosso L., Tomassone R., (1997) A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 157–167.
- Brown M.H., Booth I.R. (1991) Acidulants and pH. In: Russell N J, Gould G W. editors. *Food preservatives*. Glasgow, United Kingdom: Blackie Academic pp. 22–43.
- Chen Y., Ross W.H., Scott V.N., Gombas D.E., (2003) *Listeria monocytogenes*: Low Levels Equal Low Risk. *J. Food Prot.*, 66: 570-577.
- Dalgaard P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 319- 333.
- Dalgaard P., Jørgensen L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 105-115.
- Dalgaard P., Jørgensen, L.V. (2003) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*.
- Dalgaard P., Koutsoumanis K. (2001) Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. Elsevier Science B.V., *Journal of Microbiological Methods*, 43:183–196.
- Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas G.J.E., Kirby R.M (2001) Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 12: 67-71.
- Dien H.A., Montolalu R.I., Berhimpon S. (2019) Liquid smoke inhibits growth of pathogenic and histamine forming bacteria on skipjack fillets, IOP Publishing

Conference Series: Earth and Environmental Science, Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University Manado, Manado, Indonesia.

Donn, R.W., (2001) Processing parameters needed to control pathogens in cold-smoked fish, Chapter I Description of the situation. J. Food Sci., 66 (7): 1067-1071.

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

Economou V, Gousia P, Kansouzidou A, Sakkas H, Karanis P, Papadopoulou C. (2013) Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters 89 within an agricultural landscape. Int J Hyg Environ Health 216(4), 435-444.

Eklund, M.W. (1992) Control in fishery products. In: *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. Hauschild, A. H. W., and Dodds, K. I., eds., Marcel Dekker Inc., New York, 209-232.

Ericsson I.L., Eklow A., Danielsson-Tham M.L., Loncarevic S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. Journal of Clinical Microbiology, 35: 2904-2907.

Gimenez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology, 96: 96-109.

Goulas, A.E., Kontominas, M.G. (2004) Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry (in press).

Gram L. (1992) Evaluation of the bacteriological quality of seafood. International Journal of Food Microbiology, 16:25-39.

Gram L., Dalgaard P. (2002) Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology, 13:262–266.

Gram, L., Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 33, 121–137.

Hao Y-Y, Brackett R.B., Doyle P. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. J. Food Protect. 61: 307-312

Harbell S., (1988) Controlling seafood spoilage. In: Seafood Retailing Series, Washington Sea Grant, Seattle, pp. 1–7

Hielm, S., E. Hyytiä, A. Andersin, H. Korkeala (1998) A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. J. Appl. Microbiol., 84: 133-137.

- Horner W F A. (1997) Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: Fish Processing Technology, Hall, G.M. 2nd Editions. Blackie Academic and Professional, London, p. 62- 72.
- Huis in't Veld, Jos.H.J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1): 1-18.
- Huss H.H. (1980) Distribution of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(4): 764–769.
- Jay J.M., Loessner M.J, Golden D.A.(2005). *Modern Food Microbiology*, 7th ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jensen M., Schulz E. (1980) Jernagars anvendelse til friskhedsbestemmelse af fersk risk. *Dansk Vet. Tidsskr.* 63, 8, 154/4, 314-318.
- Joffraud J.J., Cardinal M., Cornet J., Chasles J.S., Léon S., Gigout F., Leroi F.( 2006) Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112:51– 61.
- Levin, R.E. (1968) Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. *Appl. Microbiol.* 16, 1734-1737.
- Lin H., Jiang J., Li D. (2008) Potential Hazards in Smoke-Flavored Fish, *Journal of Ocean University of China*, Vol.7, No.3, pp.294-298.
- Maga A. Joseph. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press
- Muratore G., Licciardello F. (2005) Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf-life of Liquid-smoked Swordfish (*Xiphias gladius*) Slices. *Journal of Food Science*, 70 (5): 359-363.
- Nithin C.T., Joshy C.G., Chatterjee Niladri Sekhar, Panda Satyen Kumar, Yathavamoorthi R., Ananthanarayanan T.R., Mathew Suseela, Bindu J., Gopal T.K.S. (2020) Liquid smoking - A safe and convenient alternative for traditional fish smoked products. *Food Control*, Elsevier Ltd.
- Shewan J.M. (1977) The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. *Proceedings of the Conference on "Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish"*. pp. 51-66.
- Sikorski Z. E., Gilberg A., Ruiter A. (1995) Fish Products. In A. Ruiter (Ed.), *Fish and fishery products, Composition, nutritive properties and stability*. CAB International, Wallingford, UK
- Southcott B. A., Razzell W. E. (1973) *Clostridium botulinum* control in cold-smoked salmon: a review. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 30 (5): 631-641.
- Stephens P.J., Joynson J.A., Davies K.W., Holbrook R., Lappin-Scott H.M., Humphrey T.J., (1997) The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured Salmonella cells. *J. Appl. Bacteriol.* 83, 445–455.



Sunen E., Fernandez-Galian B., Aristimuno C. (2001) Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Food Microbiology*, Academic Press, 18: 387-393

Van Spreekens K.J.A. (1974) The suitability of modification of Long and Hammer's medium for enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Antonie Leeuwenhoek*.

Van Spreekens K.J.A. (1977) Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 43: 283-303.

Yanbo W., Wangang Z., Linglin F. (2017) *Food Spoilage Microorganisms*. CRC Press. Chapter 7: Spoilage Microorganisms in Seafood Products.

### Ελληνική Βιβλιογραφία

Αναγνωστόπουλος Δ. (2015) Εμπορικός χρόνος ζωής, μικροβιολογικές, χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές κατά τη συντήρηση του καβουριού *Callinectes sapidus* στους 10 °C, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Προπτυχιακή Διατριβή, σελ. 16-19.

Καρρά Φ. (2019) Μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις- βιογενείς αμίνες κατά τη συντήρηση του μαριναρισμένου γαύρου. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 31-32.

Κοντοτόλης Σ. (2016) Αλλοιωγόνους και Παθογόνους μικροοργανισμούς στα δίθυρα μαλάκια. Προπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 25-30, 33-35.

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

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

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

Χριστοδούλου Χ.Ε. (2013) Αλληλεπίδραση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύων και του παθογόνου *Yersinia enterocolitica* σε φιλέτο τσιπούρας και μοντέλο υπόστρωμα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Προπτυχιακή Διατριβή, σελ. 6.

Eclass Πανεπιστήμιο Πατρών. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών σελ 21.

