



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Τοξικολογικοί δείκτες μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης:
μελέτη και πολυπαραμετρική ανάλυση σε
μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό**

ΓΛΥΚΕΡΙΑ Α. ΒΕΛΙΒΑΣΗ

Χημικός M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**Τοξικολογικοί δείκτες μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης:
μελέτη και πολυπαραμετρική ανάλυση σε
μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό**

ΓΛΥΚΕΡΙΑ Α. ΒΕΛΙΒΑΣΗ

Χημικός M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2ος Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Βελιβάση Γλυκερίας: 14-11-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 846α/27-03-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Μπούμπα Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία

Μέλη:

Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Κουρκουμέλης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-04-2018

«Τοξικολογικοί δείκτες μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης: μελέτη και πολυπαραμετρική ανάλυση σε μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1018^α/30-06-2022

1. Μπούμπα Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κωνσταντή Μαρία, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κοβάτση Λήδα-Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας-Επιστημονικό πεδίο: Μοριακή Ιατροδικαστική και Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 07-07-2022

Ιωάννινα 03-11-2022

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Με αγάπη
στον σύζυγό μου, Μιχάλη
και τη νεογέννητη κορούλα μας

Με σεβασμό
στην Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου,
κ. Βασιλική Μπούμπα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Βασικός σκοπός της διατριβής αυτής, ήταν η διερεύνηση των τοξικολογικών δεικτών που επηρεάζουν την μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης, σε μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό, η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση τους και η ποσοτικοποίηση της επίδρασής τους με την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων.

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια της διατριβής ήταν η Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία κ. Βασιλική Μπούμπα, την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερα και θερμά για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Χωρίς την υποστήριξη και τις συμβουλές της θα ήταν αδύνατη η επίτευξη του στόχου μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την άριστη συνεργασία και τη συνεισφορά του στην πολυπαραμετρική ανάλυση, την κατασκευή των μαθηματικών μοντέλων και τη συγγραφή ερευνητικών εργασιών. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη συμβολή του στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα υλοποίησης μέρους της διατριβής μου, που αφορούσε τις μικροβιακές καλλιέργειες, στο εργαστήριο Μικροβιολογίας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον αείμνηστο Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας Ηρακλή Σακκά για την ευχάριστη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην παρούσα εργασία, όπως και τον κ. Πέτρο Μποζίδη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, για τις συμβουλές και παρατηρήσεις του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Λήδα-Καλλιόπη Κοβάτση για την άριστη συνεργασία και συγκεκριμένα, την παραχώρηση βιολογικών υλικών από περιστατικά νεκροτομών.

Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Μαρία Κωνσταντή και τον Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Σωτήριο Χατζήκακού για την τιμή να αποτελέσουν μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Οφείλω να ευχαριστήσω το Τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την παραχώρηση φιαλιδίων αίματος από υγιείς εθελοντές αιμοδότες, με σκοπό την προετοιμασία μικροβιακών καλλιεργειών σε μετουσιωμένο αίμα.

Απευθύνω, επίσης, τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής με έμφαση στη Δικαστική Παθολογική Ανατομική κ. Αντιγόνη Μητσέλου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας κ. Κλειώ Φραγκούλη, την κ. Χαρά Μυστακίδου, μέλος ΕΤΕΠ Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας, τις Επικουρικές Ιατροδικαστές κ. Χρυσαιγή Κούση και κ. Σαββίνα Τσουλτσίδου, το Επικουρικό Προσωπικό κ. Φωτεινή Αλβανοπούλου και κ. Βασίλειο Παπαχαρίση, την υποψήφια διδάκτορα κ. Δήμητρα Φλώρου και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ. Θάλεια Βλάχου και κ. Παρασκευή Εξαδάκτυλου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ακόμη, οφείλω να αναφέρω ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή ενισχύθηκε με χρηματοδότηση από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), στο πλαίσιο της οριζόντιας Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» - 2^{ος} Κύκλος, του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» (ΕΣΠΑ 2014-2020), και κωδικό MIS: 5000432.

Τέλος, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου οφείλω στον σύζυγό μου, Μιχάλη, τους γονείς μου, Αιμίλιο και Ελένη και τα αδέρφια μου, Μιχάλη και Χρυσή για την αγάπη και την αμέριστη στήριξή τους.

Γλυκερία Α. Βελιβάση

Ιωάννινα, Ιούλιος 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ.....	xxiii
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	xxxι
ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ABBREVIATIONS.....	xli
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Αιθανόλη.....	1
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	1
1.1.2 Επιπτώσεις από την κατανάλωση αλκοόλ.....	4
1.1.3 Απορρόφηση αιθανόλης.....	6
1.1.4 Κατανομή της αιθανόλης.....	7
1.1.5 Μεταβολισμός της αιθανόλης.....	9
1.1.5.1 Οξειδωτικός μεταβολισμός.....	9
1.1.5.2 Μη οξειδωτικός μεταβολισμός.....	12
1.1.6 Απέκκριση της αιθανόλης.....	13
1.1.6.1 Απέκκριση της αιθανόλης στα ούρα.....	13
1.1.6.2 Πνευμονική απέκκριση της αιθανόλης.....	14
1.1.6.3 Απέκκριση της αιθανόλης με τον ιδρώτα.....	14
1.1.7 Μεταβολικές επιδράσεις της αιθανόλης.....	15
1.2 Προέλευση της μεταθανάτιας αιθανόλης.....	17
1.2.1 Κατανάλωσης αιθανόλης εν ζωή.....	17
1.2.1.1 Αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG).....	20
1.2.1.2 Θεϊκός αιθυλεστέρας (EtS).....	23
1.2.1.3 Φωσφορικός αιθυλεστέρας (EtP).....	24
1.2.1.4 Φωσφατιδυλαιθανόλη (PEth).....	25
1.2.1.5 Αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEEs).....	28
1.2.1.6 Οξειδωτικά προϊόντα του μεταβολισμού της αιθανόλης.....	30

1.2.1.7 Μεταβολίτες της σεροτονίνης	31
1.2.2 Ενδογενής αλκοολογένεση εν ζώη.....	33
1.2.2.1 Αιτιολογία και παθοφυσιολογία του ABS.....	34
1.2.2.2 Ιατροδικαστική σημασία της ενδογενώς παραγόμενης αιθανόλης	36
1.2.3 Μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης.....	38
1.2.3.1 Διαδικασία σήψης.....	39
1.2.3.1.1 Μεταθανάτια αποσύνθεση από ενδογενή ένζυμα.....	40
1.2.3.1.2 Μεταθανάτια αποσύνθεση από μικροοργανισμούς.....	42
1.2.3.2 Δείκτες μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης	44
1.2.3.2.1 Ανώτερες αλκοόλες σε περιστατικά νεκροτομών	45
1.2.3.2.2 Παραγωγή ανώτερων αλκοολών μετά τη δειγματοληψία	46
1.2.3.2.3 Ανώτερες αλκοόλες στο αίμα ζωντανών ατόμων	47
1.2.3.2.4 Ο ρόλος της 1-προπανόλης.....	48
1.3 Μηχανισμός μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης-Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής μεταθανάτιων πτητικών ενώσεων.....	49
1.3.1 Μεταβολισμός των μικροβίων υπό αναερόβιες συνθήκες.....	49
1.3.2 Οι υδατάνθρακες ως μικροβιακά υποστρώματα	52
1.3.2.1 Αλκοολική ζύμωση από ζυμομύκητες και βακτήρια	52
1.3.2.2 Γαλακτική ζύμωση	54
1.3.2.3 Μικτή ζύμωση οξέων και βουτανοδιόλης.....	57
1.3.2.4 Ζύμωση βουτυρικού και βουτανόλης-ακετόνης.....	59
1.3.2.5 Χαρακτηριστικά των ζυμώσεων των υδατανθράκων.....	61
1.3.3 Τα αμινοξέα ως μικροβιακά υποστρώματα.....	62
1.3.3.1 Μικροβιακός σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών	62
1.3.3.2 Σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από ζυμομύκητες	64
1.3.3.3 Σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από βακτήρια	66
1.3.3.4 Σχηματισμός αιθανόλης από τη θρεονίνη	67

1.3.3.5 Χαρακτηριστικά του σχηματισμού ανώτερων αλκοολών.....	67
1.3.4 Η γλυκερόλη ως μικροβιακό υπόστρωμα	68
1.3.4.1 Χαρακτηριστικά των μονοπατιών μεταβολισμού της γλυκερόλης.....	72
1.3.5 Τα λιπαρά οξέα ως μικροβιακά υποστρώματα	73
1.3.6 Μικροβιακή παραγωγή άλλων πτητικών ενώσεων	75
1.4 Κατανομή της αιθανόλης στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά	77
1.4.1 Μεταθανάτια βιολογικά υλικά για τον προσδιορισμό της αιθανόλης.....	78
1.4.1.1 Βιολογικά υγρά	79
1.4.1.1.1 Αίμα.....	79
1.4.1.1.2 Υαλοειδές υγρό.....	81
1.4.1.1.3 Ούρα	82
1.4.1.1.4 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό.....	83
1.4.1.1.5 Χολή	84
1.4.1.1.6 Γαστρικό περιεχόμενο	84
1.4.1.2 Δείγματα ιστών.....	85
1.4.1.2.1 Ήπαρ.....	85
1.4.1.2.2 Εγκέφαλος	85
1.4.1.2.3 Νεφροί.....	86
1.4.1.2.4 Μυελός των οστών	86
1.4.1.2.5 Σκελετικός μυς.....	86
1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού αιθανόλης.....	88
1.5.1 Χημικές μέθοδοι	88
1.5.2 Βιοχημική μέθοδος	89
1.5.3 Αέρια χρωματογραφία	89
1.5.4 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας	93
1.6 Σκοπός της μελέτης	94

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	97
2.1 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC).....	97
2.1.1 Αναλύτες και διαλύματα αυτών	97
2.1.2 Ενόργανη διάταξη	98
2.1.3 Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία.....	100
2.1.4 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ουσιών	101
2.1.5 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας.....	102
2.2 Μικροβιακές καλλιέργειες.....	105
2.2.1 Μικροβιακά στελέχη.....	105
2.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα	108
2.2.3 Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος.....	111
2.2.3.1 Παρασκευή των βακτηριακών εναιωρημάτων	111
2.2.3.2 Παρασκευή του μυκητιακού εναιωρήματος.....	111
2.2.4 Ενοφθαλμισμός εναιωρημάτων.....	112
2.2.5 Βακτηριακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα....	119
2.2.6 Μυκητιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα με προσθήκη δεξτρόζης 5% w/v ή αυξανόμενων συγκεντρώσεων γλυκόζης	120
2.2.7 Μέτρηση αριθμού μικροβιακών αποικιών.....	120
2.2.7.1 Μέτρηση αριθμού βακτηριακών αποικιών.....	121
2.2.7.2 Μέτρηση αριθμού μυκητιακών αποικιών.....	122
2.3 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση	123
2.4 Εφαρμογή των μαθηματικών μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών	124
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	125
3.1 Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία	125
3.2 Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης.....	128
3.2.1. Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i>	128

