



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ
ΚΡΙΤΑΜΟΥ (*Crithmum maritimum*) ΕΝΑΝΤΙ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Γεώργιος Αργυροκαστρίτης

ΒΟΛΟΣ 2019

«Αντιμικροβιακή δράση αιθερίου ελαίου κριτάμου (*Crithmum maritimum*) έναντι τροφιμογενών παθογόνων»

Antimicrobial activity of *Crithmum maritimum* essential oil against food-borne pathogen)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής, Παν/μίου Θεσσαλίας. *Μέλος*
- 3) **Κωνσταντίνος Κορμάς**, Καθηγητής, Παν/μίου Θεσσαλίας. *Μέλος*

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με τον έναν ή τον άλλο τρόπο συνετέλεσαν και με βοήθησαν στο να ολοκληρώσω τη μελέτη μου αυτή. Πρωτίστως λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που μου στέκεται αρωγός σε οποιαδήποτε κίνηση ή απόφασή μου με οποιοδήποτε ψυχολογικό ή οικονομικό κόστος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου που ήταν στο πλευρό μου όλα αυτά τα χρόνια της φοίτησης μου στο Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ιδιαίτερα θέλω να, ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα της εργασίας μου κ. Ιωάννη Μποζιάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή στο γνωστικό αντικείμενο ‘Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών’ που με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα για την πτυχιακή μου μελέτη καθώς και για την αμέριστη βοήθειά του στην εκπόνησή της. Επίσης, ευχαριστώ τους καθηγητές μου τους κυρίους Δ. Βαφείδη και Κ. Κορμά που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως μέλη στην εξεταστική επιτροπή της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και τους κ. Παρλαπάνη Φωτεινή μεταπτυχιακή υπότροφο και τον Σωτήρη Οικονόμου υποψήφιο διδάκτορα, για την έμπρακτη βοήθειά τους στις εργαστηριακές αναλύσεις και στη δημιουργία της τελικής μορφής του κειμένου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου κριτάμου (*Crithmum maritimum*) σε μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα. Το αιθέριο έλαιο κριτάμου χρησιμοποιήθηκε ως φυσικό αντιμικροβιακό. Η χρήση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών από φυτά, όπως τα αιθέρια έλαια, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αντιμικροβιακής αλλά και της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Για το σκοπό της εργασίας, έγινε συλλογή επαρκούς ποσότητας φυτών κριτάμου με το χέρι τα οποία αποξηράνθηκαν σε θάλαμο ξήρανσης, προσδιορίστηκε το ξηρό τους βάρος, απομακρύνθηκαν οι βλαστοί, θρυμματίστηκαν τα φύλλα τους και ελήφθησαν τρία δείγματα από το εναπομείναν υλικό, στα οποία προστέθηκε απιονισμένο νερό. Ακολούθησε απόσταξη των δειγμάτων σε συσκευή Clevenger και ελήφθη το απόσταγμα. Κατόπιν απομονώθηκαν 15 στελέχη παθογόνων και έγινε εμβολιασμός με αυτά σε τρυβλία με άγαρ, μετά από αραίωση του διαλύματος. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης των αιθέριων ελαίων του κριτάμου στους παθογόνους μικροοργανισμούς ήταν η μέθοδος διάχυσης με χρήση δίσκου σε άγαρ. Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε σε δύο επαναλήψεις. Δίσκοι διηθητικού χαρτιού εμποτισμένοι με το αιθέριο έλαιο τοποθετήθηκαν σε 2 σημεία του κάθε τρυβλίου και κατόπιν τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης για 3 - 5 μέρες. Αφού αφέθηκαν για επώαση επί 3 μέρες, διαπιστώθηκε αν δημιουργήθηκαν ή όχι ζώνες αναστολής για τα ελεγχόμενα παθογόνα γύρω από κάθε δίσκο χαρτιού που περιείχε το εθαίριο έλαιο και στην περίπτωση δημιουργίας ζώνης αναστολής, μετρήθηκε η διάμετρος της. Ακολούθησε και 2η παρατήρηση 2 μέρες μετά. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν μόνο για τα βακτηριακά παθογόνα που ήταν Gram+.

Λέξεις κλειδιά: Αιθέρια έλαια φυτών, αντιμικροβιακή δράση, τροφιμογενή παθογόνα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ασφάλεια τροφίμων – παθογόνοι μικροοργανισμοί –Δημόσια Υγεία	8
1.2 Φυσικά αντιμικροβιακά	13
1.3 Ουσίες που προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον και κυρίως	
από θαλάσσια φυτά	16
1.3.1. Θαλάσσια λειτουργικά συστατικά και πηγές τους	20
1.3.2. Λειτουργικά τρόφιμα που ενσωματώνουν θαλάσσια συστατικά	25
1.4 Σκοπός της μελέτης	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
ABSTRACT	56

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αντικείμενο της μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου κριτάμου (*Crithmum maritimum*) σε μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ασφάλεια τροφίμων – Παθογόνοι Μικροοργανισμοί – Δημόσια Υγεία

Τρόφιμο είναι οποιοδήποτε προϊόν καταναλώνουμε προκειμένου να μας προσφέρει ενέργεια και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού μας. Κάθε δραστηριότητα που περιλαμβάνει το χειρισμό τέτοιων προϊόντων θα πρέπει να γίνεται με εφαρμογή των απαραίτητων κανόνων ασφάλειας των τροφίμων. Στην περίπτωση των τροφίμων όταν μιλάμε για Ασφάλεια Τροφίμων μιλάμε για την αναγνώριση των κινδύνων και το σύνολο των προληπτικών μέτρων που παίρνουμε προκειμένου να μειώσουμε την επικινδυνότητα που μπορεί να προκύψει από την κατανάλωση κάποιου αλλοιωμένου τροφίμου, συμπεριλαμβανομένων και των συνεπειών που μπορούν να υπάρξουν λόγω της κατανάλωσής του.

Οι κίνδυνοι που μπορεί να υπάρξουν, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στους μικροβιολογικούς, στους χημικούς και στους φυσικούς. Μικροβιολογικούς κινδύνους ονομάζουμε τους κινδύνους που οφείλονται σε κάποιο μικροβιολογικό παράγοντα. Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα παθογόνα βακτήρια (σαλμονέλα, σταφυλόκοκκος κ.α.), οι μύκητες, οι παθογόνοι ιοί (π.χ. ηπατίτιδα), τα παράσιτα καθώς και τα τοξικά παράγωγα αυτών (π.χ. οι αφλατοξίνες που παράγονται από ορισμένους μύκητες).

Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι αποτελούν την μεγαλύτερη απειλή για την υγεία των καταναλωτών. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι και άμεσοι, όσον αφορά δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή είναι οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι και κυρίως τα παθογόνα βακτήρια. Άλλοι μικροβιολογικοί κίνδυνοι είναι τα διάφορα παράσιτα όπως τα πρωτόζωα,

νηματώδεις, κεστώδεις και τρηματώδεις σκώληκες και οι ιοί. Επίσης ορισμένοι μύκητες, καθίστανται επιβλαβείς εμμέσως με την παραγωγή μυκοτοξινών . Περισσότερες από 400 διαφορετικές μυκοτοξίνες έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα. Όσον αφορά στα παθογόνα βακτήρια και τον τρόπο με τον οποίο προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, διακρίνονται σε δύο τύπους: το μολυσματικό τύπο (Η κατάποση των κυττάρων αυτών των μικροοργανισμών μέσω των τροφίμων ή/και του νερού προκαλεί τροφική δηλητηρίαση) και το τοξικό τύπο (Είναι μικροοργανισμοί που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση λόγω της κατάποσης των τοξινών που αυτοί παράγουν κατά την ανάπτυξή τους στα τρόφιμα. Οι τοξίνες αυτές δεν καταστρέφονται με την θερμότητα). Συνεπώς οι τροφικές δηλητηριάσεις χωρίζονται σε τροφολοιμώξεις και σε τροφοτοξινώσεις. Ακόμη, οι τροφολοιμώξεις διακρίνονται σε: α) Μη-εντεροδιδεισδυτικές λοιμώξεις με αντιπροσωπευτικά παθογόνα το *Vibrio cholera* και το εντεροτοξικό *Escherichia coli* και β) Εντεροδιδεισδυτικές λοιμώξεις με αντιπροσωπευτικά παθογόνα τις εντερικές και τις τυφοειδείς Σαλμονέλλες, τη Σιγκέλα και το εντεροδιδεισδυτικό *E.coli*.

Κυριότερα παθογόνα βακτήρια σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων:

Aeromonas hydrophila

Είναι Gram- αρνητικό βακτήριο που απαντάται συχνότερα στα κρέατα, πουλερικά, ψάρια, νωπό γάλα, λαχανικά και στο νερό και προκαλεί γαστρεντερίτιδα που είναι συχνή σε παιδιά μέχρι 5 ετών.

Bacillus cereus

Είναι αερόβιος Gram-θετικός σποριογόνος μικροοργανισμός με σπόρια που συναντώνται στο έδαφος, στη σκόνη, στα φυτά, στον εντερικό σωλήνα διαφόρων ζώων και

στα κόπρανα. Παράγει τοξίνες μεταξύ των οποίων υπάρχουν δύο (εμμετική και διαρροϊκή) που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση στον άνθρωπο.

Campylobacter jejuni

Είναι Gram-θετικός μικροαερόφιλος μικροοργανισμός που δεν επιβιώνει σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μπορεί να προκαλέσει ελαφράς μορφής γαστρεντερίτιδα και απαντάται κυρίως σε ζωϊκής προέλευσης τρόφιμα (πουλερικά).

Clostridium botulinum

Είναι αναερόβιο σποριογόνο Gram-θετικό βακτήριο που είναι υπεύθυνο για την αλλαντίαση ή βοτουλισμό. Παράγει νευροπαραλυτική τοξίνη που δεν καταστρέφεται με το μαγείρεμα και είναι θανατηφόρα για τον άνθρωπο. Τα σπόριά του βρίσκονται στο έδαφος, στα υδάτινα περιβάλλοντα και στο εντερικό σύστημα των ζώων.

Clostridium perfringens

Είναι Gram-θετικό αναερόβιο σποριογόνο βακτήριο, που μπορεί μερικές φορές να επιβιώσει και σε αερόβιες συνθήκες (αεράντοχο). Τα σπόριά του βρίσκονται στο έδαφος, στην σκόνη, στον αέρα και στα κόπρανα ζώων και ανθρώπων. Κατά τη σποριογονία παράγεται εντεροτοξίνη η οποία ελευθερώνεται από τα κύτταρά του στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Προκαλεί διάρροια, πόνο στο υπογάστριο και πονοκέφαλο.

Escherichia coli

Είναι Gram-αρνητικό προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που βρίσκεται κυρίως στους εντερικούς σωλήνες ανθρώπων και ζώων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού και των τροφίμων. Τα παθογόνα στελέχη του διαίρούνται σε τέσσερις κατηγορίες: α) τα εντεροπαθογενικά (EPEC) , που προκαλούν διάρροια κυρίως

στα νήπια. β) τα εντεροτοξικά (EPEC) , που προκαλούν την <<διάρροια των ταξιδιωτών>> .γ) τα εντεροδιεισδυτικά (EIEC) που προκαλούν διάρροια και εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου με επακόλουθη εκδήλωση συμπτωμάτων «σιγκέλωσης» και δ) τα εντεροαιμοραγικά (EHEC, ή VTEC) που προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουρικό σύνδρομο αν προσκολληθούν στο τοίχωμα του εντερικού σωλήνα.