<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO297/No%20%20Φωτομετρικό%20προσδιορισμός%20πρωτεϊνών.pdf>

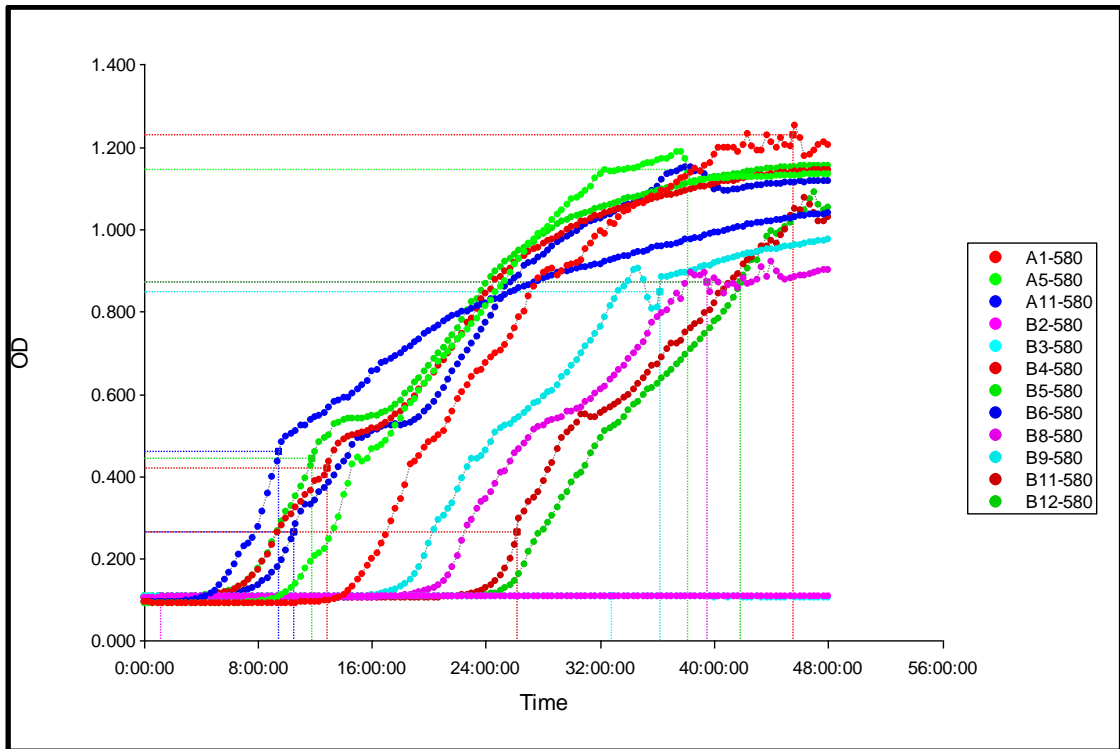
(Πρόσβαση: 14-07-2020)

## ABSTRACT

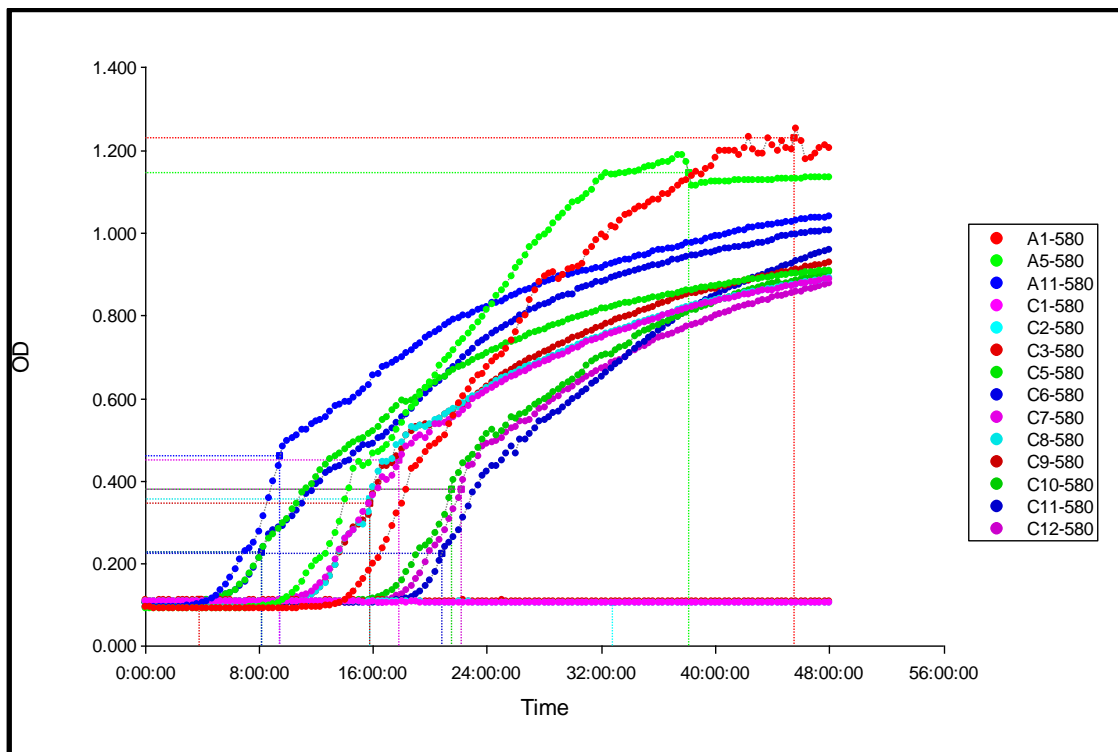
The aim of this study is to investigate and elaborate the impact and effectiveness of liquid smokes, which are used to food industry – production of smoked seafood products against the pathogen microorganism *Yersinia enterocolitica* CITY 844. More specific the experiment conducted by the Optical Density Method or Absorbance Method. In this experiment, six (6) liquid smokes, named as L9, G6, C3, D4, A1 and E5, have been analysed in order to find which of them had the most efficient action against the microorganism *Y. enterocolitica* CITY 844. The six (6) different liquid smokes were and each of them had different concentrations. Each liquid smoke was studied in three (3) different increasing concentrations for different microbial spoilage population  $10^3$ ,  $10^5$  και  $10^7$  CFU. The experiment was continued with the filling of the microplates under aseptic conditions. The samples were stored for forty eight (48) hours in Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader and they displayed that smoke C3 at a concentration of 0.1% had an effect against the pathogen microorganism in the microbial population  $10^3$ , since the adaptation time to the growth curve of the microorganism was increased approximately eleven (11) hours. Based on the results of the present study, smoke C3 could be described as a promising "weapon" against *Y. enterocolitica* CITY 844.