3.2.1.1 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI.....	128
3.2.1.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L.....	129
3.2.1.3 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L.....	130
3.2.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Staphylococcus aureus</i>	131
3.2.3 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Enterococcus faecalis</i>	133
3.2.4 Καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα <i>Candida albicans</i>	133
3.3 Προσδιορισμός πτητικών σε μικροβιακές καλλιέργειες με αέρια χρωματογραφία	136
3.3.1. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI	136
3.3.1.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C	136
3.3.1.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C	146
3.3.1.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 4°C	151
3.3.2. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L	153
3.3.2.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L, σε θερμοκρασία 25°C	153
3.3.2.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L, σε θερμοκρασία 4°C	163
3.3.3. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L	165

3.3.3.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θεραπετικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L, σε θερμοκρασία 25°C	165
3.3.3.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θεραπετικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L, σε θερμοκρασία 4°C	174
3.3.4. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Staphylococcus aureus</i> σε θεραπετικό υλικό BHI.....	176
3.3.4.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Staphylococcus aureus</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C.....	176
3.3.4.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Staphylococcus aureus</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C.....	185
3.3.4.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Staphylococcus aureus</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 4°C.....	190
3.3.5. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Enterococcus faecalis</i> σε θεραπετικό υλικό BHI.....	192
3.3.5.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Enterococcus faecalis</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C.....	192
3.3.5.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Enterococcus faecalis</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C.....	202
3.3.5.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του <i>Enterococcus faecalis</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 4°C.....	208
3.3.6. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπετικό υλικό BHI.....	210
3.3.6.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C.....	210
3.3.6.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C.....	219
3.3.6.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπετικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 4°C.....	224

3.3.7. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό SDB.....	226
3.3.7.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 25°C	226
3.3.7.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 37°C	234
3.3.7.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της <i>Candida albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 4°C	240
3.4 Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης.....	242
3.4.1 Μοντέλο για τον <i>E. faecalis</i> υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες	242
3.4.2 Μοντέλα για την <i>K. pneumoniae</i> υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες.....	243
3.4.3 Μοντέλα για την <i>K. pneumoniae</i> υπό αναερόβιες συνθήκες.....	243
3.4.4 Μοντέλο για την <i>K. pneumoniae</i> τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στο θεραπευτικό υλικό υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες.....	244
3.4.5 Μοντέλο για την <i>K. pneumoniae</i> τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στο θεραπευτικό υλικό υπό αναερόβιες συνθήκες.....	244
3.4.6 Μοντέλο για την <i>K. pneumoniae</i> τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στο θεραπευτικό υλικό υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες.....	244
3.4.7 Μοντέλο για την <i>K. pneumoniae</i> τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στο θεραπευτικό υλικό υπό αναερόβιες συνθήκες.....	245
3.4.8 Μοντέλο για τον <i>S. aureus</i> υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες	245
3.4.9 Μοντέλο για τον <i>S. aureus</i> υπό αναερόβιες συνθήκες	245
3.4.10 Μοντέλο για την <i>C. albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό BHI υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες	246
3.4.11 Μοντέλα για την <i>C. albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό BHI υπό αναερόβιες συνθήκες	246
3.4.12 Μοντέλα για την <i>C. albicans</i> σε θεραπευτικό υλικό SDB υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες	247

3.4.13 Μοντέλα για την <i>C. albicans</i> σε θρεπτικό υλικό SDB υπό αναερόβιες συνθήκες	247
3.5 Εφαρμοσιμότητα των μικροβιακών μοντέλων	249
3.5.1 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C.....	249
3.5.2 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C	252
3.5.3 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών.....	262
3.5.3.1 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών	263
3.5.3.2 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε διάφορα βιολογικά υλικά από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών	274
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	277
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	291
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	293
SUMMARY	297
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	299
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	301

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1: Οξειδωτικές και μη οξειδωτικές μεταβολικές οδοί της αιθανόλης στα ηπατοκύτταρα.....	9
Σχήμα 2: Ταξινόμηση των βιοδεικτών κατανάλωσης αιθανόλης.	19
Σχήμα 3: Ο μεταβολισμός της σεροτονίνης (5-HT) στην αντίστοιχη αλδεΐδη (5-HIAL) από τη μονοαμινοοξειδάση και η μετατροπή της τελευταίας σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA) ή στον ανηγμένο μεταβολίτη 5-υδροξυτρυπτοφόλη (5-HTOL).....	32
Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης και της απέκκρισης της ενδογενούς αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης.	36
Σχήμα 5: Ζύμωση γλυκόζης σε αιθανόλη από ζυμομύκητες και βακτήρια. Οι αντιδράσεις που εμφανίζονται ξεκινούν από το στάδιο του πυροσταφυλικού ως τα τελικά προϊόντα..	53
Σχήμα 6: Ζύμωση γλυκόζης από βακτήρια γαλακτικού οξέος μέσω της ετεροζυμωτικής οδού σε αιθανόλη, γαλακτικό και διοξείδιο του άνθρακα..	56
Σχήμα 7: Μικτή ζύμωση οξέων και βουτανολόλης που πραγματοποιείται από εντεροβακτήρια.....	57
Σχήμα 8: Μεταβολική οδός για το σχηματισμό 1-βουτανόλης και ακετόνης από κλωστρίδια..	60
Σχήμα 9: Αλληλεπίδραση των μεταβολικών οδών των αμινοξέων που εμπλέκονται στο σχηματισμό ανώτερων αλκοολών.....	63
Σχήμα 10: Μεταβολικά μονοπάτια για το μεταβολισμό της λευκίνης, της ισολευκίνης, της βαλίνης και της θρεονίνης σε ισοαμλική αλκοόλη, d-αμλική αλκοόλη, ισοβουτανόλη και 1-προπανόλη, αντίστοιχα, σε ζυμομύκητες και βακτήρια..	65
Σχήμα 11: Μεταβολισμός της γλυκερόλης με σχηματισμό προϊόντων όπως στον μεταβολισμό των υδατανθράκων για ζυμομύκητες, εντεροβακτήρια και κλωστρίδια.....	69

Σχήμα 12: Αναγωγική ζύμωση της γλυκερόλης που οδηγεί στον σχηματισμό προπανοδιόλης, 1-προπανόλης και προπιονικού.....	71
Σχήμα 13: Μεταβολισμός της ακετόνης από μικρόβια.....	74
Σχήμα 14: Σωληνάκια συλλογής αίματος Vacutainer® παρουσία συντηρητικού.	80
Σχήμα 15: Σχηματικό διάγραμμα αέριου χρωματογράφου.	90
Σχήμα 16: Τριχοειδής στήλη σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας.	91
Σχήμα 17: Αέριος χρωματογράφος τύπου Shimadzu GC 17A με σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη τύπου AOC-5000.....	100
Σχήμα 18: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος αναλυτών, χρησιμοποιώντας τη στήλη SUPELCOWAX.....	101
Σχήμα 19: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος αναλυτών, χρησιμοποιώντας τη στήλη VOCOL.	102
Σχήμα 20: Σχηματική απεικόνιση των υποδεκαπλάσιων αραιώσεων των μικροβιακών εναιωρημάτων και μεταφορά ορισμένης ποσότητας σε τρυβλία με τη μέθοδο ενσωμάτωσης ή τη μέθοδο επίστρωσης για τη μέτρηση των μικροβιακών αποικιών.....	121
Σχήμα 21: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 35 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.	129
Σχήμα 22: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 25 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.	130
Σχήμα 23: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L που απεικονίζουν τον αριθμό των	

βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 25 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων. ... 131

Σχήμα 24: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 23 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων..... 132

Σχήμα 25: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 30 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων..... 133

Σχήμα 26: Καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα *Candida albicans* στα καλλιεργητικά υλικά BHI και SDB που απεικονίζουν τον αριθμό των μυκητιακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 21 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων..... 134

Σχήμα 27: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 144

Σχήμα 28: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 145

Σχήμα 29: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 145

Σχήμα 30: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 150

- Σχήμα 31:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.
..... 150
- Σχήμα 32:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.
..... 151
- Σχήμα 33:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 32 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 153
- Σχήμα 34:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L..... 161
- Σχήμα 35:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L. 162
- Σχήμα 36:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L. 163
- Σχήμα 37:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 8 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L. 165

- Σχήμα 38:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L. 172
- Σχήμα 39:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L. 173
- Σχήμα 40:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L. 174
- Σχήμα 41:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 8 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L. 176
- Σχήμα 42:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 183
- Σχήμα 43:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 184
- Σχήμα 44:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 185
- Σχήμα 45:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 189

- Σχήμα 46:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 189
- Σχήμα 47:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 190
- Σχήμα 48:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 192
- Σχήμα 49:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 201
- Σχήμα 50:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 201
- Σχήμα 51:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 202
- Σχήμα 52:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 207
- Σχήμα 53:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 207

- Σχήμα 54:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 208
- Σχήμα 55:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 23 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 210
- Σχήμα 56:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 217
- Σχήμα 57:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI..... 218
- Σχήμα 58:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 218
- Σχήμα 59:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. .. 223
- Σχήμα 60:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. .. 223
- Σχήμα 61:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 224
- Σχήμα 62:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI. 226

- Σχήμα 63:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB..... 232
- Σχήμα 64:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB..... 233
- Σχήμα 65:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB. 234
- Σχήμα 66:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB... 239
- Σχήμα 67:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB... 239
- Σχήμα 68:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB..... 240
- Σχήμα 69:** Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό SDB..... 241

ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 1:** Τυπικά σημεία και συμπτώματα της επίδρασης του αλκοόλ σε σχέση με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. 5
- Πίνακας 2:** Τα βιοχημικά μονοπάτια που ακολουθούνται από τα πιο κοινά είδη μικροβίων που ενεργοποιούνται μεταθανάτια για την παραγωγή αιθανόλης και ανώτερων αλκοολών. 76
- Πίνακας 3:** Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs), εύρη συγκεντρώσεων και R^2 για κάθε αναλύτη. Η στήλη του χρωματογράφου ήταν η SUPELCOWAX^{TM-10}. 127
- Πίνακας 4:** Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs), εύρη συγκεντρώσεων και R^2 για κάθε αναλύτη. Η στήλη του χρωματογράφου ήταν η VOCOLTM. 127
- Πίνακας 5:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)... 136
- Πίνακας 6:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 138
- Πίνακας 7:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 140
- Πίνακας 8:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 142
- Πίνακας 9:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 146

- Πίνακας 10:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 147
- Πίνακας 11:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 148
- Πίνακας 12:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 149
- Πίνακας 13:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 152
- Πίνακας 14:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 152
- Πίνακας 15:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 154
- Πίνακας 16:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 155
- Πίνακας 17:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 157