Listeria monocytogenes

Είναι Gram- θετικό προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, πολύ διαδεδομένο στη φύση και απαντάται στα φυτά, στο έδαφος, στο νερό και στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων. Είναι κοινό παθογόνο βακτήριο που εκτός από γαστρεντερίτιδα μπορεί σε ευαίσθητα άτομα (εγκύους, νεογνά, γέρους και γενικά σε άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα) να προκαλέσει αποβολές εμβρύων, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και δηλητηρίαση του αίματος. Μάλιστα έχει ποσοστό θνησιμότητας που φτάνει το 34%.

Salmonella sp.

Τα βακτήρια αυτού του γένους είναι Gram-αρνητικά και προαιρετικά αναερόβια. Είναι κοινά στη φύση, βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και μέσω απεκκρίσεων μολύνουν το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (νωπά κόκκινα και λευκά κρέατα). Αιτία των περισσότερων κρουσμάτων είναι τα πουλερικά, όπου το βακτήριο μολύνει ακόμη και τα αυγά. Μεταδίδονται από τον εντερικό σωλήνα στα κόπρανα και από κει μολύνοντας τρόφιμα και νερό μεταδίδονται στον άνθρωπο. Οι κυριότεροι τύποι σαλμονελών που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις είναι: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Ifantis* και *S. Tennessee*. Τα δύο πρώτα προκλούν τα περισσότερα κρούσματα σαλμονέλλωσης. Εκτός από τη σαλμονέλλωση είδη του γένους αυτού

προκαλούν τον εντερικό τυφοειδή πυρετό (*S. Typhi S. Paratyphi*) που μπορεί να προκαλέσει πυρετό, πονοκεφάλους, διάρροια περιτονίτιδα ή σηψαιμία. Με βάση σύγχρονες μεθόδους ταξινόμησης όλες οι σαλμονέλλες κατατάσσονται ως υποείδη κι ορολογικοί τύποι του είδους *Salmonella enterica*.

Shigella sp.

Προκαλεί κακοήθη δυσεντερία. Είναι εντεροδιεισδυτικό παθογόνο. Τα κύτταρα προσκολλώνται στο εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα και προσβάλλουν τα κύτταρα. Μερικά στελέχη παράγουν και εντεροτοξίνη που διαφέρει από τις άλλες εντεροτοξίνες της διάρροιας γιατί είναι ισχυρή κυτοτοξίνη. Προκαλεί κοιλιακούς πόνους, εμετό και διάρροια όπου μπορεί να παρατηρηθεί και αίμα.

Staphylococcus aureus

Είναι ένας Gram-θετικός προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός που η μικρή παρουσία του στα τρόφιμα είναι συνηθισμένη, αφού στα πουλικά και στα ωμά κρέατα αποτελεί μέρος της Χλωρίδας του δέρματος των ζώων Εκτός το δέρμα, μόλυνση μπορούν να προκαλέσουν και οι χειριστές των τροφίμων όπως ο άνθρωπος που είναι και αυτός φορέας του μικροοργανισμού αυτού. Για να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση πρέπει να πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό μεγαλύτερο από 10^6 κύτταρα/g γιατί μόνο τότε παράγεται αρκετή ποσότητα θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης που προκαλεί συμπτώματα ναυτίας και εμετό. Η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από τον μικροοργανισμό αυτό, ονομάζεται σταφυλοκοκκική τοξίνωση. Τα κυρίαρχα συμπτώματα της τοξίνωσης αυτής είναι ναυτία, εμετός, πόνος στο στομάχι και διάρροια.

Yersinia enterocolitica

Είναι Gram-αρνητικό προαιρετικά αναερόβιο ψυχρότροφο βακτήριο και βρ΄σικεται σε κρέας, γάλα, ψάρια και οστρακοειδή. Προκαλεί εντεροκολίτιδα με διάρροια, κοιλιακούς πόνους, ελαφρύ πυρετό και σπανιότερα εμετό κυρίως σε μικρά παιδιά (κάτω των 7 ετών) λόγω της θερμοανθεκτικής τοξίνης που παράγεται στο εσωτερικό του εντερικού σωλήνα.

Παθογόνα *Vibrio*

Τα *Vibrio* είναι Gram-αρνητικά προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον και κυρίως στα αλμυρά νερά. Τα παθογόνα στελέχη των *Vibrios* ανήκουν στα είδη *Vibrio cholerae* και *Vibrio parahaemolyticus*. Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι λιγότερο ανθεκτικό από ότι το *Vibrio cholerae* και απαντάται κυρίως στα νερά κοντά στις ακτές. Το *Vibrio cholerae* απαντάται κυρίως σε ανοικτές και τροπικές ή υποτροπικές θάλασσες ενώ από εύκρατες θάλασσες απομονώνεται μόνο τους ζεστούς μήνες. Τα στελέχη του *Vibrio cholerae* προκαλούν την ασθένεια της χολέρας. Ο μικροοργανισμός αποικίζει στο εσωτερικό των εντέρων και παράγει τοξίνη. Ο χρόνος επώασης είναι 1-2 ημέρες και η ένταση της ασθένειας μπορεί να είναι από μέτρια έως και θανατηφόρα. Τα στελέχη του *Vibrio parahaemolyticus* μπορεί να είναι και εντεροδιεισδυτικά και να προκαλέσουν δυσεντερίες. Η μόλυνση από το *Vibrio cholera* οφείλεται κυρίως στο μολυσμένο νερό ενώ από το *Vibrio parahaemolyticus* οφείλεται κυρίως σε κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών.

1.2 Φυσικά αντιμικροβιακά

Τα φυσικά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται για τη βιοσυντήρηση των τροφίμων είναι τα αιθέρια έλαια όπως ρίγανη, μέντα, γαρύφαλλο, κανέλλα, οι βακτηριοσίνες όπως η

νισίνη και οι προστατευτικές καλλιέργειες όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια. (Παρλαπάνη, 2013)

Η χρήση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών από φυτά, όπως τα αιθέρια έλαια, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αντιμικροβιακής αλλά και αντιοξειδωτικής τους δράσης (Nychas et al. 2003). Η χρήση ρίγανης, ιδιαίτερα, έχει βρεθεί να επιδρά σημαντικά στην αύξηση των εντεροβακτηρίων, οξυγαλακτικών, *B. cereus* και *Pseudomonas* spp. σε έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά (Gutierrez et al. 2008), στην αύξηση του *Salmonella* Typhimurium και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε κρέας αποθηκευμένο υπό διάφορες ατμόσφαιρες σε ψύξη (Skandamis et al. 2002a), στην αύξηση των *S. Enteritidis* PT4 και *Escherichia coli* O157:H7 NCTC12900 σε ταραμοσαλάτα και μελιτζανοσαλάτα (Skandamis et al. 2002b). Επιπλέον, η χρήση συντηρητικών φυτικής και ζωικής προέλευσης όπως η ρίγανη και η χιτοζάνη αντίστοιχα, καθώς και ο συνδυασμός αυτών, επιδρούν στην αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα επιμηκύνοντας σημαντικά τον εμπορικό χρόνο ζωής τους (Vatavali et al. 2012). Ο συνδυασμός των δύο αυτών ουσιών βρέθηκε να επιδρά και στην αύξηση του *L. monocytogenes* σε φιλέτα κοτόπουλου (Khanjari et al. 2013). Παρόλα αυτά, η χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα είναι σχετικά περιορισμένη λόγω της οσμής τους η οποία επιδρά σημαντικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου ειδικά εάν χρησιμοποιηθούν σε συγκεντρώσεις όπου επιδεικνύουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση (Nychas et al. 2003).

Οι βακτηριοσίνες όπως είναι η νισίνη αποτελούν έναν άλλο αποτελεσματικό τρόπο έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα (Thomas & Delves-Broughton 2005) και στα τρόφιμα γενικότερα (Boziaris et al. 1998,

Boziaris & Adams 2000). Επιπλέον, βακτήρια τα οποία παράγουν βακτηριοσίνες, όπως είναι τα στελέχη *Carnobacterium divergens* V41 και *Carnobacterium piscicola* V1 (*Carnobacterium maltaromaticum*) των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έχουν προταθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες έναντι του *L. monocytogenes* στα αλιεύματα (Brillet et al. 2004).

Η προσθήκη των αλάτων οργανικών οξέων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στα τρόφιμα λόγω της αντιμικροβιακής (Zhuang et al. 1996, Al-Dagal & Bazaraa 1999, Thomas 2000, Sallam 2007, FDA 2009) και αντιοξειδωτικής τους δράσης (Lee et al. 2002). Τα άλατα σορβικό κάλιο, βενζοϊκό νάτριο και διοξικό νάτριο έχουν εγκριθεί ως συντηρητικά τροφίμων (Surekha & Reddy 2000). Έχει αναφερθεί ότι η δράση των αλάτων αυτών επιμηκώνει τον εμπορικό χρόνο ζωής ή/και παρεμποδίζει την αύξηση του *L. monocytogenes* ή/και του *Salmonella* στο κοτόπουλο (González-Fanzos & Dominguez, 2007, Economou et al. 2009), στο κρέας (Zhang & Mustapha 1999, Ariyaratipun et al. 2000) και στα αλιεύματα (Neetoo et al. 2008, Wan Norhana et al. 2012). Οι Wan Norhana et al. (2012) αναφέρουν ότι τα άλατα αυτά σε συνδυασμό ή όχι με νισίνη και EDTA επιδρούν στην αύξηση του *L. monocytogenes* και της ενδογενούς μικροβιακής σύνθεσης σε γαρίδες που μετά την εμβάπτισή τους αποθηκεύθηκαν σε συσκευασία κενού στους 4°C. Η επίδραση των αλάτων αυτών στη μικροβιακή σύνθεση αλλά και στην αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα είναι ελάχιστα γνωστή (Neetoo et al. 2008, Wan Norhana et al. 2012). Επιπλέον, ελάχιστη είναι η γνώση της επίδρασης και άλλων αλάτων οργανικών οξέων όπως το οξικό νάτριο, γαλακτικό νάτριο και κιτρικό νάτριο στην τύχη των μικροοργανισμών στα αλιεύματα (Zhuang et al. 1996, Boskou & Debevere 2000, Sallam 2007).

1.3 Ουσίες που προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον και κυρίως από θαλάσσια φυτά

Σήμερα οι καταναλωτές γνωρίζουν όλο και περισσότερο τη σχέση μεταξύ της διατροφής, της υγείας και της πρόληψης των ασθενειών. Είναι γνωστό ότι κατανάλωση τροφίμων όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και θαλάσσια προϊόντα τρόφιμα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) πέρα από τη συνάντηση με βασικές διατροφικές ανάγκες, είναι επίσης θεμελιώδης για την προαγωγή της υγείας και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθένειας (Shahidi, 2009).