**Keywords:** smoke, liquid smoke, *Yersinia enterocolitica*, optical density

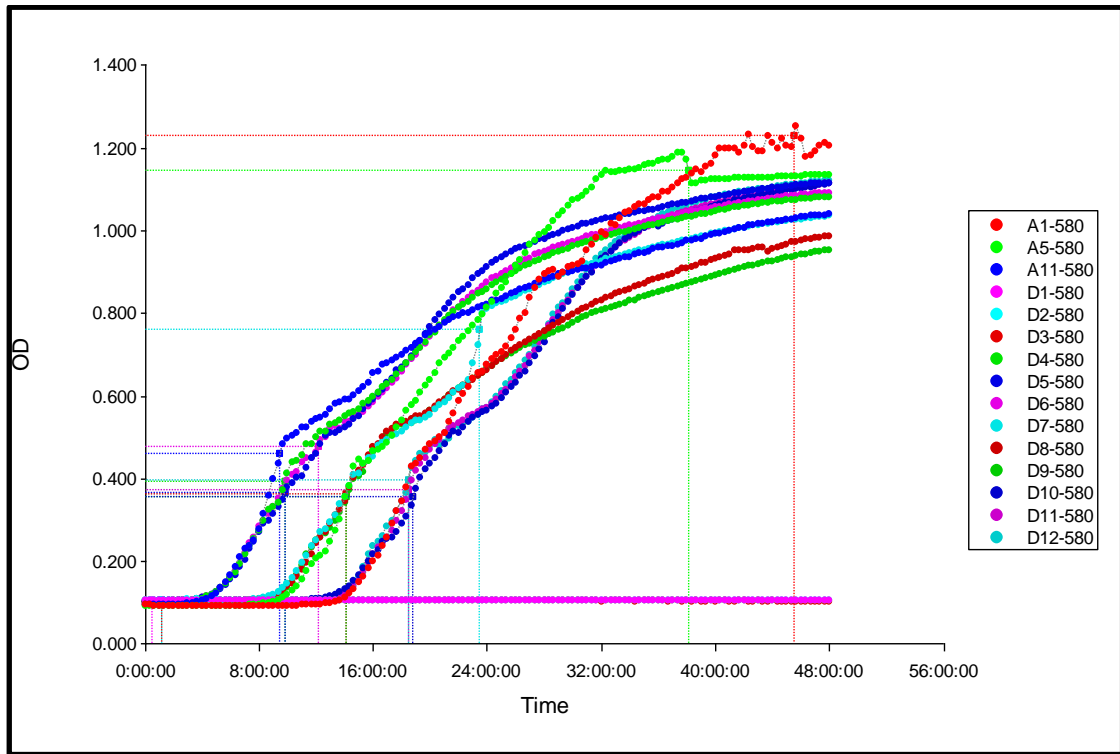
# Παράρτημα



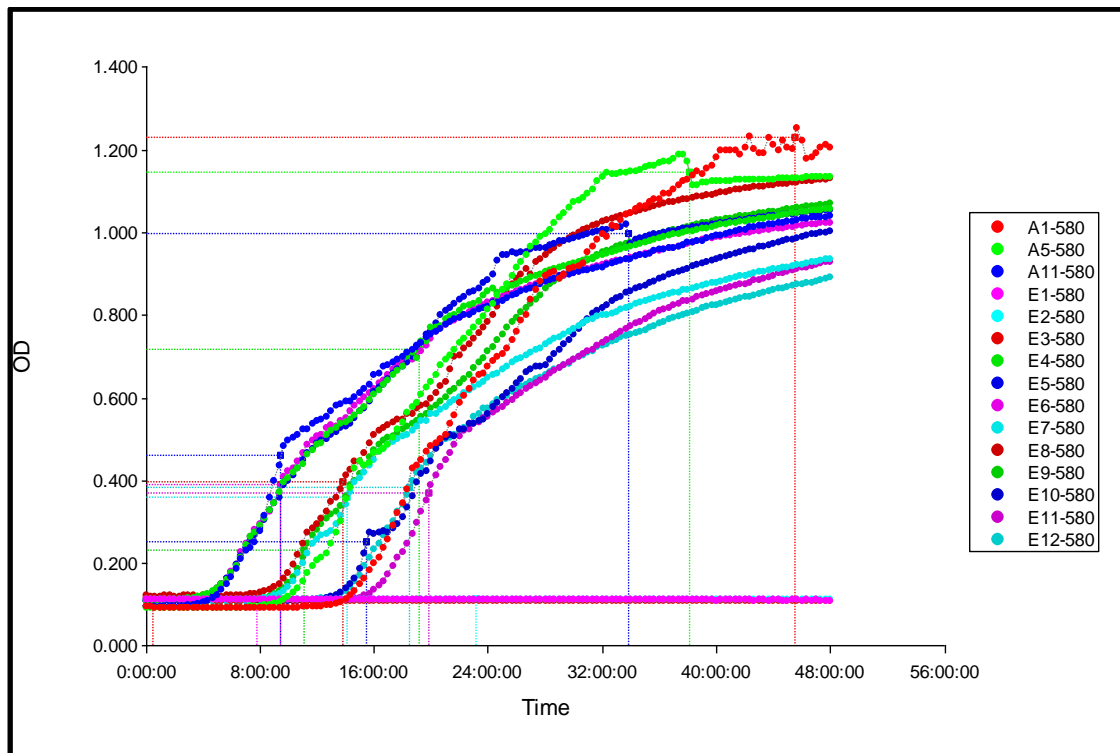
Εικόνα 8.1: L9 0.05%