- Πίνακας 18:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 159
- Πίνακας 19:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 163
- Πίνακας 20:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 164
- Πίνακας 21:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 166
- Πίνακας 22:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 167
- Πίνακας 23:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 169
- Πίνακας 24:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 170

- Πίνακας 25:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 174
- Πίνακας 26:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 175
- Πίνακας 27:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 177
- Πίνακας 28:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 178
- Πίνακας 29:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 180
- Πίνακας 30:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 181
- Πίνακας 31:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 185
- Πίνακας 32:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 186

- Πίνακας 33:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 187
- Πίνακας 34:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 188
- Πίνακας 35:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 191
- Πίνακας 36:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 191
- Πίνακας 37:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 193
- Πίνακας 38:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 195
- Πίνακας 39:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 197
- Πίνακας 40:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 199
- Πίνακας 41:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 203

- Πίνακας 42:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 204
- Πίνακας 43:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 205
- Πίνακας 44:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 206
- Πίνακας 45:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 209
- Πίνακας 46:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 209
- Πίνακας 47:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 211
- Πίνακας 48:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 212
- Πίνακας 49:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 214

- Πίνακας 50:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 215
- Πίνακας 51:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 219
- Πίνακας 52:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 220
- Πίνακας 53:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 221
- Πίνακας 54:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 222
- Πίνακας 55:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 225
- Πίνακας 56:** Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση). 225
- Πίνακας 57:** Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 226

Πίνακας 58: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης)..... 228

Πίνακας 59: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης)..... 229

Πίνακας 60: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 231

Πίνακας 61: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης)..... 235

Πίνακας 62: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και οξικού αιθυλεστέρα κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 236

Πίνακας 63: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης)..... 237

Πίνακας 64: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και οξικού αιθυλεστέρα κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης). 238

Πίνακας 65: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση)..... 240

Πίνακας 66: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αναερόβια επώαση της <i>C. albicans</i> σε θρεπτικό υλικό SDB στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).....	241
Πίνακας 67: Κατάλογος βακτηριακών και μυκητιακών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακής συγκέντρωσης αιθανόλης (σε g/L) από τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών (σε mg/dL).	248
Πίνακας 68: Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες στους 37°C.	250
Πίνακας 69: Ο αριθμός των δειγμάτων (ν) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (N) των μικροβιακών καλλιεργειών στους 37°C.	251
Πίνακας 70: Συγκεντρώσεις αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο μετουσιωμένο αίμα (MA), όξινο (οξ) ή ουδέτερο (ουδ), με ή χωρίς προσθήκη γλυκόζης (γλυ), στους 25°C, υπό αερόβιες/αναερόβιες (AA) ή αναερόβιες (Av) συνθήκες επώασης. Επιλέχθηκαν δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 0,10 g/L.	253
Πίνακας 71: Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο MA στους 25°C.....	257
Πίνακας 72: Εύρη συγκεντρώσεων πτητικών ενώσεων σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο MA στους 25°C.	259
Πίνακας 73: Ο αριθμός των δειγμάτων (ν) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (N) των μικροβιακών καλλιεργειών σε ανθρώπινο φυσιολογικό MA, στους 25°C.	261
Πίνακας 74: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).....	263

Πίνακας 75: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με το είδος θανάτου σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).	266
Πίνακας 76: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την παρουσία σημείων σήψης σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).	268
Πίνακας 77: Ο αριθμός των δειγμάτων (v) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό πραγματικών περιστατικών νεκροτομών (N). (ΑΑ: αερόβια/αναερόβια, Αν: αναερόβια επώαση).	269
Πίνακας 78: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (v/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων νεκροτομικών περιστατικών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα.	271
Πίνακας 79: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (v/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων περιστατικών νεκροτομών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με το είδος θανάτου.	272
Πίνακας 80: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (v/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων περιστατικών νεκροτομών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την κατάσταση σήψης του πτώματος.	273
Πίνακας 81: Εύρη συγκεντρώσεων των αλκοολών σε βιολογικά υλικά.	275
Πίνακας 82: Εύρη συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά.	275
Πίνακας 83: Ο αριθμός των δειγμάτων (v) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (N) των βιολογικών υλικών.	276

ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ABBREVIATIONS

5-HIAA	5-Hydroxyindoleacetic Acid
5-HIAL	5-Hydroxyindoleacetaldehyde
5-HT	5-Hydroxytryptamine or Serotonin
5-HTOL	5-Hydroxytryptophol
ABS	Auto-brewery Syndrome
ADH	Alcohol Dehydrogenase
ADP	Adenosine Diphosphate
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ALT	Alanine aminotransferase
AMP	Adenosine Monophosphate
AST	Aspartate aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate
BAC	Blood Alcohol Concentration
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CBA	Columbia Blood Agar
CDT	Carbohydrate deficient transferrin
CFU	Colony-forming Unit
CoA/ CoASH	Coenzyme A
CV	Coefficient of Variation
CYP	Cytochrome P450
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DDW	Double Distilled Water
dL	deciliter
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
<i>E. f.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ED	Entner-Doudoroff pathway
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas pathway
EtG	Ethyl Glucuronide

EtOH	Ethanol
EtP	Ethyl Phosphate
EtS	Ethyl Sulfate
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FAE	Fatty Acid Ester
FAEE	Fatty Acid Ethyl Ester
FID	Flame Ionization Detector
g	gram
GC	Gas Chromatography
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
h	hour
HIP	Hexane and Isopropanol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace Sampling
I.S.	Internal Standard
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
<i>K. p.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kg	kilogram
kPa	kilopascal
L	Liter
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
m	meter
M	Molarity
m/z	mass/charge
MAO	Monoamine Oxidase
MCV	Mean Corpuscular Volume
<i>MeOH</i>	Methanol
mg	milligram
min	minute

mL	milliliter
mm	millimeter
MRD	Maximum Recovery Diluent
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
NACE	Nonaqueous Capillary Electrophoresis
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	reduced form of NAD ⁺
NADP ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NADPH	reduced form of NADP ⁺
p	level of statistical significance
PC	Phosphatidylcholine
PCA	Plate Count Agar
PEth	Phosphatidylethanol
pH	potential of Hydrogen
Pi	Inorganic orthophosphate
PLD	Phospholipase D
RDS	Relative Standard Deviation
RMSE	Root Mean Squared Error
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Retention Time
<i>S. a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.D.	Standard Deviation
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SPE	Solid Phase Extraction
SULF	Sulfotransferase
TLC	Thin Layer Chromatography
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UGT	Uridine diphosphate Glucuronyltransferase
UV	Ultraviolet
v/v	volume/volume

VIF	Variance Inflation Factor
w/v	weight/volume
A	Απροσδιόριστος θάνατος
A.Σ.	Αρχόμενη Σήψη
AA	Αερόβιες/Αναερόβιες συνθήκες επώασης
Aε	Αερόβιες συνθήκες επώασης
An	Αναερόβιες συνθήκες επώασης
B	Βίαιος θάνατος
γλυ	γλυκόζη
δεξτρ	δεξτρόζη
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
M.O.	Μέσος Όρος
μL	microliter
MA	Μετουσιωμένο Αίμα
MM	Μικροβιακό Μοντέλο
οξ	όξινο
ουδ	ουδέτερο
Π.Ο.Υ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
Π.Σ.	Προηγμένη Σήψη
ΥΥ	Υαλοειδές Υγρό
Φ	Φυσικός θάνατος
X.Σ.	Χωρίς Σήψη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιθανόλη

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η αιθανόλη (C_2H_5OH) είναι μία χημική ένωση, με μικρό μοριακό βάρος (46,07) και μεγάλη διαλυτότητα, που ανήκει στην ομάδα των αλειφατικών αλκοολών. Οι αλειφατικές αλκοόλες αποτελούν μια οικογένεια οργανικών ενώσεων, που περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου (-OH) συνδεδεμένες με μία αλκυλομάδα. Ο γενικός τύπος R-OH υποδηλώνει μια αλκοόλη, όπου R είναι το αλκυλικό ή υδρογονανθρακικό μέρος και -OH είναι το αλκοολικό μέρος του μορίου. Οι αλκοόλες, επίσης, ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των υδροξυλομάδων που περιέχουν σε μονοϋδρικές (π.χ. αιθανόλη), διυδρικές (π.χ. αιθυλενογλυκόλη), τριυδρικές (π.χ. γλυκερόλη) ή πολυϋδρικές (π.χ. μαννιτόλη). Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης των αλκοολών εξαρτάται από το εάν το άτομο του άνθρακα που φέρει την υδροξυλομάδα συνδέεται με ένα, δύο ή τρία άτομα άνθρακα. Ένα άτομο άνθρακα που συνδέεται με τον άνθρακα του υδροξυλίου είναι μία πρωτοταγής αλκοόλη (π.χ. αιθανόλη), δύο άνθρακες είναι μία δευτεροταγής αλκοόλη (π.χ. ισοπροπανόλη) και τρεις άνθρακες είναι μία τριτοταγής αλκοόλη (π.χ. t-βουτανόλη). Τα είδη των αλκοολών που απαντώνται πιο συχνά στη Δικαστική Τοξικολογία είναι η μεθανόλη (πρωτοταγής), η αιθανόλη (πρωτοταγής), η ισοπροπανόλη (δευτεροταγής) και η αιθυλενογλυκόλη (διυδρική ή διόλη) (Jones, 2015, 2019).

Η αιθανόλη παράγεται μαζικά για βιομηχανικούς σκοπούς με καταλυτική προσθήκη νερού σε αέριο αιθυλένιο. Οι αλκοόλες θεωρούνται καθαρά καύσιμα, επειδή το άτομο οξυγόνου που περιέχουν προκαλεί λιγότερη ατμοσφαιρική ρύπανση σε σύγκριση με τα καύσιμα που βασίζονται στο πετρέλαιο, όπως η βενζίνη (Gray & Alson, 1989). Η αιθανόλη, επίσης, βρίσκει χρήσεις στη φαρμακευτική βιομηχανία ως διαλύτης για σύνθεση και σε καλλυντικά, είδη προσωπικής υγιεινής, αρώματα και ορισμένα φαρμακευτικά προϊόντα. Ακόμη και ορισμένα τρόφιμα, όπως τα φρέσκα φρούτα και οι χυμοί φρούτων, περιέχουν ίχνη αιθανόλης ή αιθυλεστέρων, οι οποίοι υφίστανται υδρόλυση στο στομάχι και απορροφώνται στο αίμα (Hackett, Gorczynski & Martin, 2017).