Ερευνητικές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν συσχετίσει τη διαίτα και κάποιες χρόνιες ασθένειες - τονίζοντας την τεράστια δυνατότητα των τροφίμων στην πρόληψη και - τη πρόοδο χρόνιων ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση (Casós et al., 2008), τον καρκίνο (Trottier et al., 2010) και την ανακούφιση των συμπτωμάτων ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα (Ameye and Chee, 2006). Παρόλο που οι σημερινοί καταναλωτές έχουν όλο και μεγαλύτερη συνείδηση της ασφάλειας των τροφίμων, της ποιότητας και της υγείας κυρίως από τις ανεπτυγμένες χώρες, δηλαδή πληθυσμούς από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), έχουν ακόμα πολλά να κάνουν σε ό,τι αφορά τις στρατηγικές για τη καταπολέμηση σύγχρονων παθήσεων όπως η καρδιοπάθεια, η παχυσαρκία, η οστεοπόρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης, αλλεργίες και στρες (Cencic and Chingware, 2010). Ορισμένες από αυτές τις ασθένειες τονίζονται από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (ΕΑΑΤ). Ακόμη δίνονται διαιτητικές οδηγίες για τα τρόφιμα (Anon, 2008) ως τα συχνότερα προβλήματα υγείας που σχετίζονται με τη διατροφή, όπως είναι οι καρδιαγγειακές ασθένειες, η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και ο τύπου 2 Διαβήτης. Επιπλέον, οι ολοένα και γηραιότεροι πληθυσμοί απαιτούν διαφορετικά τρόφιμα

και δίαιτες για υγιή και ενεργό γήρανση καθώς και βελτίωση της ευημερίας (Roberts and Rosenberg, 2006).

Με βάση το κριτήριο της υγείας στα τρόφιμα με χαρακτηριστικά γνωρίσματα, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα, ανάπτυξη και εμπορευματοποίηση λειτουργικών τροφίμων, nutraceuticals, και συμπληρωμάτων διατροφής σε όλο τον κόσμο (Shahidi, 2009). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει τυπικός ορισμός για τα λειτουργικά τρόφιμα - η έννοια χρησιμοποιείται γενικά για να αναφέρεται σε ένα τρόφιμο και σύμφωνα με την Health Canada, ένα λειτουργικό φαγητό είναι παρόμοιο με ένα συμβατικό φαγητό, το οποίο καταναλώνεται ως μέρος μιας συνήθους διατροφής η οποία είτε παρέχει φυσιολογικές ωφέλειες ή μειώνει τον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών πέρα από τη βασική θρεπτική του αξία (<http://www.hc-sc.gc.ca>).

Σύμφωνα με τον Food Agriculture Organisation (FAO, Anon, 2007), λειτουργικά τρόφιμα είναι εκείνα τα τρόφιμα παρόμοια με το συμβατικό φαγητό σε εμφάνιση, που προορίζονται να καταναλωθούν ως μέρος μιας κανονικής δίαιτας που περιέχει βιολογικά δραστικές ενώσεις-ουσίες που προσφέρουν δυνατότητες για βελτιωμένη υγεία ή μειωμένο κίνδυνο ασθένειας. Για συμπληρώματα διατροφής ή / και nutraceuticals δεν υπάρχει συναινετικός ορισμός. Διαπιστώνεται επίσης και εξακολουθεί να υπάρχει ασάφεια σχετικά με τις κανονιστικές απαιτήσεις (Shirwaikar et al., 2011). Σε ορισμένες χώρες, τα λειτουργικά τρόφιμα και θρεπτικά συστατικά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικά (Shahidi, 2009) δεδομένου ότι ορισμένα nutraceuticals χρησιμοποιούνται ως συμβατικά τρόφιμα ή ως μοναδικά είδη γεύματος ή διατροφής. Από τη δικιά μας πλευρά και σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς (Ameye και Chee, 2006), τα nutraceuticals ή τα συμπληρώματα διατροφής θα

πρέπει να ορίζονται ως λειτουργικά συστατικά που πωλούνται ως σκόνες, χάπια και άλλα φάρμακα μορφές που δεν σχετίζονται με τα τρόφιμα.

Παρ όλα αυτά, υπάρχει μια κοινή πτυχή υποχρεωτική στα λειτουργικά τρόφιμα - συμπληρώματα διατροφής. Σε όλα αυτά, το κύριο βάρος εστιάζεται στη βελτίωση της υγείας και στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθένειας μέσω της πρόληψης με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και την ευημερία, πράγματα που συμβάλλουν στην αύξηση της υγιεινής μακροζωίας (Shahidi, 2009). Παρόλο που δεν υπάρχει ακριβής ορισμός για τα λειτουργικά τρόφιμα, είναι σαφές ότι πρόκειται για τρόφιμα που εκτός από τα θρεπτικά τους αποτελέσματα, έχουν αποδείξει όφελος για μία ή περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, τη βελτίωση της κατάστασης της υγείας ή της ευημερίας και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθένειας. Η λειτουργικότητα είναι εγγενής σαν ένα χαρακτηριστικό που εισάγεται στο πλέγμα των τροφίμων, προκειμένου να βελτιωθεί η υγεία ή να μειωθεί η αρνητική επίδραση στην υγεία και επιτυγχάνεται με: i) την εξάλειψη ή την προώθηση μια χημικής αλλαγής σε ένα επιβλαβές συστατικό. ii) την προσθήκη νέων συστατικών στα τρόφιμα που προάγουν την υγεία ή προβιοτικούς μικροοργανισμούς iii) την προσθήκη ενός υπάρχοντος συστατικού τροφίμων που προωθεί την υγεία, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή του σε μια διαδικασία προστασίας και iv) την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας ή της σταθερότητας της προαγωγής της υγείας ως συστατικό τροφίμων.

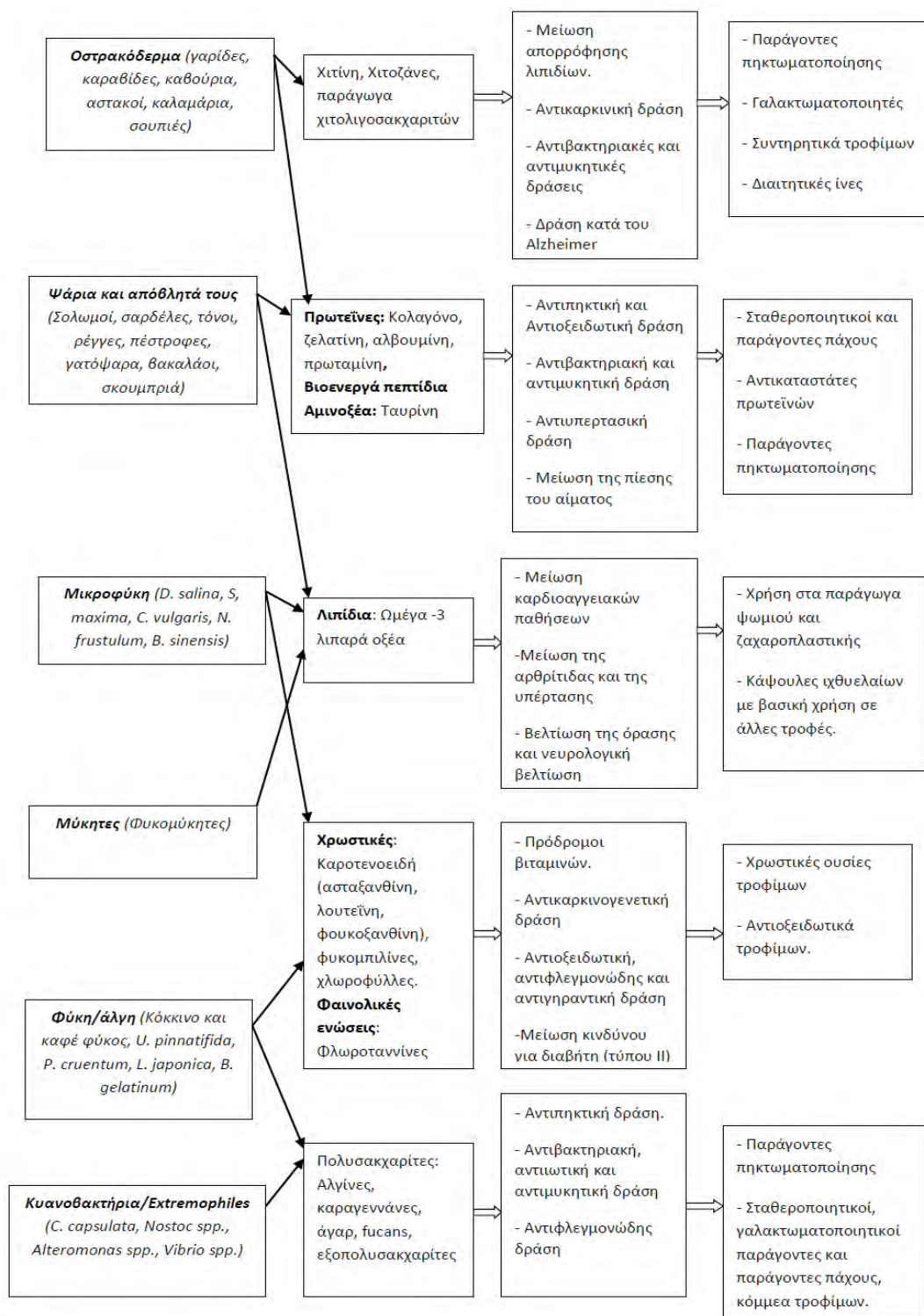
Πηγές λειτουργικών συστατικών υπάρχουν σε πολλές διαφορετικές δεξαμενές και μπορεί να βρεθούν τόσο σε χερσαία όσο και θαλάσσια περιβάλλοντα. Το γήινο περιβάλλον (π.χ. φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και μανιτάρια) ως δεξαμενή βιοενεργών ενώσεων είναι πολύ πιο διερευνημένο από το θαλάσσιο περιβάλλον (π.χ. ψάρια, σφουγγάρια, μακρο και

μικροφύκια). Αν και υπάρχουν πολλά λειτουργικά θαλάσσια συστατικά είναι γνωστό ότι εξακολουθούν να αξιολογούνται και άλλα θαλάσσια συστατικά ως νέες πηγές που πρέπει ακόμη να ανακαλυφθούν. Το θαλάσσιο περιβάλλον είναι μια μεγάλη δεξαμενή βιοδραστικών ενώσεων που μπορεί να εφαρμόζεται σε διάφορες φάσεις επεξεργασίας, αποθήκευσης και εμπλουτισμού τροφίμων (Rasmussen και Morrissey, 2007). Τα χαρακτηριστικά του θαλάσσιου περιβάλλοντος όπως διάφοροι βαθμοί αλατότητας, θερμοκρασίας, πίεσης, και ο φωτισμός προσδίδουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις ενώσεις που παράγονται από θαλάσσιους οργανισμούς. Προκειμένου να αυξηθεί η διαθεσιμότητα και η χημική ποικιλομορφία των θαλάσσιων λειτουργικών συστατικών, η έρευνα εφαρμόζει βιοτεχνολογικά εργαλεία για να ανακαλύψει και να παράγει θαλάσσια προϊόντα (Baerga-Ortiz, 2009). Η ανασκόπηση που παρουσίασαν οι Freitas et al (2012), επικεντρώνεται στην πρόοδο της βιοτεχνολογίας για να ανακαλυφθούν, να παραχθούν ή να μετασχηματιστούν ενώσεις από θαλάσσιες πηγές ενσωματωμένες ως λειτουργικά συστατικά σε δυνητικά λειτουργικά τρόφιμα. Η γενετική έρευνα, η οποία διερευνά νέες προόδους στη θαλάσσια βιοτεχνολογία, είναι επίσης ένα θέμα για συζήτηση. Τα λειτουργικά συστατικά πρέπει να είναι διαιτητικά, αλλά όχι υποχρεωτικά θρεπτικά, βιολογικά ενεργά συστατικά που περιέχονται σε μη τροποποιημένη ολόκληρη τροφή ή προστίθενται μέσα στη τροφή (Anon,2007). Το ενδιαφέρον των λειτουργικών συστατικών έχει ενισχυθεί από τις πρόσφατες εξελίξεις στη γενετική, κυρίως στη γονιδιωματική της διατροφής, που περιλαμβάνει τη θρεπτογενετική και την τροφιμογενετική (Shirwaikar et al., 2011), δεδομένου ότι τα τρόφιμα μπορούν να παίξουν ρόλο για το άτομο τις ανάγκες του και τις προδιαθέσεις του.