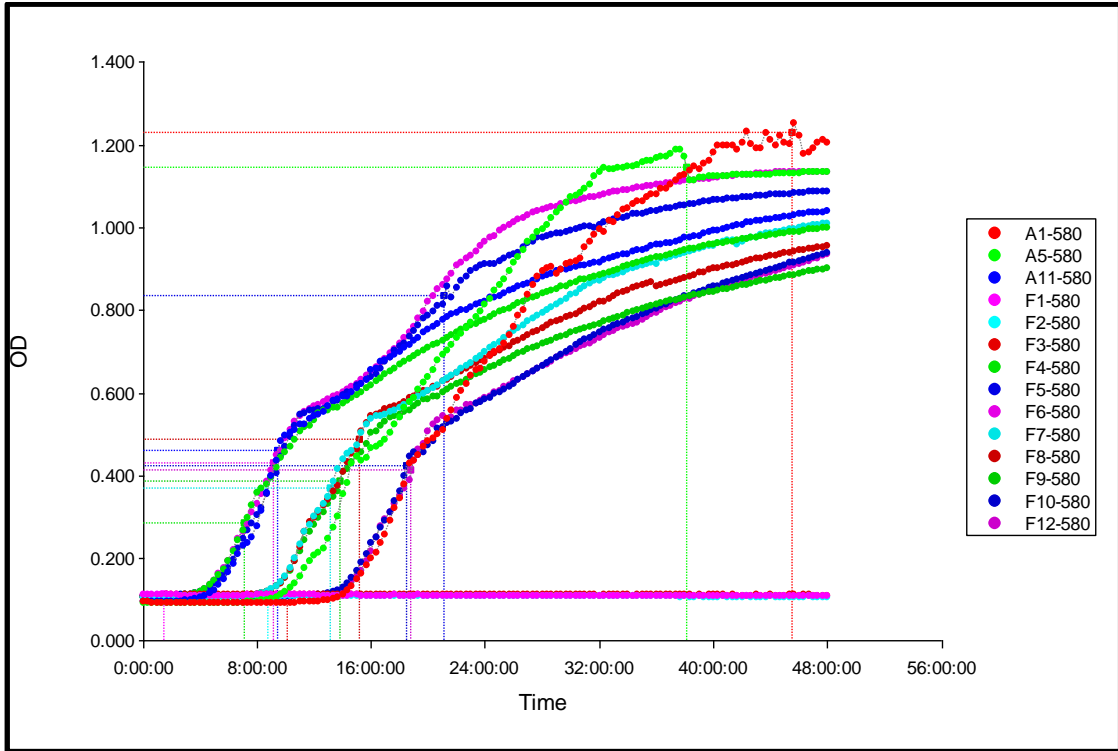
Εικόνα 8.2: L9 0.1%



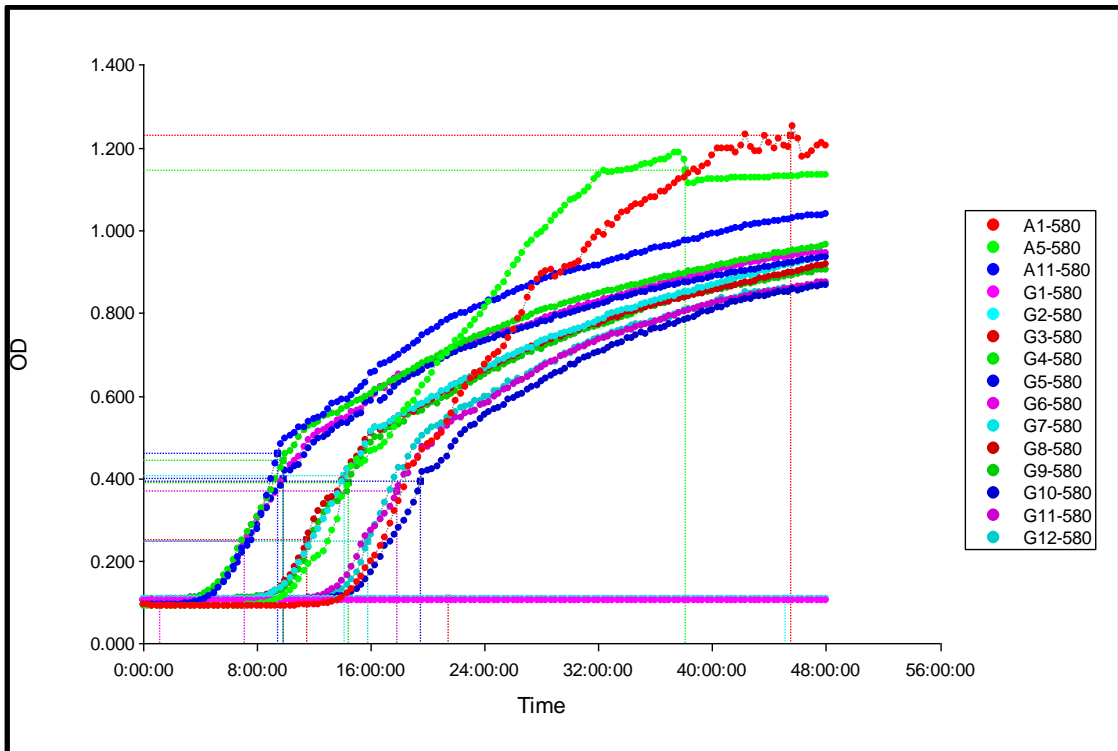
Εικόνα 8.3: L9 0.15%



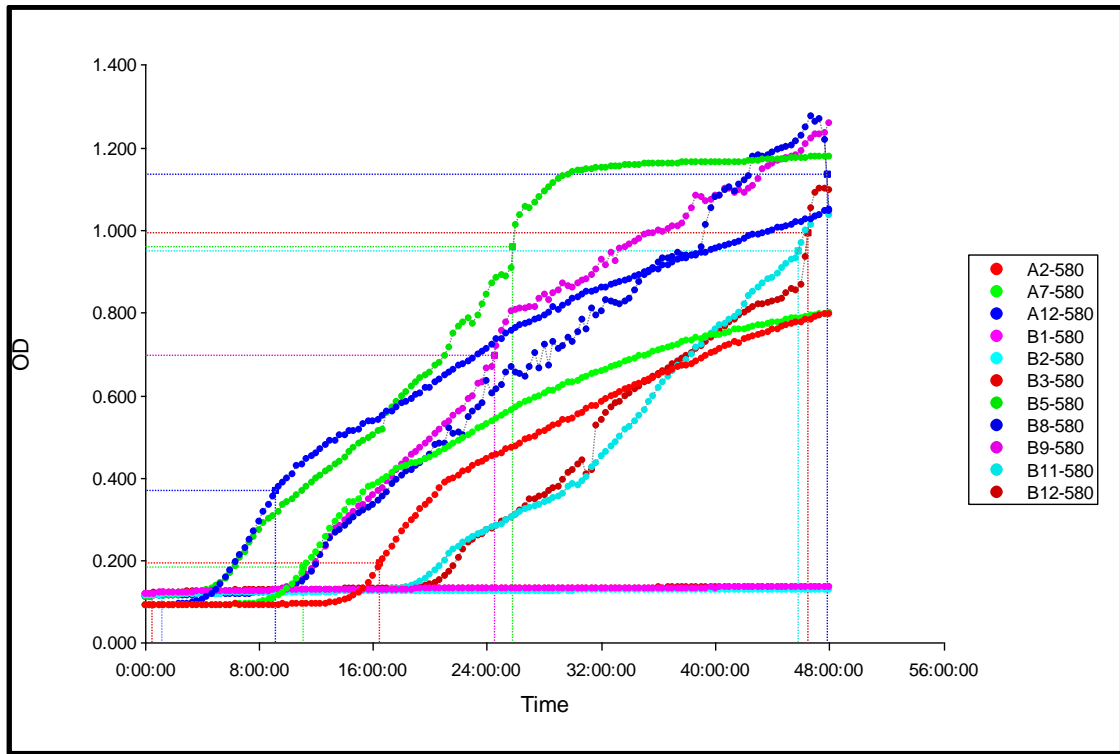
Εικόνα 8.4: G6 0.1%