Η αιθανόλη θεωρείται το ευρύτερα, ανά τον κόσμο, διαδεδομένο «ευφοριστικό» και ταξινομείται ως κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι η ψυχοδραστική ουσία, η διερεύνηση της δράσης της οποίας απασχολεί επισταμένα την Δικαστική

Τοξικολογία, επειδή η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η μέθη συνδέονται συχνά με διάφορους τύπους εγκληματικής δραστηριότητας, όπως αδικήματα οδήγησης υπό την επήρεια αλκοόλ, αυτοκτονίες, σεξουαλικές επιθέσεις, ενδοοικογενειακή βία, σωματική βλάβη κι επιθετική συμπεριφορά γενικότερα (Felson & Staff, 2010; Holmgren & Jones, 2010; Saukko & Knight, 2004; Scott-Ham & Burton, 2005; Κουτσελίνης, 2000). Εξαιτίας της συχνότητας χρήσης της, η ανάλυση της αιθανόλης είναι η πιο συχνά διενεργούμενη ανάλυση στα τοξικολογικά εργαστήρια, ενώ τα εργαστηριακά αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα σε ποινικά δικαστήρια. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της αιθανόλης μπορεί να κυμαίνεται από τον προσδιορισμό του ρόλου της στην αιτία θανάτου σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, τη διαφοροποίηση της προθανάτιας κατανάλωσης αλκοόλ από τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης έως την αξιολόγηση της επίδρασης του αλκοόλ στην οδηγική συμπεριφορά σε περιπτώσεις οδήγησης σε κατάσταση μέθης (Siegel & Saukko, 2012; Κουτσελίνης, 2000).

Σύμφωνα με τα στοιχεία του 2016, κατανάλωση αλκοόλ πραγματοποιήθηκε από περισσότερο από τον μισό πληθυσμό σε τρεις περιοχές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.): της Ευρωπαϊκής Περιφέρειας (59,9%), της Περιφέρειας της Αμερικής (54,1%) και την Περιοχή του Δυτικού Ειρηνικού (53,8%). Η υψηλότερη κατά κεφαλήν κατανάλωση αλκοόλ (10 λίτρα και άνω) παρατηρήθηκε στις χώρες της Ευρωπαϊκής Περιφέρειας του Π.Ο.Υ. Σχετικά υψηλά επίπεδα κατανάλωσης αλκοόλ (7,5-9,9 λίτρα καθαρού αλκοόλ κατά κεφαλήν) εντοπίστηκαν κυρίως σε χώρες υψηλού εισοδήματος, ιδιαίτερα στην Περιφέρεια της Αμερικής και της Περιοχής του Δυτικού Ειρηνικού, αλλά και σε ορισμένες χώρες της Αφρικανικής Περιφέρειας. Ο πληθυσμός με τη χαμηλότερη κατά κεφαλήν κατανάλωση αλκοόλ (κάτω από 2,5 λίτρα) ζει στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου ή σε μουσουλμανικές χώρες, όπως ο Νίγηρας, η Ινδονησία και το Αζερμπαϊτζάν. Οι διαφορές στα επίπεδα της συνολικής κατανάλωσης αλκοόλ μεταξύ περιοχών και χωρών του κόσμου είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται κοινωνικοδημογραφικοί παράγοντες, η οικονομική ανάπτυξη, η θρησκεία, τα πολιτισμικά πρότυπα, τα προτιμώμενα είδη αλκοολούχων ποτών (WHO, 2018).

Μετά την κατανάλωση, η αιθανόλη απορροφάται γρήγορα από τον γαστρεντερικό σωλήνα, κυρίως από το έντερο και ελάχιστα από το δέρμα και τους πνεύμονες, όπου εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και περνά εύκολα πέρα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό για να λειτουργήσει ως κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος (Drummer, 2014). Η απορρόφηση της αιθανόλης ολοκληρώνεται συνήθως σε χρόνο που

κυμαίνεται από 45 λεπτά έως 3 ώρες· όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος τόσο χαμηλότερες είναι οι συγκεντρώσεις στο αίμα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις οινοπνεύματος στο αίμα ανιχνεύονται 45-90 λεπτά μετά την κατανάλωσή του (Κουτσελίνης, 2000). Η αιθανόλη κατανέμεται στα υδάτινα διαμερίσματα του σώματος και δεν δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος ή άλλους ιστούς. Όταν η καταναλωθείσα αιθανόλη είναι πλήρως εξισοροπημένη σε όλα τα βιολογικά υγρά και τους ιστούς, εκείνοι με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό θα περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης. Επομένως, το πλάσμα και ο ορός (~92% w/w νερό) περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης από το ολικό αίμα (~80% w/w νερό), και τα τρία έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη από τα ερυθροκύτταρα (~69% w/w σε νερό) (Charlebois et al., 1996; Jones, 2019; Saukko & Knight, 2004).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα αποτελεί την πιο συχνή ανάλυση που διενεργείται στα διαπιστευμένα εργαστήρια Δικαστικής Τοξικολογίας και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αποτελεί πολύ συχνά μέρος ευρύτερης δικαστικής έρευνας. Παρέχει ακριβή αναλυτικά δεδομένα για την υποστήριξη των ιατροδικαστικών στοιχείων, όσον αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοολούχων ποτών, της μετρούμενης συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα και της βλάβης των λειτουργιών του σώματος (Siegel & Saukko, 2012; Wigmore, 2011). Τα θεσμοθετημένα όρια συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα για την οδήγηση μηχανοκίνητου οχήματος διαφέρουν μεταξύ των χωρών και αυτό φαίνεται να εξαρτάται από τις ιστορικές παραδόσεις, τον τρόπο ζωής, τις διάφορες πολιτικές δυνάμεις και την κοινή γνώμη σχετικά με την οδήγηση μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Στα περισσότερα Ευρωπαϊκά έθνη, το θεσμοθετημένο όριο συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα είναι 0,50 g/L, ενώ το όριο για τη Νορβηγία, τη Σουηδία και την Πολωνία είναι 0,21 g/L. Το νόμιμο όριο συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα για την οδήγηση στο Ηνωμένο Βασίλειο, τις ΗΠΑ και τον Καναδά είναι 0,80 g/L, αν και έχει προταθεί η μείωση στα 0,50 g/L για τη μείωση των ατυχημάτων που σχετίζονται με το αλκοόλ (Fell & Voas, 2014).

Οι μονάδες που χρησιμοποιούνται για τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα για κλινικούς και ιατροδικαστικούς σκοπούς εκφράζονται είτε ως μάζα ανά μονάδα όγκου (π.χ. g/L, mg/mL ή g/100 mL) είτε ως μάζα ανά μονάδα μάζας (π.χ. g/kg ή mg/g). Στις περισσότερες χώρες χρησιμοποιούνται οι μονάδες μάζα/όγκο, αν και για ιστορικούς λόγους στη Γερμανία και τις σκανδιναβικές χώρες η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα για νομικούς σκοπούς ορίζεται ως μάζα/μάζα. Επειδή το ειδικό βάρος του ολικού αίματος είναι

1,055 κατά μέσο όρο, τα 100 mg/100 mL αίματος είναι κοντά στα 95 mg/100 g αίματος (Dettmeyer et al., 2014).

1.1.2 Επιπτώσεις από την κατανάλωση αλκοόλ

Οι επιδράσεις του αλκοόλ στην ανθρώπινη απόδοση και συμπεριφορά έχουν μελετηθεί εκτενώς και τα σημάδια και τα συμπτώματα της μέθης είναι κοινά: έλλειψη κρίσης και αυτοσυγκράτησης, μπερδεμένη ομιλία, ασταθές βάδισμα κ.λπ. Οι επιπτώσεις του αλκοόλ δεν εξαρτώνται μόνο από τις ποσότητες που καταναλώνονται, αλλά και από την ταχύτητα κατανάλωσης, με μεγαλύτερες δόσεις και μικρότερους χρόνους κατανάλωσης που επηρεάζουν περισσότερο τη συμπεριφορά. Με ταχείς ρυθμούς απορρόφησης αλκοόλ, η επίτευξη συγκεντρώσεων αιθανόλης στο αίμα που κυμαίνονται μεταξύ 1,20-1,50 g/L εντός 15-30 λεπτών μετά την κατανάλωση τείνει να πυροδοτήσει την πρόκληση ναυτίας κι εμετού, επομένως μέρος του αλκοόλ που καταναλώνεται εκκενώνεται από το στομάχι (Jones, 2015, 2019).

Η υπερκατανάλωση και η κατάχρηση αλκοόλ καταστρέφει την ανθρώπινη ζωή και κοστίζει στο σύστημα υγείας τεράστια χρηματικά ποσά για αποκατάσταση και απεξάρτηση από το αλκοόλ (Room et al., 2005). Οι άνθρωποι που υπερκαταναλώνουν αλκοόλ είναι επιρρεπείς σε θανατηφόρα και μη ατυχήματα στους δρόμους, μέσα στο σπίτι και στον χώρο εργασίας. Αναφορές κατά την αυτοψία δείχνουν ότι το 20-50% των θανόντων έχουν συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα που υπερβαίνει το νόμιμο όριο για την οδήγηση (Voas et al., 2012).

Ο **Πίνακας 1** συνοψίζει τα τυπικά σημεία και συμπτώματα από την επίδραση της κατανάλωσης αλκοόλ σε σχέση με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Δεν υπάρχει αυστηρή οριοθέτηση για τις διάφορες παρατηρούμενες επιδράσεις του αλκοόλ, οι οποίες εξαρτώνται από την ηλικία του ατόμου, τις συνήθειες κατανάλωσης αλκοόλ και την ανάπτυξη ανοχής.

Πίνακας 1: Τυπικά σημεία και συμπτώματα της επίδρασης του αλκοόλ σε σχέση με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα (A. W. Jones, 2015).

Αιθανόλη στο αίμα (g/L)	Σημεία και συμπτώματα της επίδρασης του αλκοόλ
<0,20	Χωρίς δυσάρεστες επιπτώσεις ή εξωτερικά σημάδια
0,30-0,50	Ήπια ευφορία, άρση αναστολών, κάποια αδυναμία εκτέλεσης εξειδικευμένων καθηκόντων
0,50-1,0	Ενθουσιασμός, μειωμένες αναστολές, φλυαρία, διαταραγμένες αισθητηριακές και κινητικές λειτουργίες, βραδύτερος χρόνος αντίδρασης
1,0-1,5	Έλλειψη συντονισμού, ασταθές βάδισμα, μπερδεμένη ομιλία, υπερβολική αντίδραση σε εικόνες και ήχους, επιθετική συμπεριφορά
1,5-2,0	Εμφανή σημάδια μέθης, δυσλειτουργία του σώματος, ναυτία, εμετός
2,0-3,0	Έλλειψη ισορροπίας, ασυνάρτητη ομιλία, μειωμένη αντίληψη και κρίση
3,0-4,0	Σύγχυση, λιποθυμία ή κόμα, κίνδυνος θανάτου από αναπνευστική ανεπάρκεια
>4,0	Αναπνευστική παράλυση, καρδιοπνευμονική ανακοπή, θάνατος

Το είδος του αλκοολούχου ποτού που καταναλώνεται (μπύρα ή οινοπνευματώδη ποτά), καθώς επίσης και εάν καταναλώνεται με άδειο στομάχι ή μετά από ένα γεύμα, παίζει ρόλο όσον αφορά την ένταση των επιβλαβών επιπτώσεων.