1.3.1 Θαλάσσια λειτουργικά συστατικά και οι πηγές τους

Οι θαλάσσιοι πόροι αποτελούν πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας οι οποίες έχουν και υψηλή διατροφική αξία αφού περιέχουν ως λειτουργικά συστατικά: ωμέγα-3 έλαια, χιτίνη, χιτοζάνη, υδρολύματα πρωτεϊνών ψαριών, συστατικά φυκών, καροτενοειδή, κολλαγόνο, ταυρίνη και άλλες βιοδραστικές ενώσεις (Kadam και Prabhasankar, 2010). Τέτοιες ενώσεις μπορούν να προστεθούν σε διαφορετικά στάδια, από την επεξεργασία μέχρι την αποθήκευση, της διαδικασίας παραγωγής τροφίμων.

Ο εμπλουτισμός των τροφίμων με λειτουργικά ή βιοδραστικά συστατικά έχει γίνει όλο και πιο ενδιαφέρον τρόπος για να αναπτυχθούν νέες λειτουργικές τροφές που συμβάλουν στην υγεία των καταναλωτών. Στον παρακάτω πίνακα 1 (Freitas et al, 2012) παρουσιάζονται τα κύρια θαλάσσια λειτουργικά συστατικά και η εγγενής λειτουργία τους καθώς και οι πιθανές εφαρμογές τους στα τρόφιμα. Τα οφέλη για την υγεία που έχουν μελετηθεί πιο πολύ και έχουν οδηγήσει τους καταναλωτές να δώσουν πιο πολύ σημασία στο ότι η δίαιτά τους μπορεί να συμβάλλει τόσο στη διατροφή όσο και στην υγεία τους είναι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης των συστατικών αυτών και η δυνατότητα απόκτησης ανοσίας. Προϊόντα διατροφής που περιέχουν έλαια προερχόμενα από τη θάλασσα, πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, χιτίνη, χιτοζάνη κλπ. είναι μερικά από τα τρόφιμα που πωλούνται σε διάφορες αγορές σε όλο τον κόσμο συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών, της Ιαπωνίας και ορισμένων χωρών της Ευρώπης (Kadam και Prabhasankar, 2010).



Πίνακας 1. Κύρια λειτουργικά συστατικά προερχόμενα από τη θάλασσα, με πιθανές εφαρμογές στις τροφές, πηγές και εγγενής λειτουργικότητα. (Πηγή: Freitas et al., 2012).

Τα άλγη, ιδιαίτερα τα βρώσιμα, που αναφέρονται γενικά ως φύκια, είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα φυσική πηγή ενώσεων με βιολογική δραστηριότητα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά συστατικά. Λαμβάνοντας υπόψη δε τη μεγάλη τους ταξινομική ποικιλομορφία, η έρευνα για την αναγνώριση των βιολογικά ενεργών ενώσεων από τα φύκια μπορεί να θεωρηθεί ως έχουσα μεγάλες προοπτικές ανάπτυξης. Επιπλέον, αυτά τα εκχυλίσματα είναι φανερό ότι δεν περιέχουν λίπος και θερμίδες, κάτι που τα κάνει όλο και περισσότερο εμπορεύσιμα. Μακροάλγη, όπως τα είδη *Sargassum*, έχουν βρεθεί να είναι καλές πηγές διαιτητικών ινών και καροτενοειδών με αντιοξειδωτική δραστηριότητα και παίζουν σημαντικούς ρόλους στην πρόληψη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Chandini et al., 2008, Ganesan et al., 2008, Je et al., 2009; Kadam και Prabhasankar, 2010). Τα αποθέματα τροφής των καφέ φυκιών έχουν χαρακτηριστικά πολύπλοκα πολυσακχαρίδια και ανώτερες αλκοόλες. Πολλοί βιοενεργοί μεταβολίτες έχουν απομονωθεί από αυτά τα άλγη και έχουν διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες-δραστηριότητες όπως κυτταροτοξικές, αντικαρκινικές, νηματοκτόνες, αντιμυκητιασικά, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικά (Gamal, 2010, Je et al., 2009). Τα αλγινίδια, οι καρραγενάνες και το άγαρ είναι παραδείγματα πολυσακχαριτών που προέρχονται από φύκη και χρησιμοποιούνται ευρέως ως παχυντές και σταθεροποιητές στα τρόφιμα καθώς και για ζελέ (Rasmussen και Morrissey, 2007). Θειωμένες φουκάνες, όπως φουκοϊδάνες από καφέ φύκια, καρραγενάνες από κόκκινα φύκια, τα άλγη και τα λουβάνια από τα πράσινα φύκια, είναι γνωστό ότι λειτουργούν σαν ρυθμιστές της πήξης καθώς επίσης και ως αντιθρομβωτικά, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά με αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές μεταξύ άλλων ιδιότητες (Pomin, 2009, Wijesekara et al.,

2011). Διαλυτοί πολυσακχαρίτες από τα άλγη έχουν τεράστιες δυνατότητες ως διαιτητικές ίνες για τη διατροφή του ανθρώπου και αξιολογούνται ως νέες πιθανές προβιοτικές ενώσεις (Gupta και Abu-Ghannam, 2011). Η βιολογική σημασία των μακροαλγών καθώς και των χρωστικών τους μπορούν να βρεθούν σε πρόσφατες εργασίες των Gamal (2010) και Pangestuti και Kim (2011). Επιπλέον, οι Holdt και Kraan (2011) δεν παρουσίασαν μόνο μια εξαντλητική περιγραφή των βιοενεργών ενώσεων που μπορούν να βρεθούν στα φύκια και η εφαρμογή τους σε λειτουργικά τρόφιμα, αλλά συζητούν επίσης σημαντικά και επείγοντα ζητήματα νομοθεσίας στην πρόσφατη εργασία τους.

Τα μικροφύκη θεωρούνται σημαντικοί παραγωγοί υψηλών βιοενεργών ενώσεων που βρίσκονται σε θαλάσσιους πόρους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της διατροφικής εικόνας των τροφίμων διότι είναι πλούσια σε PUFAs και χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες (Gamal, 2010).

Τα ψάρια και τα απόβλητά τους είναι γνωστές πηγές βιοδραστικών συστατικών: i) ασβέστιο από οστά ψαριών ii) ιχθυέλαια πλούσια σε PUFAs από το συκώτι ψαριών iii) πρωτεϊνικά προϊόντα υδρόλυσης υψηλής βιολογικής αξίας, πεπτίδια με αντιυπερτασική δραστηριότητα και αμινοξέα, όπως η ταυρίνη, τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση και θετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, από πρωτεΐνες ψαριών; iv) βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και ανόργανα συστατικά (Dragnes et al., 2009; Guerard et al., 2010; Kadam και Prabhasankar, 2010). Μια επισκόπηση από τα βιοδραστικά πεπτίδια που προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς καθώς και από τις βιολογικές τους (αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές, αντιπηκτικές, αντιμικροβιακές) δραστηριότητες δημοσιεύθηκαν πρόσφατα από τους Kim και Wijesekara (2010).

Η χιτίνη, το δεύτερο πιο άφθονο φυσικό πολυμερές, μπορεί να εξαχθεί από καρκινοειδή (Honorkar και Barikani, 2009). Η Χιτοζάνη, παράγωγο χιτίνης που προκύπτει από την επεξεργασία των κελυφών και των οστών από καβούρια, γαρίδες, σουπιές, κλπ., είναι ένα βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό πολυμερές με αντιβακτηριακή δράση η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων. Η ικανότητά του να απορροφάει το λίπος υπογραμμίζει την πιθανή χρήση του ως αντι-χοληστερολικό παράγοντα (Hayes et al., 2008b). Οι βιολογικές δραστηριότητες της χιτοζάνης και των χιτοολιγοσακχαριτών (υποχοληστερολαιμική, αντιμικροβιακή, ανοσοενισχυτική, αντιογκολογική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, κλπ.) και η δυναμική εφαρμογή τους στα τρόφιμα, εξετάζεται μεταξύ άλλων εφαρμογών, από τους Xia et al. (2011).

Η χλωροφύλλη α, οι φυκοκυανίνες και η φυκοερυθρίνη είναι ενδιαφέρουσες χρωστικές που εντοπίζονται στα κυανοβακτήρια, τα οποία ονομάζονται επίσης μπλε-πράσινα φύκια. Αυτοί οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ένα δευτερογενή μεταβολισμό που παράγει διάφορες ενώσεις. Μερικές είναι προβληματικές για τη δημόσια υγεία δεδομένου ότι είναι ισχυρές ηπατοτοξίνες ή νευροτοξίνες ενώ άλλες αποκαλύπτουν πιθανές βιολογικές δραστηριότητες όπως αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Όλα αυτά έχουν αναφερθεί από τον Gamal (2010). Λόγω της πλούσιας χημικής τους σύνθεσης, που εξαρτάται από τα είδη μικροφυκών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή να αντιπροσωπεύσουν μια πηγή φυσικών χρωστικών για τα τρόφιμα υπό την προϋπόθεση ότι διασφαλίζεται η ασφάλειά τους (Mata et al., 2010, Spolaore et al., 2006). Η φυκοκυανίνη είναι μια κυανή χρωστική ελαφριάς συγκομιδής στο κυανοβακτήριο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Eriksen, 2008).

Τα θαλάσσια βακτήρια και οι μύκητες θεωρούνται ως νέες πηγές για θαλάσσια φυσικά προϊόντα (Duarte et al., 2012; Imhoff et al., 2011). Θαλάσσιοι μύκητες (ζυμομύκητες) με υψηλή συγκέντρωση του γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA), ενός ελπιδοφόρου λειτουργικού και υγιούς συστατικού τροφής, έχουν αναφερθεί από τους Masuda et al. (2008). Τα θαλάσσια ακραιόφιλα βακτήρια έχουν επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχουν μεταβολικές οδούς προσαρμοσμένες σε διάφορα ακραία θαλάσσια περιβάλλοντα. Τα ακραιόφιλα είναι επίσης μια τεράστια πηγή άγνωστων και μη καλλιεργημένων βακτηρίων. Πολλοί μικροβιακοί εξωπολυσακχαρίτες και ένζυμα από τα ακραιόφιλα έχουν δυναμικές και μοναδικές ιδιότητες (Laurienzo, 2010). Τα διάτομα είναι επίσης συγκεκριμένοι οργανισμοί που εκτός από ότι είναι φωτοσυνθετικά ευέλικτοι με υψηλό βαθμό προσαρμοστικότητας σε διαφορετικά περιβάλλοντα (από τον Ισημερινό μέχρι τους Πόλους), τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρον για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, είναι σε θέση να παράγουν ουσίες για λειτουργικά τρόφιμα (Bozarth et al., 2009). Το πιο σχετικά λειτουργικά συστατικά είναι τα PUFAs όπως EPA, ARA, DHA και άλλα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.