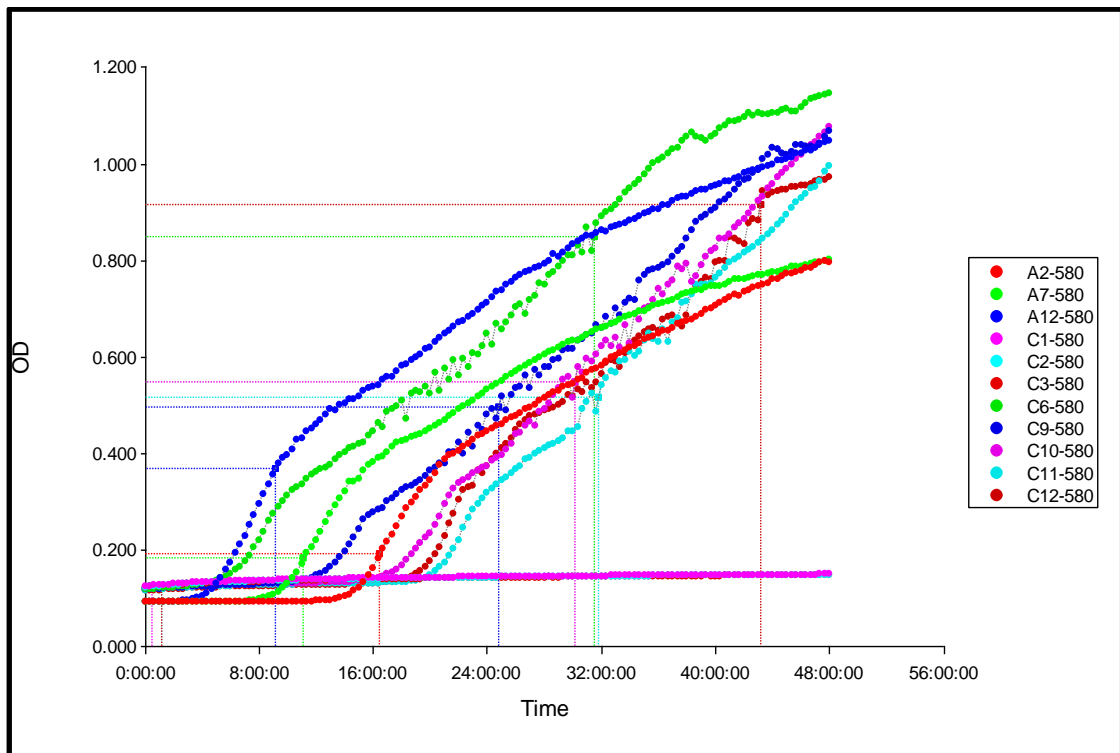
Εικόνα 8.5: G6 0.2%



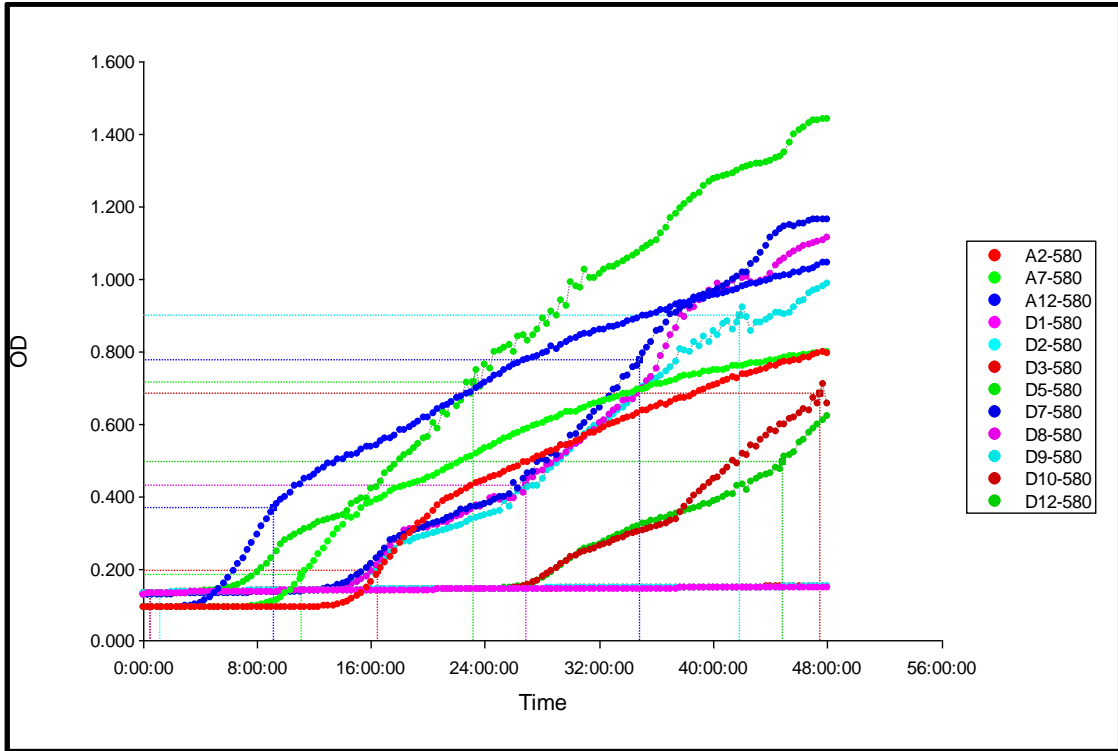
Εικόνα 8.6: G6 0.35%



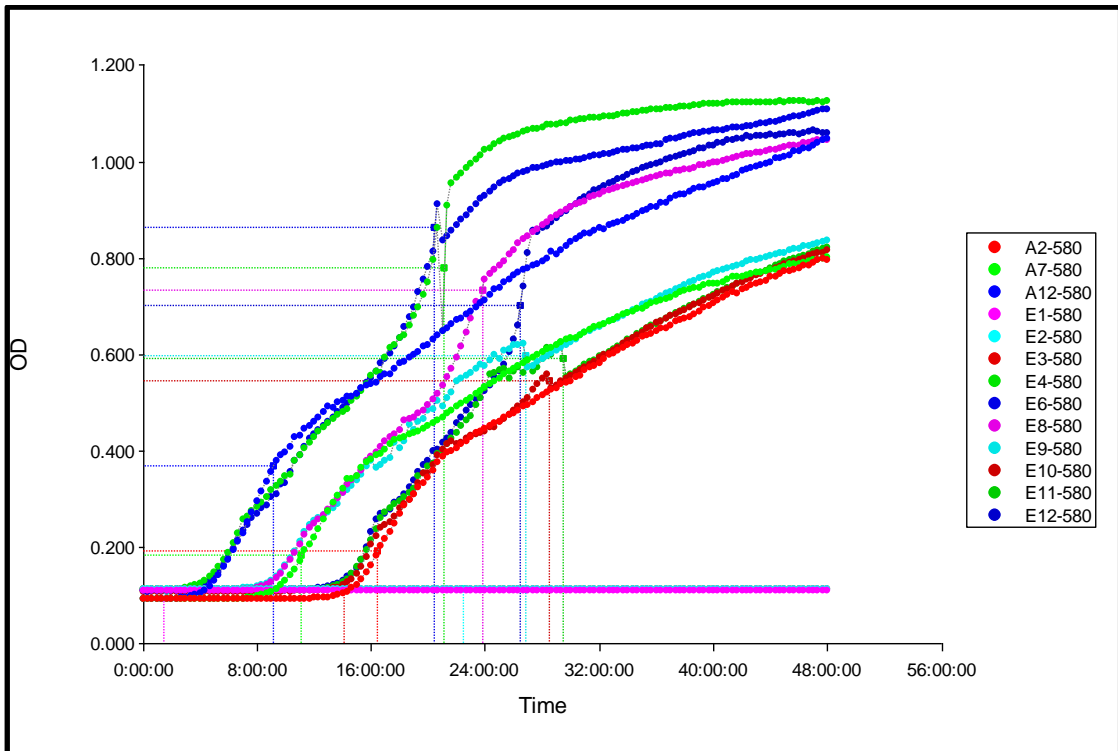
Εικόνα 8.7: C3 0.5%