Οι οξείες επιδράσεις του αλκοόλ στις λειτουργίες του σώματος εξαρτώνται από τη δόση που χορηγείται και την ταχύτητα κατανάλωσης, καθώς και από μεμονωμένους παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο και ο βαθμός εξοικείωσης με το αλκοόλ. Το αλκοόλ φτάνει στον εγκέφαλο αμέσως μετά την έναρξη της κατανάλωσης και τα αρχικά αποτελέσματα γίνονται αισθητά μετά από ένα ή δύο ποτά. Η γνωστική λειτουργία (π.χ. εξασθένηση της σκέψης, της μάθησης και της μνήμης) είναι η πιο ευαίσθητη στις επιδράσεις του αλκοόλ, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα οι κινητικές δεξιότητες και η όραση του ατόμου είναι περιορισμένες. Όταν ολοκληρωθεί η απορρόφηση της αιθανόλης και αρχίζει η μετα-απορροφητική φθίνουσα φάση, το άτομο παρουσιάζει μία αξιοσημείωτη ανάκαμψη σε διάφορες λειτουργίες (Jones, 2015).

Τα σημάδια και τα συμπτώματα της επίδρασης του αλκοόλ αρχίζουν να εμφανίζονται μετά τα πρώτα ποτά. Όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα φτάσει τα 0,30-0,50 g/L, το άτομο γίνεται λιγότερο ανασταλτικό και πιο κοινωνικό. Σε υψηλότερα

επίπεδα, που κυμαίνονται από 0,80 έως 1,0 g/L, οι χρόνοι αντίδρασης είναι πιο αργοί και το άτομο τείνει να γίνεται πιο θορυβώδες και πιθανόν να αναλαμβάνει μεγαλύτερους κινδύνους. Η ικανότητά του να εκτελεί εξειδικευμένες εργασίες, όπως η οδήγηση μηχανοκίνητου οχήματος, μειώνεται. Μετά από την κατανάλωση μεγαλύτερης ποσότητας αλκοόλ και την επίτευξη υψηλότερων συγκεντρώσεων αιθανόλης, οι ψυχοκινητικές λειτουργίες είναι πιο εξασθενημένες, συμπεριλαμβανομένης της χαλάρωσης των μυών, της αταξίας, της καταστολής και του λήθαργου. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα (>3,0 g/L), το άτομο συχνά επέρχεται σε κωματώδη κατάσταση και ο θάνατος μπορεί να προκληθεί από αναπνευστική ανεπάρκεια (Jones, 2015).

1.1.3 Απορρόφηση αιθανόλης

Μετά την κατανάλωση μπίρας, κρασιού ή οινοπνευματωδών ποτών, η αιθανόλη που περιέχεται σε αυτά αναμιγνύεται με το συνολικό νερό του σώματος. Δεν υπάρχουν ενδείξεις δέσμησης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος όπως στην περίπτωση άλλων φαρμάκων. Η διαλυτότητα της αιθανόλης στον λιπώδη ιστό και στα οστά είναι αμελητέα σε σύγκριση με τη διαλυτότητα στο νερό. Το πόσο γρήγορα η αιθανόλη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την κατανάλωση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποσότητα που προσλαμβάνεται, η ταχύτητα κατανάλωσης και ιδιαίτερα, οι παράγοντες που επηρεάζουν τη γαστρική κένωση.

Η αιθανόλη αρχίζει να απορροφάται στο αίμα του στομάχου μέσω του γαστρικού βλεννογόνου, αν και η απορρόφηση είναι πολύ πιο αποτελεσματική από το λεπτό έντερο (δωδεκαδάκτυλο και νήστιδα), λόγω της πολύ μεγάλης επιφάνειας απορρόφησης που παρέχουν οι λάχνες και οι μικρολάχνες. Το είδος του αλκοολούχου ποτού που καταναλώνεται μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα απορρόφησης και την προκύπτουσα συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα επιτυγχάνεται μετά από περίπου 30-120 λεπτά. Ο ρυθμός απορρόφησης είναι ταχύτερος μετά από κατανάλωση ποτών με υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, όπως η βότκα και το ουίσκι (~40 vol%), σε σύγκριση με τα επιτραπέζια κρασιά (~8-12 vol%) ή τις μπίρες (~4-6 vol%) (Mitchell et al., 2014). Άλλα συστατικά των αλκοολούχων ποτών, όπως η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, παίζουν, επίσης, ρόλο στην καθυστέρηση του ρυθμού απορρόφησης, επιβραδύνοντας τη γαστρική κένωση. Σε ορισμένα άτομα, όταν τα

αλκοολούχα ποτά καταναλώνονται με άδειο στομάχι, προκαλείται ερεθισμός του γαστρικού βλεννογόνου και κατ' επέκταση πυλωρικός σπασμός. Υπό αυτές τις συνθήκες, ο ρυθμός απορρόφησης είναι πιο αργός.

Εάν καταναλωθεί αλκοόλ μετά από γεύμα, ο ρυθμός απορρόφησης επιβραδύνεται αισθητά, επειδή η τροφή στο στομάχι καθυστερεί τη γαστρική κένωση. Σε κατάσταση σίτισης, η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μπορεί να μειωθεί έως και 50% σε σύγκριση με την κατανάλωση της ίδιας δόσης με άδειο στομάχι (Jones & Jönsson, 1994). Επιπλέον, ο χρόνος για την πλήρη απέκκριση της αιθανόλης από το σώμα μειώνεται κατά περίπου 1 ώρα σε κατάσταση σίτισης.

Η ταχύτητα γαστρικής κένωσης, κι επομένως ο ρυθμός απορρόφησης της αιθανόλης, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η διατροφή, η κατάσταση της υγείας, το κάπνισμα και τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Η υπεργλυκαιμία επιβραδύνει και η υπογλυκαιμία επιταχύνει τη γαστρική κένωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι καταστάσεις της νόσου, η ώρα της ημέρας ή άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το σάκχαρο του αίματος έχουν επίδραση στη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Επίσης, ορισμένα κοινώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα φαίνεται να επηρεάζουν τη γαστρεντερική κινητικότητα και να μεταβάλλουν τον ρυθμό απορρόφησης της αιθανόλης (Fraser, 1998).

1.1.4 Κατανομή της αιθανόλης

Κατά τη διάρκεια και μετά την απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα, η αιθανόλη μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλα τα όργανα και τους ιστούς του σώματος. Λόγω της υψηλής διαλυτότητας και του χαμηλού μοριακού της βάρους, η αιθανόλη μπορεί να διαχέεται μέσω υδάτινων διαύλων σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες. Η ταχύτητα κατανομής σε διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος και οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται σε κατάσταση ισορροπίας εξαρτώνται από τη σχετική περιεκτικότητα σε νερό και την αναλογία ροής αίματος προς μάζα ιστού. Η αναλογία της ροής του αίματος προς τη μάζα των ιστών είναι υψηλότερη για όργανα όπως ο πνεύμονας, ο εγκέφαλος και τα νεφρά, τα οποία εξισορροπούνται γρήγορα με τη συγκέντρωση αιθανόλης στο αρτηριακό αίμα (Jones, 2015).

Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη φάση απορρόφησης, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αρτηριακό αίμα είναι υψηλότερη από ότι στο φλεβικό αίμα που επιστρέφει

στην καρδιά από τους περιφερειακούς ιστούς (Jones et al., 2004). Το μέγεθος της διαφοράς του αρτηριακού από το φλεβικό αίμα είναι μεγαλύτερο για ιστούς με χαμηλότερη ροή αίματος ανά γραμμάριο μάζας ιστού, όπως οι σκελετικοί μύες. Περίπου 60-90 λεπτά μετά την κατανάλωση, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στα δείγματα αρτηριακού και φλεβικού αίματος ήταν οι ίδιες, και σε μεταγενέστερους χρόνους η συγκέντρωση της αιθανόλης στο φλεβικό αίμα ήταν ελαφρώς υψηλότερη από ότι στο αρτηριακό αίμα. Οι αρνητικές διαφορές αρτηριακού-φλεβικού αίματος (~3-5 mg/100 mL) παρέμειναν μέχρι να μεταβολιστεί όλη η αιθανόλη (Jones et al., 2004).

Η σύσταση του σώματος είναι σημαντική για την κατανομή της αιθανόλης, ειδικά οι αναλογίες λίπους προς άπαχο ιστό. Περισσότερο λίπος και λιγότερος μυϊκός ιστός ανά κιλό σωματικού βάρους σημαίνει ότι υπάρχει λιγότερος χώρος στο σώμα για να αραιωθεί το αλκοόλ που προσλαμβάνεται, όπως αντικατοπτρίζεται στον μικρότερο όγκο κατανομής V_d (Maudens et al., 2014). Ο V_d για την αιθανόλη είναι μικρότερος στους παχύσαρκους, τους ηλικιωμένους και τις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες. Τα άτομα αυτά έχουν λιγότερο νερό στο σώμα τους, στο οποίο μπορεί να αραιωθεί το αλκοόλ που προσλαμβάνεται. Το συνολικό νερό του σώματος ενός ενήλικα αντιπροσωπεύει περίπου το 50-60% του σωματικού του βάρους. Το μεγαλύτερο μέρος του νερού βρίσκεται στους σκελετικούς μύες, ενώ ο όγκος του αίματος είναι περίπου 5 L.

Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα ενός ατόμου και της ποσότητας αλκοόλης που απορροφάται και κατανέμεται σε όλα τα σωματικά υγρά και τους ιστούς υπολογίζεται με τη χρήση της εξίσωσης Widmark, που πήρε το όνομά της από έναν Σουηδό πρωτοπόρο σε μελέτες φαρμακοκινητικής της αιθανόλης (Andréasson & Jones, 1996):

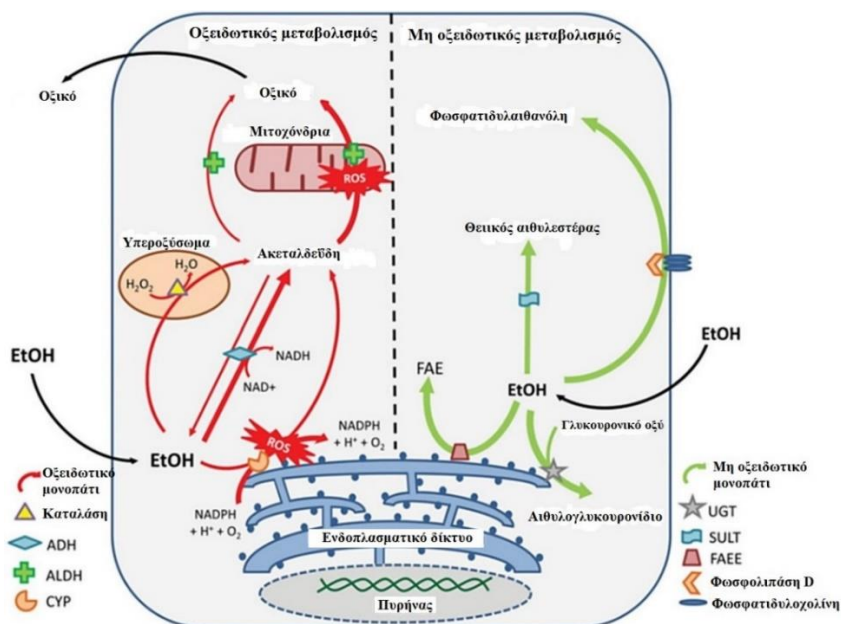
$$A = BAC \times V_d \times \text{βάρους του σώματος}$$

Στην παραπάνω εξίσωση, A είναι η ποσότητα αλκοόλης (σε γραμμάρια) που απορροφάται και κατανέμεται σε όλα τα σωματικά υγρά και τους ιστούς τη στιγμή της αιμοληψίας, BAC (Blood Alcohol Concentration) είναι η συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα (σε g/L), το βάρος του σώματος (σε kg) και V_d ο όγκος κατανομής του αλκοόλ (σε L/kg), ο οποίος αρχικά αναφερόταν ως παράγοντας r του Widmark. Πολλές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η μέση τιμή του V_d για την αιθανόλη είναι 0,70 L/kg για τους υγιείς ενήλικες άνδρες και 0,60 L/kg για τις υγιείς ενήλικες γυναίκες.