1.3.2 Λειτουργικά τρόφιμα που ενσωματώνουν θαλάσσια συστατικά

Εκτός από το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη χρήση θαλάσσιων λειτουργικών συστατικών υπάρχουν διάφορες προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν για να τα χρησιμοποιήσουμε σε νέα λειτουργικά τρόφιμα. Τα τρόφιμα θα πρέπει να έχουν καλά αισθητήρια χαρακτηριστικά ώστε να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή δεδομένου ότι πολύ λίγοι καταναλωτές είναι διατεθειμένοι να θέσουν σε κίνδυνο τη γεύση για τα υγειϊνά τρόφιμα (Honkanen, 2009). Από όσο γνωρίζουμε, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη έρευνας στην εφαρμογή τέτοιων λειτουργικών / βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα, καθώς και

την επιστημονική επικύρωση των τεχνολογικών και των τεχνολογιών τους για βιολογική σκοπιμότητα. Οι Fernandes et al. (2008) μελέτησαν την ενσωμάτωση των εμπορικών χιτοζάνων και των χιτοολιγοσακχαριτών, από κελύφη καβουριών, σε τρόφιμα όπως το γάλα και ο χυμός μήλου για να διαπιστωθεί η επίδραση των συστατικών των τροφίμων σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση τους, αξιολογώντας παράλληλα την αποδοχή τους από ένα αισθητήριο πάνελ. Τα αναφερόμενα αποτελέσματα είναι ένα παράδειγμα των δυσκολιών που πρέπει να αντιμετωπιστούν στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων. Αν και το αντιβακτηριακό αποτέλεσμα κατά των παθογόνων *Staphylococcus aureus* και του *Escherichia coli* εξαρτώνταν από τη Gram φύση των βακτηρίων και από το μοριακό βάρος της χιτοζάνης, η προσθήκη τους σε χυμό μήλου οδήγησε σε ορισμένες δυσάρεστες γεύσεις οι οποίες αυξήθηκαν σε μέγεθος με το μοριακό βάρος χιτοζάνης. Στην πραγματικότητα, η ενσωμάτωση των θαλάσσιων συστατικών σε τρόφιμα διαφορετικής φύσης μπορεί να είναι πρόβλημα διότι δυνητικά οδηγεί τον καταναλωτή να αναμένει αρνητική επιρροή στα τρόφιμα, επειδή είναι αποτέλεσμα της ανάμειξης προϊόντων διαφορετικής φύσεως (Honkanen, 2009). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια ανάγκη για υψηλή συσχέτιση μεταξύ της προέλευσης του λειτουργικού συστατικού και της τάσης της τροφής ώστε να προωθηθεί η λειτουργική αποδοχή της (Siegrist et al., 2008). Ο σχεδιασμός λειτουργικών τροφίμων με βάση την ενσωμάτωση των θαλάσσιων συστατικών έχει φανεί ότι είναι πιο επιτυχημένη σε προϊόντα αρτοποιίας και ζυμαρικών και αναθεωρήθηκε πρόσφατα από τους Kadam and Prabhasankar (2010). Η ενσωμάτωση βρώσιμων φυκιών wakame (*Undaria pinnatifida*) μέχρι 20% είχε αισθητική αποδοχή με αποτέλεσμα τα βελτιωμένα προφίλ αμινοξέων και λιπαρών οξέων, την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε

φουκοξανθίνη και φουκοστερόλη σε ζυμαρικά από φύκια (Prabhasankar et al., 2009). Η φουκοξανθίνη, η οποία δεν επηρεάστηκε από την επεξεργασία τροφίμων, και οι μεταβολίτες της έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιπαχυντικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (Myashita και Hosokawa, 2008). Η διατροφική κατάποση του wakame έχει επίσης αναφερθεί ότι μειώνει την αρτηριακή πίεση (Chandini et al., 2008).

Στην Ιαπωνία αρκετές τροφές (πάστα σόγιας, πατατάκια και νουντλς) με προσθήκη χιτοζάνης είναι διαθέσιμες ως λειτουργικές τροφές που χαμηλώνουν τη χοληστερίνη (Borderías et al., 2005). Σύμφωνα με τους Kadam and Prabhasankar (2010) είναι απαραίτητες περισσότερες και σταθερές προσπάθειες στην έρευνα και το σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων βασισμένων σε θαλάσσια λειτουργικά συστατικά για τη μείωση των προβλημάτων υγείας μέσω της διατροφής.

Η εισαγωγή των θαλάσσιων ενώσεων στη διατροφή του ανθρώπου θα είναι πάντα ένα σύνθετο θέμα λόγω πολλών τύπων περιορισμών, όπως ο τύπος διατροφής και οι συνήθειες που σχετίζονται με τις πολιτιστικές και εθνικές πτυχές ενός πληθυσμού, τις ιδέες των καταναλωτών και τους φόβους για τη ρύπανση της θάλασσας καθώς επίσης και την ίδια τη νομοθεσία. Για παράδειγμα, υπάρχουν διαφορετικές απόψεις ως τη προέλευση λειτουργικών τροφίμων από τη θάλασσα. Ως ένα απλό παράδειγμα, τα βρώσιμα φύκια είναι ένα προϊόν με πολύ μεγάλη παράδοση στην ανθρώπινη διατροφή, σε χώρες όπως η Ιαπωνία, η Κίνα και η Κορέα. Το ίδιο συμβαίνει και στις ΗΠΑ ως συνέπεια του φαινομένου της μετανάστευσης από την ανατολή στη δύση, ενώ στην Ευρώπη, αν και η Γαλλία έχει καταβάλει μεγάλες προσπάθειες για να εγκριθούν αυτά για ανθρώπινη κατανάλωση, ορισμένες χώρες εξακολουθούν να παρουσιάζουν νομικά εμπόδια που ενδέχεται να καθυστερήσουν την

έγκρισή τους (Holdt and Kraan, 2011). Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη, η αποδοχή νέων λειτουργικών τροφίμων από τους καταναλωτές με θαλάσσιες βιοδραστικές ενώσεις σαφώς και θα εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ συνηθειών και παραδόσεων, την αντίληψή τους για τα πραγματικά οφέλη των λειτουργικών τροφίμων για την υγεία και των προαναφερθέντων οργανοληπτικών θεμάτων. Η νομοθεσία αποτελεί άλλη συμφόρηση για νέα λειτουργικά τρόφιμα με θαλάσσια προϊόντα βιοενεργών ενώσεων, καθώς μεταβάλλεται συνεχώς ή αναθεωρείται με τη δημοσίευση νέων κανονισμών και σε ορισμένες πτυχές αυτοί είναι πολύ σύνθετοι για να εφαρμοστούν σε οποιαδήποτε συγκεκριμένη χώρα. Επιπροσθέτως, η εμπορευματοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων ή των λειτουργικών τροφίμων με ισχυρισμούς σχετικούς με την υγεία συνεπάγεται ένα εκτεταμένο επιστημονικό φάκελο ώστε να αποδειχθούν τα επιστημονικά στοιχεία, τα οποία είναι εξαιρετικά ακριβά και επιβαρυντικά (Holdt και Kraan, 2011) και η εξειδικευμένη αγορά τους μπορεί να μην επαρκεί για την κάλυψη της οικονομικής επένδυσης.

1.4 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης των αιθέριων ελαίων του κριτάμου (*Crithmum maritimum*) στους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Επαρκής ποσότητα φυτών κριτάμου (*Crithmum maritimum*), συλλέχθηκε στις 5 Οκτωβρίου 2017 από την παραλία της περιοχής Αγριά Βόλου, Ν.Μαγνησίας. Η συλλογή έγινε με το χέρι.

2.2. Ξήρανση

Ακολούθησε η ξήρανση του φυτικού υλικού, με την τοποθέτησή του σε θάλαμο ξήρανσης στους 39 °C για 2 εβδομάδες. Τα φυτά πριν τοποθετηθούν στο θάλαμο, τοποθετήθηκαν σε συσκευασίες αλουμινίου τρεις στον αριθμό. Το περιεχόμενο κάθε συσκευασίας αποτελούσε και το δείγμα που είχαμε στη διάθεσή μας για να επεξεργαστούμε. Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων της ξήρανσης, τα ξηρά φυτά αφού ζυγίστηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί το ξηρό τους βάρος, έγινε η απομάκρυνση των βλαστών τους και ο θρυμματισμός των φύλλων τους με σκοπό να είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία τους. Το καθαρό ξηρό βάρος των τριών δειγμάτων ήταν 49,133 gr, 56,460 gr και 63,602 gr, αντίστοιχα.

2.3. Απόσταξη

Προκειμένου να ετοιμαστούν τα τρία δείγματα για τη διαδικασία της απόσταξης, προστέθηκε σε αυτά απιονισμένο νερό σε δεκαπλάσια ποσότητα απ' ό,τι το ξηρό τους βάρος. Συνεπώς προστέθηκαν 491 ml, 564 ml και 636 ml απιονισμένου νερού αντίστοιχα στα τρία δείγματα. Έτσι προετοιμάστηκαν τα δείγματα για την απόσταξη. Για την απόσταξη χρησιμοποιήθηκε διάταξη συσκευής απόσταξης Clevenger.

Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από το ότι το φυτικό υλικό βρίσκεται σε νερό υπό βρασμό, οι ατμοί του οποίου τελικά εκχυλίζουν το αιθέριο έλαιο του φυτού. Το παρασκευασθέν δείγμα τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη θέρμανσης η οποία συνδέεται με την ειδική συσκευή ψύξης Clevenger (βλ. εικόνα 1 παρακάτω) [φωτογραφία από αποσταξη].



Εικόνα 1. Πειραματική διάταξη συσκευής απόσταξης.

Στη συσκευή αυτή οι ατμοί υγροποιούνται και διαχωρίζεται το έλαιο από το νερό λόγω της διαφορετικής τους πυκνότητας. Η ταχύτητα με την οποία γίνεται η απόσταξη ρυθμίζεται από την ένταση της θέρμανσης. Η μέθοδος Clevenger πλεονεκτεί σε σχέση με τις άλλες μεθόδους λόγω του μικρού της κόστους, της ευκολίας στη χρήση, και στο ότι είναι κατάλληλη για διάφορα φυτικά υλικά όπως το ξύλο, οι ρίζες και οι καρποί. (Βουρλιώτη - Αράπη , 2010) Η διαδικασία της απόσταξης διήρκησε τρεις ώρες για κάθε δείγμα. Πρέπει να δίνεται η απαραίτητη προσοχή ώστε να διακοπεί η τροφοδότηση της συσκευής θέρμανσης (θερμαινόμενο μάτι) με ρεύμα 10 min πριν συμπληρωθούν οι 3 ώρες της απόσταξης. Το απόσταγμα ήταν πολύ μικρό σε ποσότητα. Συγκεκριμένα για τα 3 δείγματα που εξετάστηκαν ήταν 0,16 ml, 0,24 ml και 0,2 ml αντίστοιχα. Τα αποστάγματα συλλέχθηκαν από τη στρόφιγγα της συσκευής Clevenger σε μικρά δοχεία των 1 ml , ενώ για τη συλλογή μικροποσοτήτων που παρέμεναν στη συσκευή χρησιμοποιήθηκε σύριγγα και βελόνα. Τα δοχεία που περιείχαν το απόσταγμα τοποθετήθηκαν σε βαζάκι και αφού εξασφαλίστηκε η κατακόρυφη θέση τους με τη βοήθεια αλουμινοχάρτου αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο σε θερμοκρασία 4 οC.