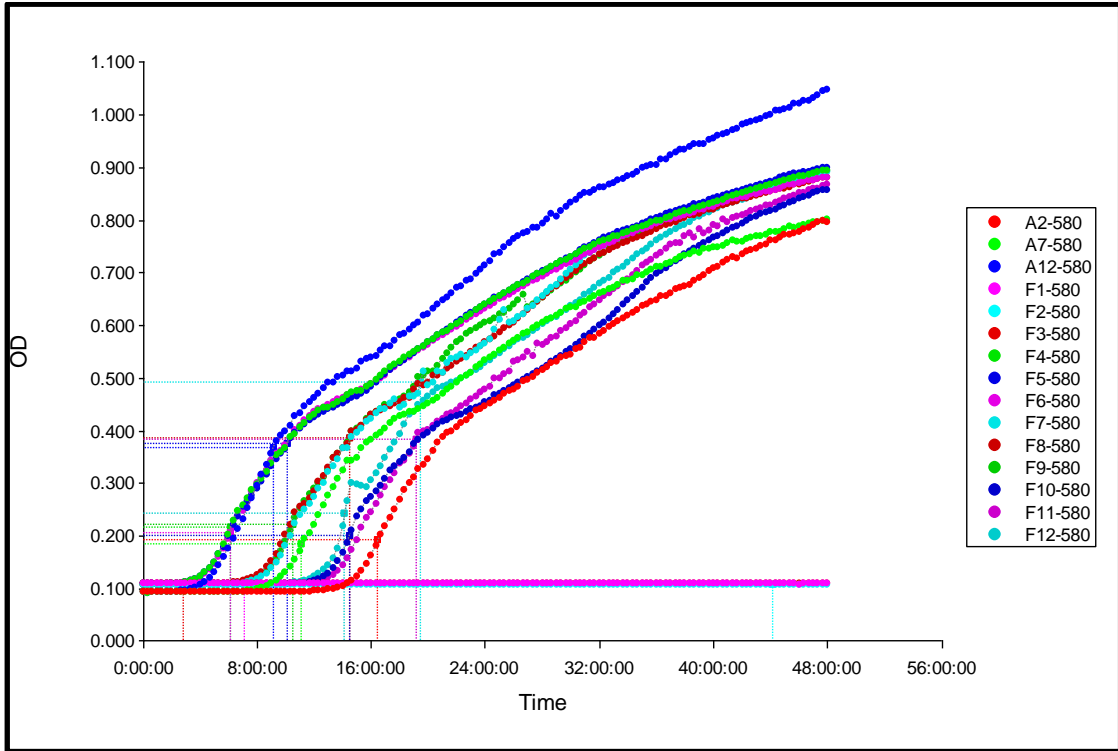
Εικόνα 8.8: C3 0.75%



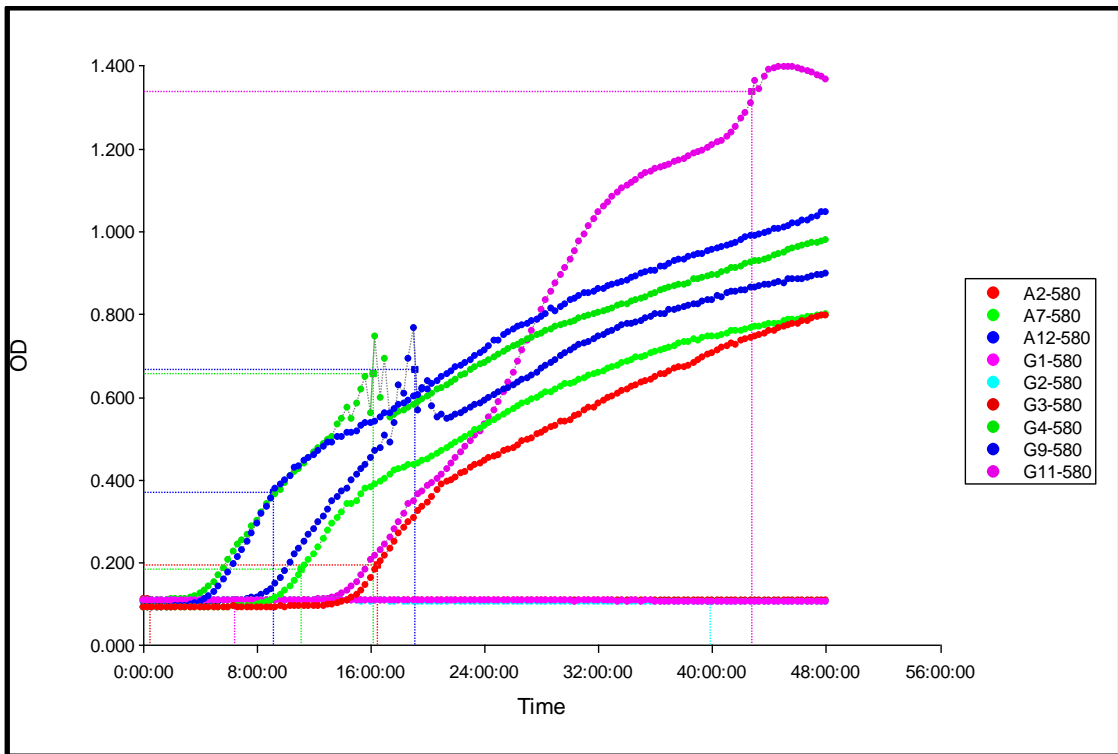
Εικόνα 8.9: C3 1%



Εικόνα 8.10: D4 0.5%

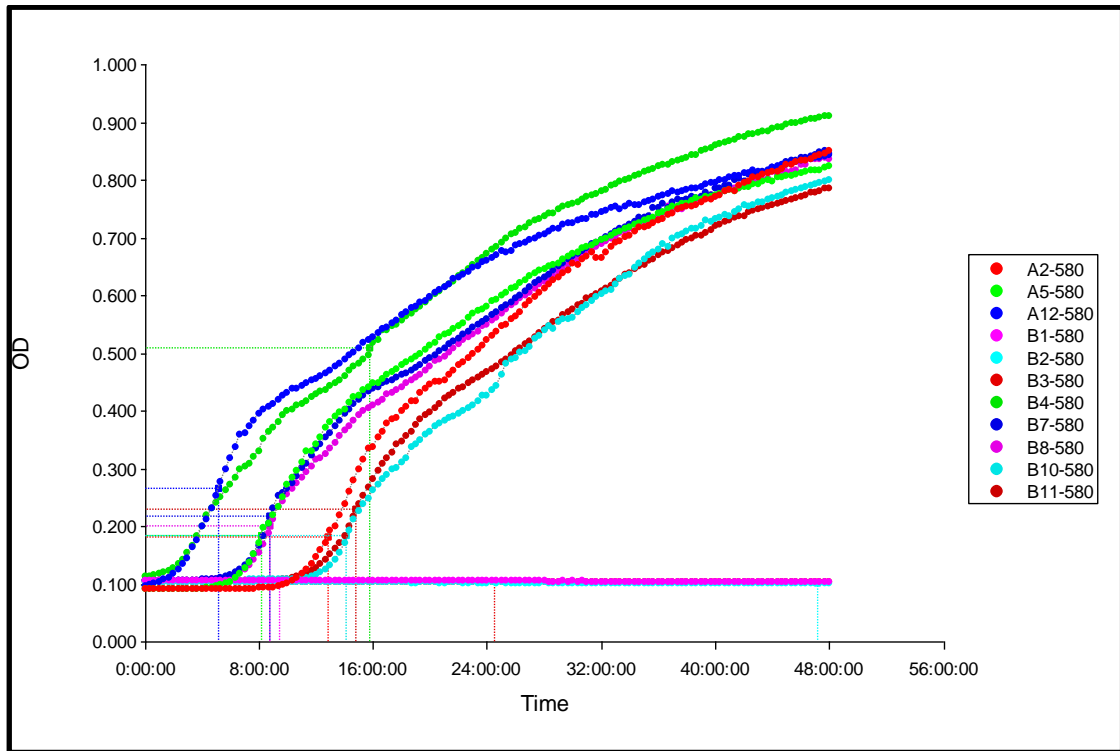