1.1.5 Μεταβολισμός της αιθανόλης

1.1.5.1 Οξειδωτικός μεταβολισμός

Το μεγαλύτερο μέρος της αιθανόλης που καταναλώνεται (90-98%) υφίσταται οξειδωτικό μεταβολισμό στο ήπαρ από δύο κύριες ενζυματικές οδούς. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης συμβαίνει με ρυθμό 0,10 g/kg σωματικού βάρους ανά ώρα, έτσι ώστε για ένα άτομο που ζυγίζει 80 kg, μία ποσότητα αιθανόλης 0,80 g/kg απαιτεί 8 ώρες για πλήρη αποβολή από τον οργανισμό. Το κυτοσολικό ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση (Alcohol Dehydrogenase, ADH) είναι το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για τον οξειδωτικό μεταβολισμό της αιθανόλης στη φάση I. Εκφράζεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα, αλλά βρίσκεται, επίσης, στον γαστρεντερικό σωλήνα, τους πνεύμονες και τα νεφρά και μετατρέπει την αιθανόλη σε έναν πιο τοξικό μεταβολίτη, την ακεταλδεΐδη, η οποία μετατρέπεται γρήγορα στο μη τοξικό οξικό οξύ από το μιτοχondριακό ένζυμο αλδεϋδική αφυδρογονάση (Aldehyde Dehydrogenase, ALDH) (Σχήμα 1). Τα ίδια ένζυμα εμπλέκονται και στον μεταβολισμό άλλων αλκοολών, συμπεριλαμβανομένης της μεθανόλης (Cederbaum, 2012; Crabb, 1995; Edenberg, 2000; Jones, 2015).



Σχήμα 1: Οξειδωτικές και μη οξειδωτικές μεταβολικές οδοί της αιθανόλης στα ηπατοκύτταρα. ADH: αλκοολική αφυδρογονάση, ALDH: αλδεϋδική αφυδρογονάση, CYP: κυτόχρωμα P450, EtOH: αιθανόλη, FAE: εστέρας λιπαρών οξέων, FAEE: αιθυλεστέρας λιπαρών οξέων, SULT: σουλφοτρανσφεράση, UGT: διφωσφορική γλυκουρονυλοτρανσφεράση της ουριδίνης (Le Daré et al., 2019).

Τα ένζυμα ADH και ALDH είναι πολυμορφικά και η καταλυτική τους δράση παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές, εξηγώντας πιθανώς για ποιο λόγο μερικοί άνθρωποι μεταβολίζουν την αιθανόλη πιο αποτελεσματικά από άλλους. Η καταλυτική δραστηριότητα, τα k_m και V_{max} των διαφόρων ισοενζύμων της ADH, καθώς και η ειδικότητα για τα υποστρώματα, είναι διαφορετικά για διαφορετικές μοριακές μορφές του ενζύμου (Crabb, 1995). Όλα τα οξειδωτικά μονοπάτια του μεταβολισμού της αιθανόλης παράγουν ακεταλδεΐδη, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις οξειδώνεται περαιτέρω από την ALDH σε οξικό οξύ. Τα τελικά προϊόντα του οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό, που παράγονται από το οξικό στον κύκλο του Krebs (Zakhari, 2006).

Ο ρυθμός απέκκρισης της αιθανόλης από την κυκλοφορία του αίματος για την πλειονότητα των ανθρώπων κυμαίνεται μεταξύ 0,10 έως 0,25 g/L/h (Jones, 2010). Το κύριο μεταβολικό ένζυμο, ADH, είναι κορεσμένο με υπόστρωμα όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα υπερβεί τα 0,20 g/L, επομένως, η αιθανόλη μπορεί να θεωρηθεί ότι υπακούει στην κινητική μηδενικής τάξης.

Ο μέσος ρυθμός απέκκρισης της αιθανόλης από το αίμα σε υγιή άτομα με συνήθειες μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ είναι περίπου 0,15 g/L/h και αυξάνεται σε 0,19 g/L/h σε περιπτώσεις υπερβολικής κατανάλωσης και σε αλκοολικούς.

Τα άτομα που ανήκουν σε διαφορετικές εθνικότητες ή φυλετικές ομάδες μεταβολίζουν την αιθανόλη και την ακεταλδεΐδη με διαφορετικό τρόπο. Αυτή η διαφορά είναι πιο εμφανής στους Ασιάτες, επειδή το 40-50% του πληθυσμού κληρονομεί μία ανενεργή μορφή ALDH κι επομένως δεν μπορεί να μεταβολίσει την ακεταλδεΐδη με τον ίδιο τρόπο όπως οι Καυκάσιοι. Η ενζυμική πρωτεΐνη έχει ένα μόνο αμινοξύ στη λάθος θέση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, έτσι ώστε η δέσμευση στο υπόστρωμα να είναι λιγότερο αποτελεσματική και τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης στο αίμα κατά την οξείδωση της αιθανόλης αυξάνονται αισθητά (Quertemont & Didone, 2006). Αυτό πυροδοτεί μια σειρά από δυσάρεστες φυσιολογικές επιδράσεις, όπως έξαψη στο πρόσωπο και το λαιμό, ναυτία, ταχυκαρδία και δυσκολίες στην αναπνοή. Ως αποτέλεσμα, τα άτομα με αυτό το γενετικό χαρακτηριστικό αποτρέπονται από το να γίνουν αλκοολικοί (Edenberg, 2007).

Επειδή μόνο το 2-5% της καταναλωθείσας αιθανόλης απεκκρίνεται αμετάβλητο στην αναπνοή, τον ιδρώτα και τα ούρα, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων νερού για την αύξηση της παραγωγής ούρων ή η γρήγορη αναπνοή για αερισμό των πνευμόνων ή η έντονη άσκηση για περισσότερη εφίδρωση δεν είναι αποτελεσματικοί τρόποι για να μειωθεί η

συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Επιπλέον, επειδή η ADH είναι ένα από τα μεγαλύτερα σε ποσότητα ηπατικά ένζυμα, ακόμη και άτομα με σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία, όπως ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ή κίρρωση, φαίνεται ότι είναι ικανά να μεταβολίσουν την αιθανόλη, αν και με ελαφρώς πιο αργό ρυθμό (Jones, 2015).

Ένα δεύτερο ηπατικό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το 10% περίπου του οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης στη φάση I είναι το κυτόχρωμα P450 (CYP2E1) (**Σχήμα 1**), το οποίο βρίσκεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, ειδικά στο μικροσωμικό κλάσμα. Χρησιμοποιώντας NADPH και οξυγόνο, το CYP2E1 μετατρέπει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη και στη συνέχεια, την ακεταλδεΐδη σε οξικό οξύ. Η μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη παράγει δραστικά ιόντα οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην τοξικότητα του αλκοόλ (Le Daré et al., 2019). Το CYP2E1 ανήκει σε μια οικογένεια μικροσωμικών ενζύμων μεγάλης σημασίας στον μεταβολισμό πολλών φαρμάκων και ξενοβιοτικών, όπως τα CYP2D6, CYP2C9 και CYP2C19. Ένα χαρακτηριστικό του ενζύμου CYP2E1 είναι το υψηλότερο k_m για την οξείδωση της αιθανόλης ως υπόστρωμα, πράγμα που σημαίνει ότι παίζει πιο σημαντικό ρόλο μετά από κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ. Επιπλέον, το CYP2E1 επάγεται μετά από μια περίοδο χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ, γεγονός που εξηγεί γιατί ορισμένοι αλκοολικοί έχουν ταχύτερους ρυθμούς απέκκρισης αιθανόλης από το αίμα σε σύγκριση με όσους πίνουν λιγότερο (Jones, 2015).

Η επαγωγή του CYP2E1 μετά από υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ είναι, επίσης, υπεύθυνη για ορισμένες ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις φαρμάκων-αιθανόλης, όπως η ηπατοτοξικότητα που παρατηρείται μετά από υπερδοσολογία του αναλγητικού και αντιπυρετικού φαρμάκου ακεταμινοφαίνη (παρακεταμόλη). Μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα της παρακεταμόλης οξειδώνεται από το CYP2E1 σε τοξικό μεταβολίτη. Όταν λαμβάνονται τεράστιες δόσεις παρακεταμόλης και εάν το CYP2E1 επάγεται μετά από υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, παράγεται περισσότερος τοξικός μεταβολίτης, ο οποίος συνδέεται ομοιοπολικά με τους ηπατικού ιστούς, οδηγώντας σε νέκρωση και κυτταρικό θάνατο. Αρκετές βιομηχανικές χημικές ουσίες (π.χ. χλωράνθρακες και υδρογονάνθρακες) μεταβολίζονται, επίσης, από το CYP2E1, επομένως οι αλκοολικοί που εκτίθενται σε αυτές τις χημικές ουσίες είναι πιο ευαίσθητοι στις τοξικές τους επιδράσεις (Jones, 2015).

Αν και η αιθανόλη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, διάφορες μορφές του ενζύμου ADH υπάρχουν στο γαστρικό βλεννογόνο και στους νεφρούς. Η οξείδωση της αιθανόλης στο στομάχι εξαρτάται από παράγοντες που καθυστερούν τη γαστρική κένωση και το

χρονικό διάστημα που η αιθανόλη παραμένει στο στομάχι. Μόλις το περιεχόμενο του στομάχου αδειάσει και η αιθανόλη εισέλθει στη νήστιδα και το λεπτό έντερο, ο ρυθμός απορρόφησης στο πυλαίο αίμα είναι γρήγορος και ο μεταβολισμός πραγματοποιείται στο ήπαρ (Jones, 2015).