2.4. Στελέχη / Είδη παθογόνων

Για το σκοπό της εργασίας απομονώθηκαν 15 στελέχη / είδη παθογόνων. Πριν την απομόνωση των παθογόνων έγινε η σχετική προεργασία προκειμένου να προχωρήσουμε στα πειράματα. Συγκεκριμένα, στα 15 φυαλίδια με πλαστικά σφαιρίδια (beads) με τα παθογόνα τα οποία αρχικά βρισκόντουσαν για συντήρηση σε υπερκατάψυξη (-80 °C), πραγματοποιήθηκε ανανέωση σε TSB (Tryptone Soy Broth) στους 37°C για 24h. Παρόμοια

ανανέωση (TSB στους 37 °C για 24 h) έγινε και την επόμενη μέρα. Τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν :

1. *Escherichia coli* 0157: Atoxinogenic Inco
2. *Listeria monocytogenes* Scott A. Inco
3. *Salmonella Enteridis* PT4
4. *Salmonella Enteridis* PT7
5. *Staphylococcus aureus* NCBF 1499
6. *Enterobacter aerogenes* NCTC 10006 Inco B9
7. *E. coli* 0157: H7 NCTC 13125 UK (Genetically manipulated)
8. *Enterococcus faecium* LQC 20090
9. *Ps aeruginosa* 108928
10. *Aeromonas hydrophila* DSMZ 30187
11. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium B62
12. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach B134
13. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium B193
14. *Yersinia enterocolitica* CITY 650
15. 15188 *Listeria monocytogenes* serotype b.

Τα τρυβλία στα οποία έγιναν οι ενοφθαλμισμοί ήταν TSA (Tryptic Soy Agar). Πριν τον εμβολιασμό είχαμε κάνει 2 δεκαδικές αραιώσεις (στο 12 μικροοργανισμό κάναμε μόνο 1 αραιώση γιατί τα μέρη του μικροοργανισμού δεν είχαν διαλυθεί καλά μέσα στο διάλυμα).

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης των αιθέριων ελαίων του κριτάμου (*Crithmum maritimum*) στους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς ήταν η μέθοδος διάχυσης με χρήση δίσκου σε άγαρ (Balouiri et.al 2016). Η μέθοδος αυτή που αναπτύχθηκε το 1940 (Heatley, 1944) είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται σε πολλά εργαστήρια μικροβιολογίας για ελέγχους ρουτίνας που έχουν σχέση με αντιμικροβιακή ευαισθησία. Στη σημερινή εποχή έχουν δημοσιευτεί και έχουν γίνει αποδεκτά πολλά πρότυπα από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), για ελέγχους σε βακτήρια και ζύμες (CLSI,2004,2012). Αν και δεν μπορούν να ελεγχθούν τα βακτήρια σχολαστικά και με ακρίβεια με αυτή τη μέθοδο, η χρήση της ως πρότυπο έχει φτιαχτεί για τον έλεγχο βακτηριακών παθογόνων όπως ο *Streptococci*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Neisseria meningitidis*, με χρήση ειδικών μέσων καλλιέργειας, σε διάφορες συνθήκες επώασης και κριτήρια ερμηνείας για τις διάφορες ζώνες αναστολής (CLSI,2012). Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, τρυβλία με άγαρ εμβολιάζονται με ένα τυποποιημένο εμβόλιο του προς έλεγχο μικροοργανισμού. Κατόπιν, δίσκοι διηθητικού χαρτιού (διαμέτρου περίπου 6mm), που περιέχει την προς έλεγχο ένωση σε μία επιθυμητή συγκέντρωση τοποθετούνται στην επιφάνεια του άγαρ Τα τρυβλία Petri επωάζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Γενικά, ο αντιμικροβιακός παράγοντας διαχέεται μέσα στο άγαρ και αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό έλεγχο και τότε μετρώνται οι διάμετροι ανάπτυξης των ζωνών αναστολής.

Στο πείραμά μας, ποσότητα 100 μl λαμβάνονταν με την μικροπιπέττα από εναιώρημα που περιείχε τα παθογόνα, και επιστρώνονταν σε τρυβλία με TSA, ώστε να υπάρχει ένας αριθμός βακτηριακών κυττάρων περί τα 10^4 cfu ανα τρυβλίο. Επειδή με την μικροπιπέττα

δεν μπορούσε να γίνει λήψη του ελαίου από τα μικρά δοχεία των 1 ml, μεταφέραμε το έλαιο σε erendorf tubes των 150 μl στα οποία ήταν δυνατή η λήψη ελαίου με την μικροπιπέττα. Επειδή η ποσότητα ελαίου ήταν πολύ μικρή, τελικά ενοποιήσαμε τις 2 μικρότερες ποσότητες ελαίου των δειγμάτων σε ένα erendorf tube. Έτσι, ενώ αρχικά είχαμε αποφασίσει να χρησιμοποιήσουμε 3 κυκλικά χαρτάκια τύπου Whatman διαμέτρου 5mm, τελικά χρησιμοποιήσαμε 2 χαρτάκια για κάθε τρυβλίο. Τα 2 αυτά χαρτάκια τύπου Whatman των 11 μm, εμβαπτίστηκαν σε ποσότητα 10 μl ελαίου από τη μία πλευρά και τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο από την άλλη. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37 °C για περίπου τρεις έως πέντε ημέρες.

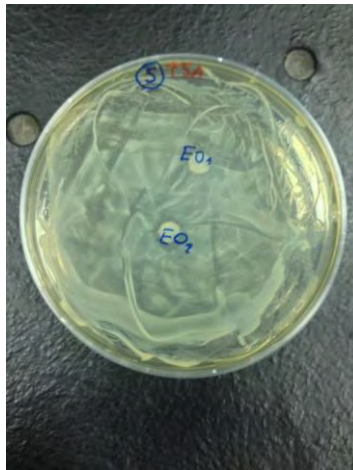
Μετά την επώαση τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ένα – ένα ξεχωριστά σε φωτιζόμενη βάση και με τη χρήση ενός χάρακα μετρήθηκαν οι διάμετροι των τυχόν αναπτυχθέντων δακτυλίων. Η τελική μέτρηση της διαμέτρου για κάθε αναπτυχθέντα δακτύλιο, προέκυψε από τρεις μετρήσεις δακτυλίων για κάθε τρυβλίο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε σε 2 επαναλήψεις, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω ως αποτελέσματα 1^{ης} παρατήρησης και 2^{ης} παρατήρησης. Στις κατωτέρω φωτογραφίες παρουσιάζονται τα τρυβλία στα οποία εμφανίζεται η επίδραση του αιθέριου ελαίου του κριτάμου με τη μορφή δακτυλίου γύρω από τα χαρτάκια Whatman. Δηλαδή το αιθέριο έλαιο του κριτάμου ήταν περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

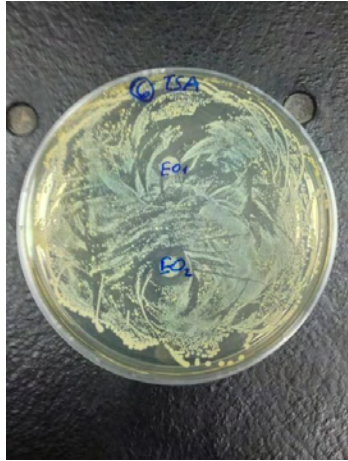
Όπως περιγράφηκε παραπάνω κατά την 1^η Παρατήρηση, δημιουργήθηκαν ζώνες ανάσχεσης σε εμβολιασμένο με παθογόνα βακτήρια θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman .

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Enteridis* (PT7 Surrey UK) υπόστρωμα, δημιουργήθηκε ζώνη ανάσχεσης (δακτύλιος) στη θέση EO2 , ενώ στην θέση EO1 δεν έχουμε ζώνη ανάσχεσης φαίνεται ότι οι συνθήκες ανάπτυξης ζώνης ανάσχεσης είναι ευνοϊκότερες στη θέση EO2.



Εικόνα 2: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στη θέση EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Enteridis* (PT7 Surrey UK)

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* (NCBF 1499 Drosinos)σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman , παρατηρείται παρόμοια κατάσταση όσον αφορά στις θέσεις EO1 και EO2.



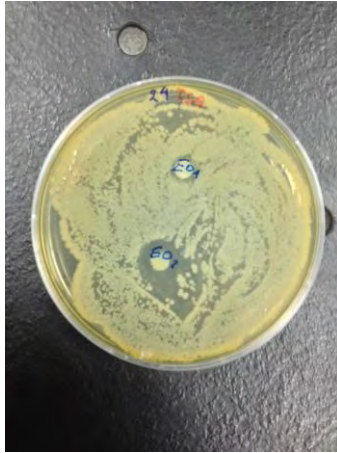
Εικόνα 3: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στη θέση EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* (NCBF 1499 Drosinos)

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* serotype 4b σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman , παρατηρούμε ότι και στις 2 θέσεις EO1 και EO2 έχουμε δημιουργία ζωνών ανάσχεσης και καθεαυτά ευαισθησία στο έλαιο.



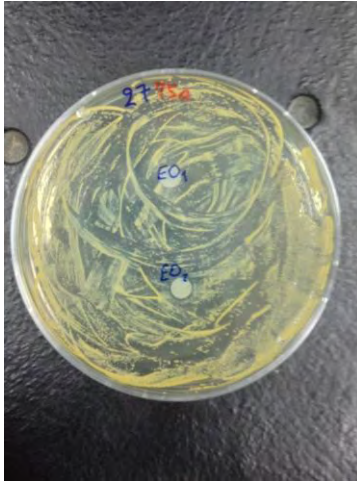
Εικόνα 4: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στις θέσεις EO1 και EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* serotype 4b

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο υπόστρωμα *Aeromonas hydrophila* DSMZ 30187, δημιουργήθηκε ζώνη ανάσχεσης (δακτύλιος) στη θέση EO2 , ενώ στην θέση EO1 δεν έχουμε ζώνη ανάσχεσης φαίνεται ότι οι συνθήκες ανάπτυξης ζώνης ανάσχεσης είναι ευνοϊκότερες στη θέση EO2.