Εικόνα 8.11 D4 0.75%

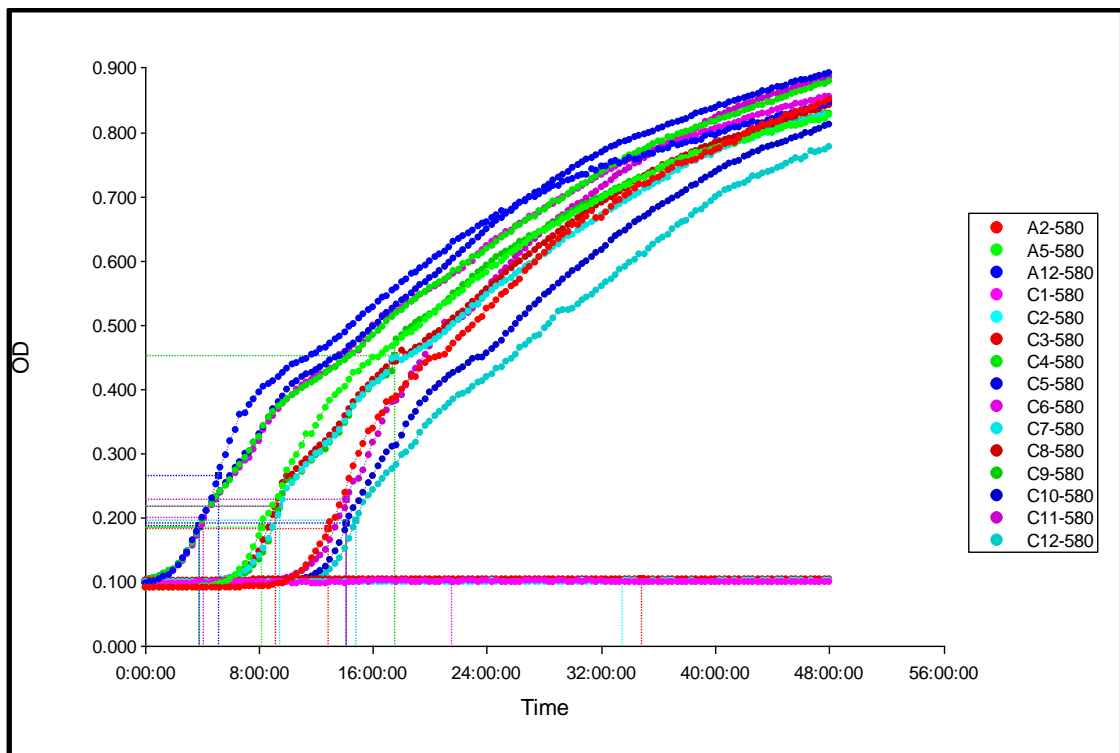


Εικόνα 8.12: D4 1%

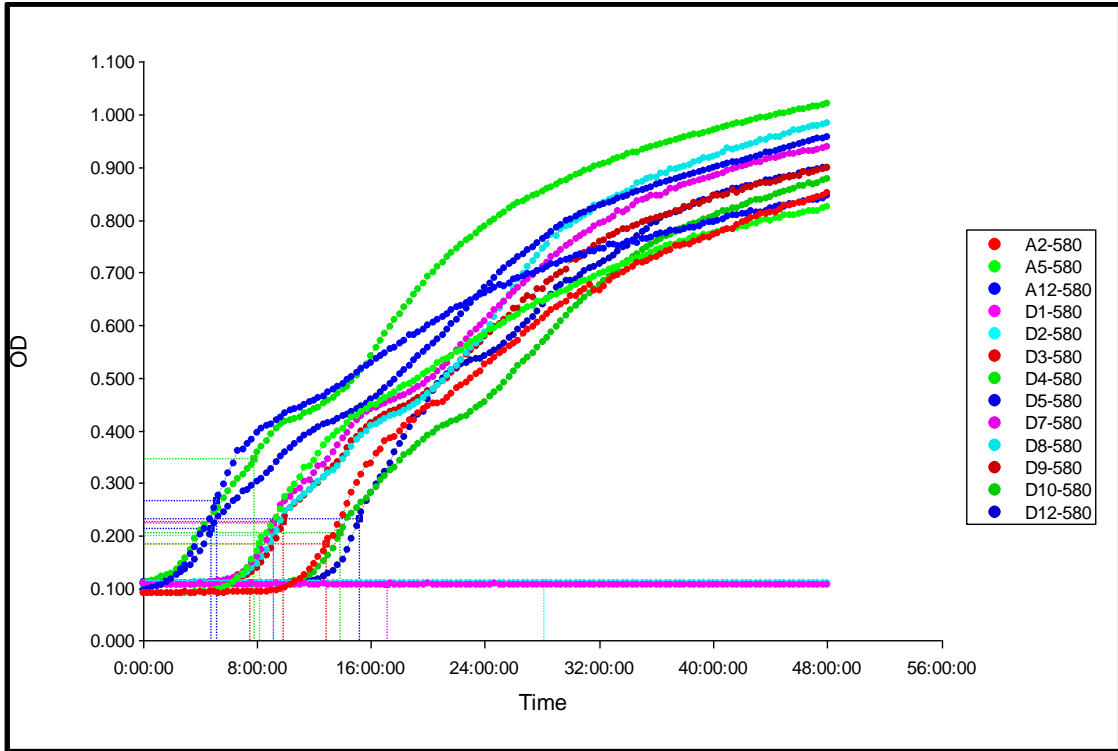




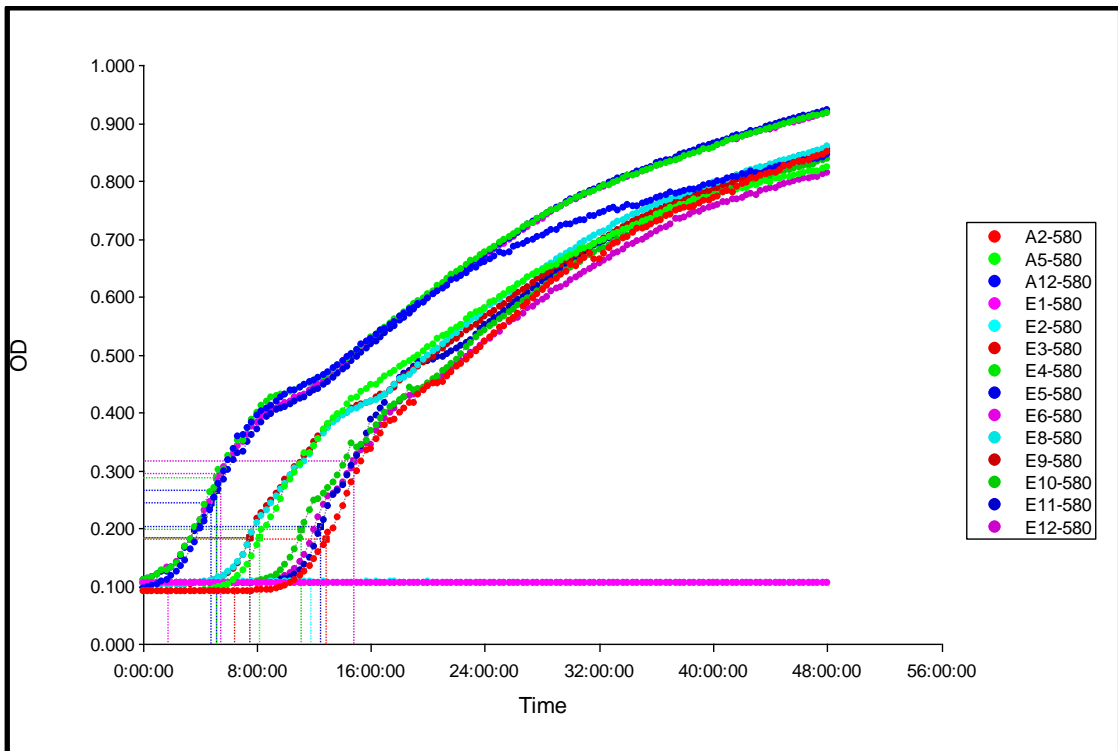
Εικόνα 8.11: A1 0.6%