Ορισμένα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα (π.χ. η ασπιρίνη, το Tagamet και το Zantac) αποδείχτηκε ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα της γαστρικής ADH κι επομένως, τα άτομα που λαμβάνουν αυτά τα φάρμακα είναι πιθανό να φτάσουν σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα, επειδή λιγότερη αιθανόλη μεταβολίζεται στο στομάχι (Jones, 2015).

1.1.5.2 Μη οξειδωτικός μεταβολισμός

Ένα πολύ μικρό κλάσμα (<1%) της αιθανόλης που καταναλώθηκε υφίσταται μια αντίδραση σύζευξης φάσης II για την παραγωγή των υδατοδιαλυτών μεταβολιτών αιθυλογλυκουρονίδιο (Ethyl Glucuronide, EtG) και θειικός αιθυλεστέρας (Ethyl Sulfate, EtS) (**Σχήμα 1**). Αυτοί οι μεταβολίτες αποβάλλονται πιο αργά από τον οργανισμό σε σύγκριση με την αιθανόλη, επομένως μπορεί να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση πρόσφατης κατανάλωσης αλκοόλ (Walsham & Sherwood, 2012).

Η ανάλυση των EtG και EtS βρίσκει εφαρμογές στην κλινική ιατρική ως μέσο παρακολούθησης της αποχής από το αλκοόλ, όπως σε εξωτερικά ιατρεία για αλκοολικούς που δεν επιτρέπεται να πίνουν αλκοόλ. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από ένα αλκοολόμετρο μπορεί να είναι αρνητικό, αλλά ένα θετικό αποτέλεσμα για EtG στο αίμα ή στα ούρα θα αποδεικνύει πρόσφατη κατανάλωση αλκοόλ. Ωστόσο, χρειάζεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των EtG και EtS, επειδή το αλκοόλ περιέχεται σε πολλά προϊόντα οικιακής χρήσης, καθώς και σε απολυμαντικά χεριών, φάρμακα για τον βήχα και τονωτικά βιταμινών (Jones, 2015).

Άλλα παραδείγματα μη οξειδωτικών οδών του μεταβολισμού της αιθανόλης είναι οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Ethyl Esters, FAEEs) (**Σχήμα 1**), όπως ο μυριστικός αιθυλεστέρας, ο ελαϊκός αιθυλεστέρας και ο στεατικός αιθυλεστέρας (Pragst, 2014). Αυτοί οι εστέρες συντίθενται από μια αντίδραση που μεσολαβείται από ένζυμα, μεταξύ λιπαρών οξέων και αιθανόλης στους ιστούς. Οι FAEE είναι ανιχνεύσιμοι σε

δείγματα αίματος, ιστών και μαλλιών και μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανίχνευσης σε σύγκριση με την αιθανόλη και τα EtG και EtS.

Άλλος ένας μη οξειδωτικός μεταβολίτης της αιθανόλης που αρχίζει να βρίσκεται κλινικές εφαρμογές σε θεραπευτικά προγράμματα είναι η φωσφατιδυλαιθανόλη (Phosphatidylethanol, PEth) (**Σχήμα 1**). Η PEth συντίθεται όταν η φωσφατιδυλοχολίνη υδρολύεται σε φωσφατιδικό οξύ με δράση της φωσφολιπάσης D. Με την παρουσία αιθανόλης στους ιστούς, η ρίζα αιθυλίου ενσωματώνεται στο λιπίδιο αντί για νερό για να δώσει PEth. Αυτός ο βιοδείκτης κατανάλωσης αλκοόλ είναι ιδιαίτερα άφθονος στα ερυθροκύτταρα και ο χρόνος ημιζωής από το αίμα μετά από μια περίοδο χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ είναι περίπου τέσσερις ημέρες (Stewart et al., 2014).

1.1.6 Απέκκριση της αιθανόλης

Ένα μικρό κλάσμα (2-10%) της ποσότητας της αιθανόλης που απορροφάται από την κυκλοφορία του αίματος αποβάλλεται αμετάβλητο με την αναπνοή, τον ιδρώτα και τα ούρα (Jones, 2006; Pawan & Grice, 1968). Η απέκκριση είναι μία διαδικασία πρώτης τάξης, επομένως, αναλογικά, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα, τόσο περισσότερη αιθανόλη απεκκρίνεται (Kalant, 1996).

1.1.6.1 Απέκκριση της αιθανόλης στα ούρα

Οι ποσότητες της αιθανόλης που απεκκρίθηκαν στα ούρα μελετήθηκαν με τη βοήθεια εθελοντών που κατανάλωσαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (0,51, 0,68 και 0,85 g/kg) με άδειο στομάχι (Jones, 1990). Οι όγκοι των ούρων που αποβλήθηκαν σε διάστημα 60 λεπτών μετρήθηκαν και από τη συγκέντρωση της αιθανόλης υπολογίστηκε η ποσότητα που απεκκρίθηκε στα νεφρά. Τα αποτελέσματα επαλήθευσαν ότι μόνο ένα κλάσμα της αιθανόλης καθαρίστηκε με σπειραματική διήθηση. Για την υψηλότερη συγκέντρωση των 0,85 g/kg, η αποβολή της αιθανόλης από τα ούρα αντιπροσώπευε μόνο το 2% της συνολικής ποσότητας που λήφθηκε.

1.1.6.2 Πνευμονική απέκκριση της αιθανόλης

Η ποσότητα της αιθανόλης που απεκκρίνεται μέσω της αναπνοής εξαρτάται από τον ρυθμό αερισμού των πνευμόνων και τη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα και υπολογίζεται ως ακολούθως: αν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο πνευμονικό αίμα είναι 1,0 g/L και η αναλογία αίματος/αέρα της αιθανόλης είναι 2000:1, τότε ο κυψελιδικός αέρας περιέχει συγκέντρωση 0,50 mg/L. Σε υγιή άτομα, ο ελάχιστος όγκος αναπνοής σε ηρεμία είναι περίπου 6 L/min για αναπνεόμενο όγκο 500 mL και 12 αναπνοές ανά λεπτό. Επειδή περίπου το 30% της αναπνοής είναι κενός αέρας και δεν συμμετέχει στην ανταλλαγή αερίων, ο ενεργός όγκος ανά λεπτό είναι 4,2 L/min ή 252 L/h. Συνεπώς, για συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 1,0 g/L (κυψελιδική συγκέντρωση αιθανόλης 0,5 mg/L) περίπου 126 mg (0,5 mg/L x 252 L) αιθανόλης χάνονται από το σώμα ανά ώρα με την εκπνοή. Για έναν άνδρα με σωματικό βάρος 60-80 kg, αποβάλλονται περίπου 6-8 g αιθανόλης από το σώμα ανά ώρα. Έτσι τα 126 mg αιθανόλης που χάνονται με την αναπνοή αντιπροσωπεύουν μόνο το 1,5-2,0% της συνολικής ποσότητας που αποβάλλεται (Jones, 2011).

1.1.6.3 Απέκκριση της αιθανόλης με τον ιδρώτα

Ίχνη αιθανόλης απεκκρίνονται από το σώμα μέσω του δέρματος κατά την εφίδρωση, αν και η συνολική ποσότητα είναι ασήμαντη σε σύγκριση με την ποσότητα που μεταβολίζεται και απεκκρίνεται στα ούρα και την αναπνοή (Brown, 1985; Buono, 1999). Ωστόσο, η ανάλυση της αιθανόλης στον ιδρώτα έχει βρει πρακτικές εφαρμογές ως τρόπος παρακολούθησης της αποχής σε ασθενείς που πρέπει να απέχουν από το αλκοόλ ως μέρος ενός προγράμματος αποκατάστασης ή ως προϋπόθεση της απασχόλησής τους (Marques & McKnight, 2009; Swift, 2000). Οι ασθενείς εφοδιάζονται με ένα δερματικό έμπλαστρο, το οποίο συλλέγει τον ιδρώτα που εκπέμπεται σε διάφορες χρονικές περιόδους και το αλκοόλ που περιέχει αναλύεται ως τρόπος παρακολούθησης της αποχής από το ποτό (Phillips, 1984).

1.1.7 Μεταβολικές επιδράσεις της αιθανόλης

Η αιθανόλη είναι μοναδική μεταξύ των ναρκωτικών, επειδή έχει δύο εντελώς διαφορετικές δράσεις, η μία από τις οποίες είναι μεταβολική και θρεπτική, δίνοντας ενέργεια (7,1 kcal/g) και η άλλη η καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Lieber, 1997). Ο πλήρης οξειδωτικός μεταβολισμός της αιθανόλης μέσω της ακεταλδεΐδης σε οξικό και τέλος, διοξείδιο του άνθρακα και νερό τροφοδοτεί τον οργανισμό με 7,1 kcal ανά γραμμάριο αιθανόλης. Ωστόσο, αυτές αναφέρονται ως κενές θερμίδες, επειδή δεν μπορούν να αποθηκευτούν στο σώμα για μελλοντική χρήση, όπως η γλυκόζη που αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου. Επομένως, οι θερμίδες του αλκοόλ χρησιμοποιούνται αμέσως καθώς παράγονται, ακόμη και όταν δεν χρειάζονται. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα τρόφιμα, τα αλκοολούχα ποτά δεν περιέχουν τις βιταμίνες και τα μέταλλα που απαιτούνται για υγιή διαβίωση (Jones, 2015).

Κατά την οξείδωση της αιθανόλης μέσω της ADH στο ήπαρ, το συνένζυμο NAD^+ ανάγεται σε NADH όταν η αιθανόλη οξειδώνεται σε ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε οξικό. Αυτό προκαλεί μία μετατόπιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ήπατος σε ένα περισσότερο ανηγμένο δυναμικό, το οποίο έχει επιπτώσεις σε άλλες μεταβολικές αντιδράσεις που εξαρτώνται από το NAD^+ (Zakhari, 2006). Μεταξύ άλλων, η ισορροπία μεταξύ γαλακτικού οξέος και πυροσταφυλικού οξέος μετατοπίζεται προς το γαλακτικό και αναπτύσσεται γαλακτική οξέωση. Τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αίμα ανταγωνίζονται με το ουρικό οξύ για απέκκριση στα νεφρά, με αποτέλεσμα την υπερουριχαιμία. Η συσσώρευση ουρικού οξέος στο αίμα καθιζάνει ουρικά άλατα στις αρθρώσεις, με αποτέλεσμα την φλεγμονή και τον πόνο. Η ουρική αρθρίτιδα είναι μία κοινή ιατρική πάθηση στους αλκοολικούς (Richette & Bardin, 2010).

Η αυξημένη αναλογία NADH/NAD^+ και η υπερβολική παραγωγή οξικού προάγει τη σύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ η οξείδωση μέσω του κύκλου του Krebs εμποδίζεται (Lieber, 1997). Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση τριγλυκεριδίων και ανάπτυξη λιπώδους ήπατος (στεατώση), το οποίο είναι συχνό σε όσους πίνουν πολύ και σε αλκοολικούς (You & Crabb, 2004). Η περίσσεια NADH και η αντίστοιχη μείωση του πυροσταφυλικού οξέος μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική σύνθεση της γλυκόζης και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπογλυκαιμία, ειδικά αν η πρόσληψη διατροφικών υδατανθράκων είναι περιορισμένη. Το λιπώδες ήπαρ που αναπτύσσεται σε όσους πίνουν πολύ συχνά εξελίσσεται σε ηπατίτιδα (φλεγμονή του ήπατος) και τελικά σε κίρρωση του ήπατος και θάνατο (Lucey et al., 2009).