Εικόνα 5: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στη θέση EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Aeromonas hydrophila* DSMZ 30187

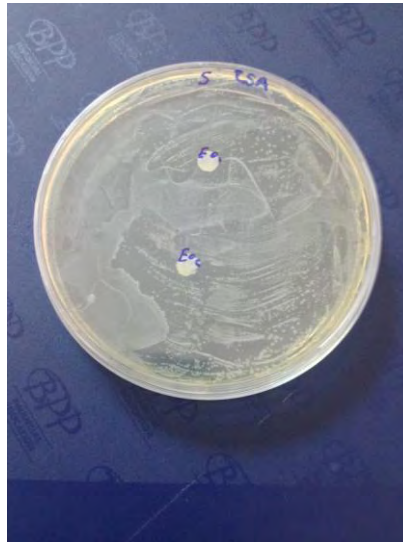
Στο εμβολιασμένο με το παθογόνα βακτήριο *Staphylococcus aureus* subsp σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman , παρατηρούμε ότι και στις 2 θέσεις EO1 και EO2 έχουμε δημιουργία ζωνών ανάσχεσης και συνεπώς ευαισθησία στο έλαιο.



Εικόνα 6: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στις θέσεις EO1 και EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο

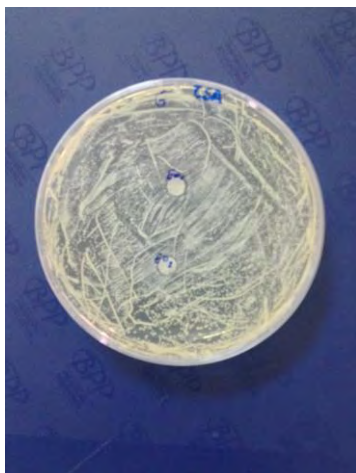
Κατά την **2^η Παρατήρηση**, η οποία πραγματοποιήθηκε έπειτα από 2 μέρες ,δημιουργήθηκαν ζώνες ανάσχεσης σε εμβολιασμένο με παθογόνα βακτήρια θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman .

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Enteridis* (PT7 Surrey UK) υπόστρωμα, ενώ στην 1^η παρατήρηση είχαμε μόνο στη θέση EO2, τώρα δημιουργήθηκε ζώνη ανάσχεσης (δακτύλιος) και στη θέση EO1 .



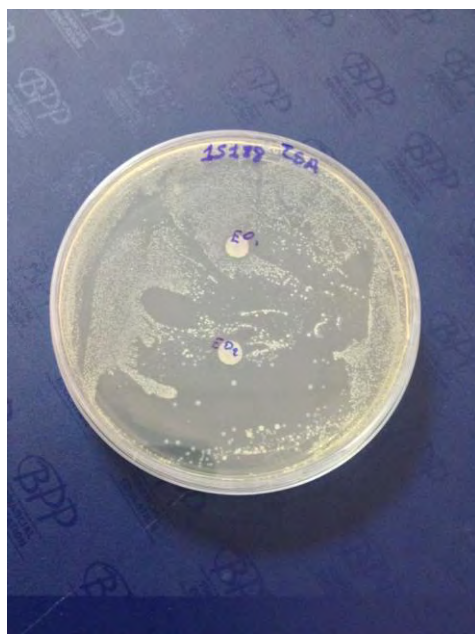
Εικόνα 7: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στη θέση EO1 , σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Enteridis* (PT7 Surrey UK)

Στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* (NCBF 1499 Drosinos) σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman , παρατηρούμε ότι και στις 2 θέσεις EO1 και EO2 έχουμε δημιουργία ζωνών ανάσχεσης (δακτύλιοι) και συνεπώς ευαισθησία στο έλαιο.



Εικόνα 8: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στις θέσεις EO1 και EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* (NCBF 1499 Drosinos) που δείχνει την ευαισθησία του μικροοργανισμού σε αυτό.

Όπως και στη 1^η Παρατήρηση, έτσι και εδώ, στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* serotype 4b σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman, παρατηρούμε ότι και στις 2 θέσεις EO1 και EO2 έχουμε δημιουργία ζωνών ανάσχεσης με ευαισθησία στο έλαιο.



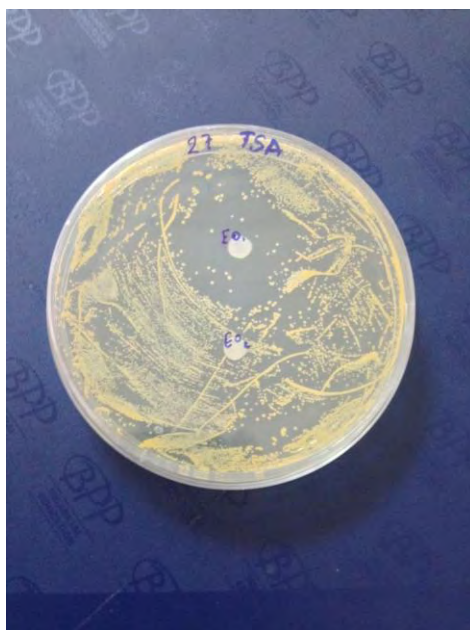
Εικόνα 9: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στις θέσεις EO1 και EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes serotype 4b*.

Σε αντίθεση με την 1^η Παρατήρηση, στη 2^η, το εμβολιασμένο με το παθογόνα βακτήρια *Aeromonas hydrophila* (DSMZ 30187) σε θρεπτικό μέσο TSA μετά την τοποθέτηση εμποτισμένων με έλαιο κριτάμου χάρτινων δίσκων Whatman, παρατηρούμε ότι και στις 2 θέσεις EO1 και EO2 έχουμε δημιουργία ζωνών ανάσχεσης (δακτύλιοι) και συνεπώς ευαισθησία στο έλαιο.



Εικόνα 10: Δημιουργία ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στις θέσεις EO1 και EO2, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Aeromonas hydrophila* (DSMZ 30187).

Σε αντίθεση με την πρώτη παρατήρηση στο εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* subsp υπόστρωμα, δημιουργήθηκε μια ιδιαίτερα μεγάλη ζώνη ανάσχεσης (δακτύλιος) στη θέση EO1, ενώ στην θέση EO2 δεν έχουμε ζώνη ανάσχεσης .



Εικόνα 11: Δημιουργία ιδιαίτερου μεγάλου μεγέθους ζώνης ανάσχεσης γύρω από το χαρτί Whatman εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο κριτάμου στη θέση EO1, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εμβολιασμένο με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* subsp.

Στον παρακάτω πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος, όπου παρουσιάζονται οι διάμετροι των δακτυλίων που αναπτύχθηκαν στις θέσεις EO1 και EO2 αντίστοιχα, τόσο κατά την 1^η όσο και τη 2^η παρατήρηση.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα Πειράματος στον οποίο παρουσιάζονται οι διάμετροι των δακτυλίων που αναπτύχθηκαν στις θέσεις EO1 και EO2 για τη 1η και 2η Παρατήρηση.

Μικροοργανισμός	Διάμετροι δακτυλίων που αναπτύχθηκαν σε (cm)			
	1η Παρατήρηση		2η Παρατήρηση	
	Θέση EO ₂	Θέση EO ₁	Θέση EO ₂	Θέση EO ₁
<i>Salmonella Enteridis</i> PT7 Surrey UK	1,1	-	-	0,9
	1,0	-	-	0,6
	0,8	-	-	1,2
Μέση τιμή μεγέθους διαμέτρου δακτυλίου	0,97	-	-	0,90
<i>Staphylococcus aureus</i> NCBF 1499 Drosinos	1,0	1,3	0,6	0,7
	1,1	1,5	0,6	0,9
	1,2	1,5	0,7	0,7
Μέση τιμή μεγέθους διαμέτρου δακτυλίου	1,10	1,43	0,63	0,77
<i>Aeromonas hydrophila</i> DSMZ 30187	0,7	-	0,7	1,1
	0,8	-	2,1	1,1
	0,9	-	0,6	1
Μέση τιμή μεγέθους διαμέτρου δακτυλίου	0,80	-	1,13	1,07
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp	0,65	-	-	4,2
	0,65	-	-	3,4
	0,65	-	-	4,1
Μέση τιμή μεγέθους διαμέτρου δακτυλίου	0,65	-	-	3,9
<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 4b	0,7	0,8	1,3	1,5
	0,9	1,3	2,7	0,7
	0,7	1,1	3,5	2,9
Μέση τιμή μεγέθους διαμέτρου δακτυλίου	0,77	1,07	2,50	1,70

Στον παρακάτω πίνακα καθορίζονται τα παθογόνα στελέχη στα αντίστοιχα τρυβλία.

Πίνακας 3. Ο κωδικός τρυβλίου και τα αντίστοιχα παθογόνα στελέχη που εξετάστηκαν

Νο Τρυβλίου	Παθογόνο στέλεχος (Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής)
5	<i>Salmonella Enteridis</i> PT7 Surrey UK
6	<i>Staphylococcus aureus</i> NCBF 1499 Drosinos
24	<i>Aeromonas hydrophila</i> DSMZ 30187
27	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. Aureus
15188	<i>Listeria monocytogenes</i>

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όσον αφορά στις μελέτες άλλων ερευνητών για την αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων από φυτά, οι Deans and Ritchie (1987), εξέτασαν 50 φυτικά αιθέρια έλαια για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες έναντι 25 γενών βακτηριδίων. Τα αιθέρια έλαια που είχαν τις πιο ανασταλτικές κατά των βακτηρίων, ιδιότητες ήταν τα αιθέρια έλαια από θυμάρι, κανέλλα, πικραμύγδαλο, λουίζα, μαντζουράνα, αγγελική και μοσχοκάρυδο. Επίσης οι Singh et al. (2003) εξέτασαν την αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων από φυτά ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση κατά της *Listeria monocytogenes* σε hotdog. Τα πειράματά τους έδειξαν ότι πιο αποτελεσματικά ήταν τα αιθέρια έλαια από θυμάρι, γαρύφαλλο και μπαχάρι. Ακόμη οι Swamy et al (2016) σε ένα άρθρο ανασκόπησης διερεύνησαν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων από φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά κατά παθογόνων που βλάπτουν τον άνθρωπο καθώς και τους πιθανούς μηχανισμούς που δρουν τα αιθέρια έλαια κατά την αντιμικροβιακή τους δράση. Τέλος οι Semeniuc et al (2017) έκαναν σύγκριση των αντιβακτηριακών επιδράσεων αρκετών αιθερίων ελαίων από μαϊντανό, βασιλικό και θυμάρι τόσο από μόνα τους όσο και σε συνδυασμό μεταξύ τους, κατά διαφόρων Gram+ και Gram- βακτηριδίων που σχετίζονται με τρόφιμα. Διεπίστωσαν ότι τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση είχαν τα αιθέρια έλαια από θυμάρι.

Όσον αφορά στο αιθέριο έλαιο του κριτάμου, οι Kulisic – Bilusic et al (2009) διεπίστωσαν μεταξύ άλλων ότι το αιθέριο έλαιο του κριτάμου έδειξε να έχει ισχυρή ανασταλτική δράση στην οξείδωση της ανθρώπινης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης. Επίσης οι Nabet et al (2017) προσδιόρισαν τη σύσταση των αιθερίων ελαίων του κριτάμου και διαπίστωσαν ότι αυτά είχαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τις παρατηρήσεις των τρυβλίων καθώς και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2, δακτύλιους ευαισθησίας ανέπτυξαν τα Gram θετικά βακτήρια.