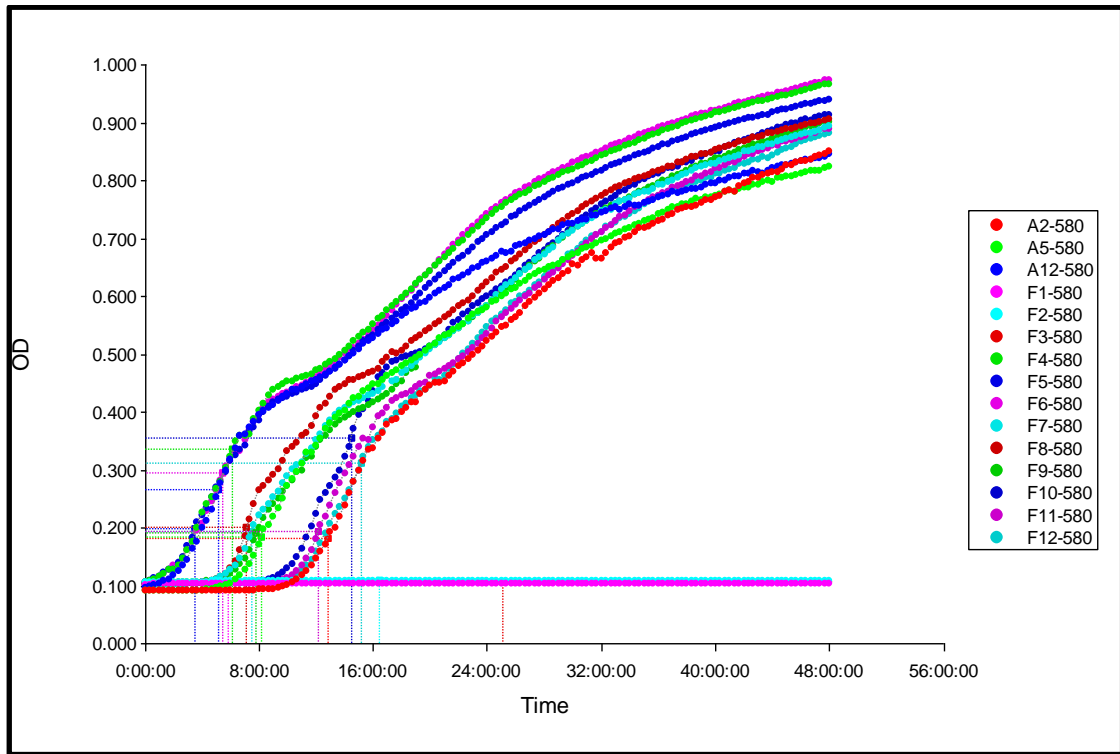
Εικόνα 8.12: A1 0.8%



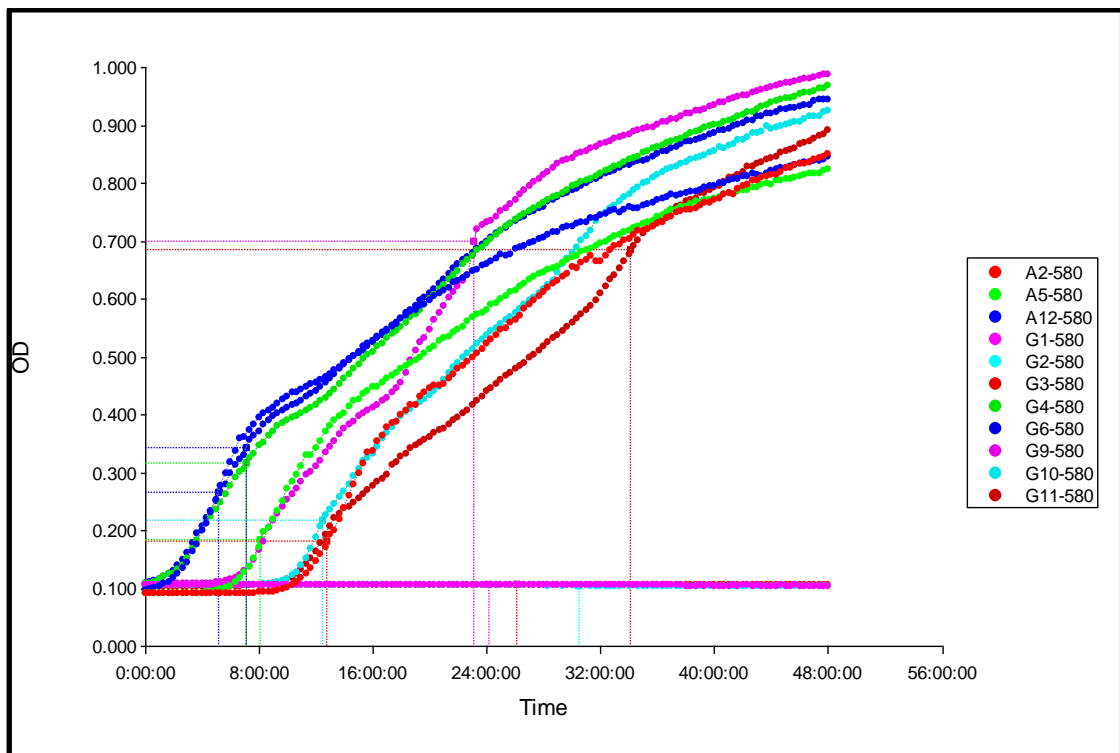
Εικόνα 8.13: A1 1%



Εικόνα 8.14: E5 0.6%



Εικόνα 8.15: E5 0.9%



Εικόνα 8.16: E5 1.2%