Κατά την 1^η παρατήρηση, μεγαλύτεροι δακτύλιοι αναπτύχθηκαν για τους μικροοργανισμούς *Salmonella Enteridis* PT7 Surrey UK και *Staphylococcus aureus* NCBF 1499 Drosinos για τη θέση EO₂ καθώς και για τους μικροοργανισμούς *Aeromonas hydrophila* DSMZ 30187 και *Listeria monocytogenes* serotype 4b για τη θέση EO₁ (βλέπε Πίνακα 2).

Κατά την 2^η παρατήρηση, μεγαλύτεροι δακτύλιοι αναπτύχθηκαν κυρίως για τους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus* subsp αλλά και για το *Listeria monocytogenes* serotype 4b για τη θέση EO₁ καθώς και για τους μικροοργανισμούς *Aeromonas hydrophila* DSMZ 30187 και *Listeria monocytogenes* serotype 4b για τη θέση EO₂ (βλέπε Πίνακα 2).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-Dagal, M.M., Bazaraa, W.A. (1999) Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62: 51-56.
- Ariyapitipun T., Mustapha A., Clarke A.D. (2000) Survival of *Listeria monocytogenes* ScottA on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. *Journal of Food Protection*, 63: 131-136.
- Balouiri M., M. Sadiki, S. K. Ibnsouda (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. of Pharm. Anal.* 6:71–79

- Borderías AJ, Sánchez-Alonzo I, Pérez-Mateos M.(2005). New applications of fibres in foods: addition to fishery products. *Trends Food Sci. Technol.*:16:458–65.
- Boskou G., Debevere J. (2000) Shelf life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants*, 17: 17–25.
- Βουρλιώτη – Αράπη Φ. (2010). Μελέτη των αιθερίων ελαίων του γένους *Juniperus* sp. Της Ελληνικής χλωρίδας: Χημική σύσταση και βιοδραστικότητα. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών ΠΜΣ Γενικού Τμήματος «Θετικές Επιστήμες και Γεωπονία» Κλάδος ΙΙΙ: Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων, σελ. 112
- Boziaris I.S., Adams M.R. (2000) Transient sensitivity to nisin in cold-shocked Gram negatives *Letters in Applied Microbiology*, 31: 233-237.
- Boziaris I.S., Humpheson L., Adams M.R. (1998) Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 7-13.
- Brillet A., Pilet M. F., Prevost H., Bouttefroy A., Leroi F. (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1029-1037.
- Chandini SK, Ganesan P, Suresh PV, Bhaskar N.(2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem.*:107:707–13.

- CLSI, (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- CLSI, (2004) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- Deans S. G. and G. Ritchie (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Intern. Journal of Food Microbiology*, 5: 165-180
- Dragnes BT, Stormo SK, Larsen R, Ernstsens H, Elvevoll EO. (2009). Utilization of fish industry residuals: screening the taurine concentration and angiotensin converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. *J. Food Comp. Anal.*: 22:714–7.
- Duarte K, Rocha-Santos TAP, Freitas AC, Duarte AC. (2012). Discovery of bioactive compounds from marine fungi: current analytical techniques and future perspectives. *Trends Anal. Chem.*:34:97-110.
- Economou T., Pournis N., Ntzimani A., Savvaidis I.N. (2009) Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf life. *Food Chemistry*, 114: 1470-1476.
- Eriksen NT. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*:80:1-14.
- Fernandes JC, Tavarria FK, Soares JC, Ramos OS, Monteiro MJ, Pintado ME, et al. (2008) Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.*:25:922–8.

- Food and Drug Administration-FDA (2009) Listing of food additives status. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm>.
- Freitas A.C., Rondrigues D., Rocha-Santos Ter. A.P., Gomes A.M.P., Duarte A.C. (2012). Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnol. Adv.*: 30: 1506-1515.
- Gamal AA. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.*: 18:1-25.
- Ganesan P, Chandini SK, Bhaskar N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.*:99:2717–23.
- Gonzalez-Fandos E., Dominguez J.L. (2007) Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18: 842-846.
- Guerard F, Decourcelle N, Sabourin C, Floch-Lazet C, Le Grel L, Le Floch P, et al. (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *J. Sci. Hal. Aquat.* 2:21–7.
- Gupta S, Abu-Ghannam N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci. Technol.*:22:315–26.
- Hayes M, Carney B, Slater J, Brück W. (2008). Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan—part B: applications. *Biotechnol. J.*: 3:878–89.
- Heatley, N. (1944) A method for the assay of penicillin, *Biochem.J.*38: 61-65
- Holdt SL, Kraan S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.*: 23:543–97.

- Honkanen P. (2009). Consumer acceptance of (marine) functional food. In: Luten J, editor. The Nordic Network on Marine Functional Food (MARIFUNC) p. 141–54.
- Honorkar H, Barikani M.(2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem.*; 140:1403–20.
- Hurst D. (2006).Marine functional foods and functional ingredients. *Marine Foresight Series*, 5. ;. p. 17–20.
- Iafelice G, Caboni MF, Cubadda R, Di Criscio T, Trivisonno MC, Marconi E. (2008). Development of functional spaghetti enriched with long chain omega-3 fatty acids. *Cereal Chem.*; 85:146–51.
- Imhoff JF, Labes A, Wiese J. (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol. Adv.*;29:468–82.
- Je J, Park P, Kim E, Park J, Yoon H, Kim K, et al. (2009) Antioxidant activity of enzymatic extracts from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* by electron spin resonance spectroscopy. *LWT-Food Sci. Technol.*;42:874–8.
- Kadam SU, Prabhasankar P. (2010). Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Res. Int.*;43:1975–80.
- Khanjari A., Karabagias I.K., Kontominas M.G. (2013) Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 53: 94-99.
- Kim S, Wijesekara I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *J Funct Foods*;2:1–9.

- Kulisic – Bilusic T., Blazevic I. Dejanovic B. Mladen M., and Pifat G3 (2010) Evaluation Of the Antioxidant Activity of Essential Oils from Capper (*Capparis Spinosa*) and Sea Fennel (*Crithmum Maritimum*) by Different Methods. Journal of Food Biochemistry 34: 286–302.
- Laurienzo P.(2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. Mar Drugs;8:2435–65.
- Lee Y.-L., Cesario T., Owens J., Shanbrom E., Thrupp L. D. (2002) Antibacterial activity of citrate and acetate. Nutrition, 18: 665–666.
- Mallappa Kumara , Mohd Sayeed Akhtar, and Uma Rani Sinniah (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2016, Article ID 3012462, 21 pages
- Masuda K, Guo X, Uryy N, Hagiwara T, Watabe S.(2008). Isolation of marine yeasts collected from the Pacific Ocean showing a high production of γ -Aminobutyric acid. Biosci. Biotechnol. Biochem.;72:3265–72.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS.(2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable Sustainable Energy Rev;14:217–32.
- Myashita K, Hosokawa M. (2008). Beneficial health effects of seaweed carotenoid, fucoxanthin. In: Barrow C, Shahidi F, editors. Marine nutraceuticals and functional foods. Boca Raton: CRC Press;. p. 297–320.

- Neetoo H., Ye M., Chen H. (2008) Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 220–227.
- Ngo D, Wijesekara I, Vo T, Ta QV, Kim S. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. *Food Res. Int.*;44: 523–9.
- Nychas G.J.E., Skandamis P., Tassou C.C. (2003) Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller S. (ed) *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK, pp. 176-200.
- Pangestuti R, Kim S. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Funct. Foods*;3:155–266.
- Παρλαπάνη (2012) Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. σελ. 312.
- Pomin VH.(2009) An overview about the structure–function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers*;91: 601–9.
- Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Stephen N, owda LR, et al.(2009). Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: chemical, functional and structural evaluation. *Food Chem.*;115:501–8.
- Rasmussen RS, Morrissey M. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Adv. Food Nutr. Res.*;52:237–92.

- Sallam K. I. (2007) Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon Food Control, 18: 566–575.
- Semeniuc C. A., C. R. Pop-Ancut and M. Rotar (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of food and drug analysis 25: 403 - 408
- Siegrist M, Stampfli N, Kastenholz H. (2008) Consumer's willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. Appetite;51:526–9.
- Singh A., R.K. Singh, A.K. Bhunia, N. Singh (2003) Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 36: 787–794.
- Skandamis P. N., Davies K.W., McClure P. J., Koutsoumanis K., Tassou C. (2002b) Avitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. Food Microbiology, 19: 405-421.
- Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G-J. E. (2002a) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5oC under aerobic,VP/MAP conditions. Food Microbiology, 19: 97-103.
- Spolaore P, Jaonnis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng.;101:87–96.\
- Surekha M., Reddy S.M. (2000) Preservatives. Classification and properties. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel C. (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. New York Academic Press, pp. 1710-1717.

- Thomas V.L., Delves-Broughton J. (2005) Nisin. In: Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.) Antimicrobials in Food. 3rd Edition, CRC Press, pp. 237-274.
- Thomas L.V. (2000) Preservatives. Sorbic acid. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, C. (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. New York Academic Press, pp. 1769-1776.
- Vatavali K., Karakosta L., Nathanailides C., Georgantelis D., Kontominas M.G. (2012) Combined Effect of Chitosan and Oregano Essential Oil Dip on the Microbiological, Chemical, and Sensory Attributes of Red Porgy (*Pagrus pagrus*) Stored in Ice Food Bioprocess Technol. DOI 10.1007/s11947-012-1034-z.
- Verardo V, Ferioli F, Riccio Y, Iafelice G, Marconi E, Caboni MF. (2009). Evaluation of lipid oxidation in spaghetti pasta enriched with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids under different storage conditions. Food Chem.;114:472-7.
- Wan Norhana M.N., Poole S. E., Deeth H. C., Gary A. (2012) Dykes Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4°C. Food Microbiology, 31: 43-50.
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr. Polym.;84: 14-21.
- Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J. (2011). Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. Food Hydrocolloids; 25:170-9.
- Zhang S.S., Mustapha A. (1999) Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. Journal of Food Protection, 62: 1123-1127.

Zhuang R.-Y., Huang Y.-W., Beuchat L.R. (1996) Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. *Journal of Food Science*, 61: 241–244, 261.

ABSTRACT

In this diploma thesis the influence of the essential oil of (*Crithmum maritimum*) on microorganisms isolated from food is investigated. The essential oil was used as a natural antimicrobial. The use of natural antimicrobials taken from plants, such as essential oils, is of great interest because they have both antimicrobial and antioxidant action. To achieve the goal of our work, a sufficient amount of plants were harvested by hand, they were dried in a drying chamber, their dry weight was determined, and after the removing of their shoots, their leaves were crushed and three samples were taken from the remaining material, to which deionized water was added. Thereafter, the samples were distilled off on a Clevenger apparatus and the distillate was obtained. Then, 15 strains of pathogens were isolated and vaccinated in agar plates after dilution of the solution. The methodology followed in order to investigate the effect of essential oil on the pathogenic microorganisms was the Agar disk - diffusion method. The experimental process was completed in two iterations. Filtering paper disks impregnated with the essential oil were placed at 2 points of each plate and then the plates were placed in an incubation chamber for 3-5 days. After being allowed to incubate for 3 days, it was determined whether or not inhibition growth zones were created for the pathogens tested, around each disk of filter paper containing the conventional oil. In the case of the creation of any inhibition zone, its diameter was measured. A 2nd observation followed 2 days later. The results showed that inhibition growth zones were created only for the pathogens due to Gram + bacteria.

Key words: Plant essential oils, antimicrobial action, food-borne pathogens