Ο μεταβολίτης της ακεταλδεΐδης είναι πολύ πιο δραστικός και τοξικός από την αιθανόλη. Η ακεταλδεΐδη έχει εμπλακεί σε πολλές από τις δυσάρεστες συνέπειες της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, συμπεριλαμβανομένης της ηπατοτοξικότητας, του καρκίνου και του κυτταρικού θανάτου και ως μηχανισμός εξάρτησης κι εθισμού (Crabb et al., 2004). Για τους περισσότερους ανθρώπους το μιτοχονδριακό ένζυμο ALDH είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό, οξειδώνοντας την ακεταλδεΐδη στον μη τοξικό μεταβολίτη, οξικό οξύ. Ορισμένες φυλετικές ομάδες, όπως οι Ασιάτες (Κινέζοι, Ιάπωνες και Κορεάτες), κληρονομούν μία ελαττωματική μορφή ALDH, η οποία τους καθιστά λιγότερο ικανούς να μεταβολίσουν την ακεταλδεΐδη (Edenberg, 2007). Εξαιτίας αυτού του γενετικού χαρακτηριστικού, το 40-50% των Ασιατών έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης στο αίμα μετά την κατανάλωση αιθανόλης. Αυτό προκαλεί διάφορες δυσάρεστες αντιδράσεις, όπως ναυτία, ταχυκαρδία, εφίδρωση και έξαψη (Eng et al., 2007).

1.2 Προέλευση της μεταθανάτιας αιθανόλης

Η αξιολόγηση της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης της αιθανόλης στα διάφορα βιολογικά υλικά, που λαμβάνονται κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής και η ερμηνεία του ρόλου της αιθανόλης ως αιτία θανάτου αποτελεί εξαιρετικά δυσχερή διαδικασία στην Δικαστική Τοξικολογία, που περιπλέκεται από πολλούς παράγοντες: η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί μετά θάνατον σε ένα πτώμα, κατά τη μεταφορά των βιολογικών δειγμάτων και κατά την αποθήκευση του πτώματος ή των δειγμάτων πριν τη δειγματοληψία και ούτω καθεξής. Επίσης, σε περιπτώσεις που τα βιολογικά υλικά προέρχονται από πτώματα με προηγμένες σηπτικές εξεργασίες, η εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης που υπήρχε στο αίμα τη στιγμή του θανάτου είναι σχεδόν αδύνατη.

Η παρουσία της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά που λαμβάνονται μεταθανάτια, μπορεί να οφείλεται σε τρεις διαφορετικούς λόγους:

- (α) κατάποση αιθανόλης από το άτομο εν ζωή μετά την κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών,
- (β) ενδογενής αλκοολογένεση εν ζωή, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, πιθανόν λόγω μικροβιακών ζυμώσεων στο έντερο (σύνδρομο εντερικής ζύμωσης) και
- (γ) μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης, είτε στο πτώμα από τους μικροοργανισμούς που δραστηριοποιούνται κατά τη σήψη είτε στα βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία (Ziavrou et al., 2005).

1.2.1 Κατανάλωση αιθανόλης εν ζωή

Η μεταθανάτια ανάλυση αιθανόλης χρησιμοποιεί βιοδείκτες αιθανόλης με στόχο να αποδειχτεί ότι η αιθανόλη είχε καταναλωθεί προθανάτια και δεν παράχθηκε από μικροοργανισμούς μετά θάνατον. Η χρήση βιοδεικτών αιθανόλης είναι μία τεχνική που χρονολογείται από το 1936 (Alsayed et al., 2021). Ο όρος «βιοδείκτης» αναφέρεται σε βιολογικές παραμέτρους και μετρήσιμους δείκτες που παρατηρούνται έξω από τον οργανισμό και παρέχουν πληροφορίες για τις φυσικές διεργασίες του οργανισμού, τις δυσμενείς αλλαγές τους και τη φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση ενός ατόμου ή ενός πληθυσμού. Οι βιοδείκτες έχουν, επίσης, οριστεί ως όλες οι ουσίες, οι δομές, τα προϊόντα διεργασιών που μπορούν να προσδιοριστούν αξιόπιστα στον οργανισμό για την πρόβλεψη

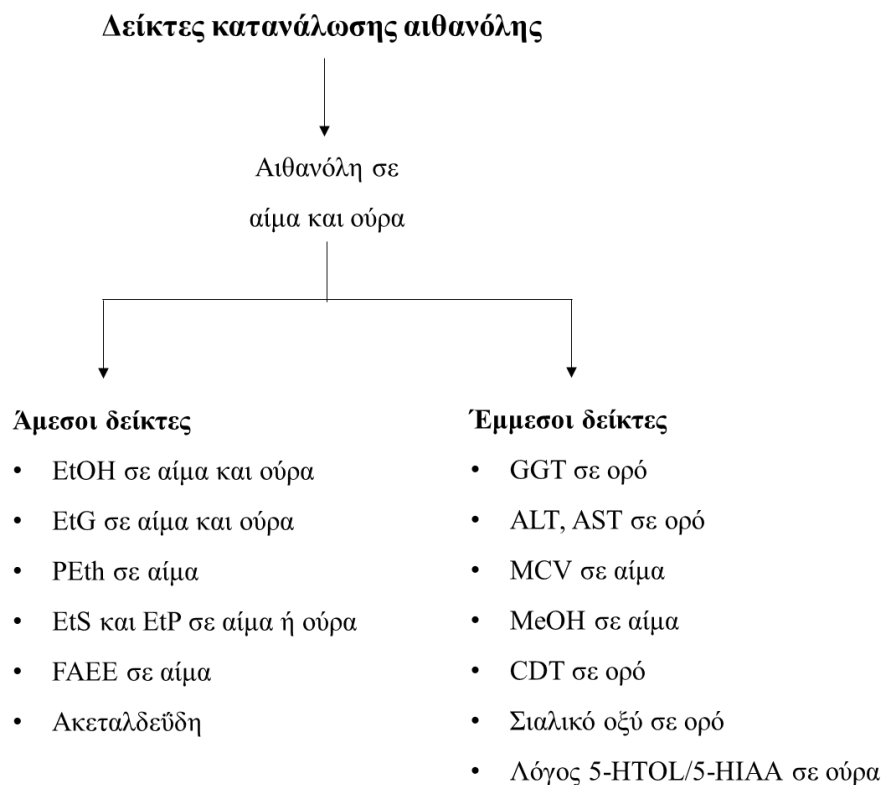
μιας νόσου ή για τη σωστή διάγνωση της υγείας ή της ασθένειας. Η παρουσία βιοδεικτών της πρόσληψης αλκοόλ είναι αποτέλεσμα διαταραχών της μεταβολικής διαδικασίας που προκαλούνται από την αιθανόλη, οδηγώντας σε ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές σε ενώσεις που απαντώνται φυσιολογικά ή στη σύνθεση νέων, μοναδικών δομών (Geppert et al., 2012; Kumar & Sarin, 2010).

Οι δείκτες κατανάλωσης αλκοόλ μπορούν να ταξινομηθούν ως «δείκτες χαρακτηριστικών» (“trait markers”) ή «δείκτες κατάστασης» (“state markers”). Οι «δείκτες χαρακτηριστικών» υποδεικνύουν μια γενετική προδιάθεση για εκδήλωση αλκοολισμού, σε αντίθεση με τους «δείκτες κατάστασης», που χαρακτηρίζουν τη συμπεριφορά κατανάλωσης αλκοόλ. Μόνο οι «δείκτες κατάστασης» μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εργαστηριακή πρακτική για την αξιολόγηση της πρόσληψης αιθανόλης και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε άμεσους και έμμεσους δείκτες αλκοόλης (**Σχήμα 2**). Οι άμεσοι δείκτες σχηματίζονται από την αιθανόλη κατά την ενζυματική διαδικασία και περιέχουν θραύσματα με δύο άτομα άνθρακα όπως η αιθανόλη, π.χ. αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG), θειικός αιθυλεστέρας (EtS), φωσφορικός αιθυλεστέρας (EtP), φωσφατιδυλαιθανόλη (PEth) ή αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAEE), γνωστά ως μη οξειδωτικά μεταβολικά προϊόντα. Η ακεταλδεΐδη, τα προϊόντα προσθήκης ακεταλδεΐδης και το οξικό οξύ περιέχουν, επίσης, δύο άτομα άνθρακα, αλλά σχηματίζονται κατά την οξειδωτική διαδικασία του μεταβολισμού (Woźniak et al., 2018).

Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε παθογόνες αλλαγές σε πολλές βιοχημικές οδούς στον οργανισμό και λειτουργικές και δομικές διαταραχές των κυττάρων ή ακόμη και ολόκληρων οργάνων, ιδιαίτερα του ήπατος. Οι συγκεντρώσεις στο αίμα ή η δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων, π.χ. η γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (Gamma-Glutamyl Transferase, GGT), η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (Aspartate aminotransferase, AST) ή η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (Alanine aminotransferase, ALT), θα μπορούσαν να επηρεαστούν (Niemelä & Alatalo, 2010). Η αύξηση του μέσου όγκου των ερυθροκυττάρων (Mean Corpuscular Volume, MCV) είναι, επίσης, μια τοξική επίδραση του αλκοόλ και των μεταβολιτών του στα αιματολογικά πρόδρομα κύτταρα (Geppert et al., 2012). Επιπλέον, το προφίλ του γλυκοφόρμιου τρανσφερίνης στον ορό, γνωστό ως τρανσφερίνη με ανεπάρκεια υδατανθράκων (Carbohydrate deficient transferrin, CDT) μεταξύ των αλκοολικών είναι, επίσης, διαφορετικό σε σύγκριση με εκείνους που απέχουν από το αλκοόλ (Oberrauch et al., 2008). Αλλαγές σε αυτές τις παραμέτρους, που

παρατηρούνται π.χ. σε εργαστηριακές εξετάσεις αίματος, θα μπορούσαν να υποδεικνύουν πρόσληψη αλκοόλ και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως έμμεσοι δείκτες.

Οι βιοδείκτες της κατανάλωσης αλκοόλ θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη διάρκεια ζωής τους στον οργανισμό. Η ταξινόμηση αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση μεταξύ οξείας μέθης και χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ και καθορίζει τις δυνατότητες ή τους περιορισμούς της χρήσης των βιοδεικτών στην τοξικολογική ανάλυση. Οι άμεσοι δείκτες στα βιολογικά υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο σε βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση, σε αντίθεση με τους έμμεσους δείκτες, οι οποίοι θα μπορούσαν να ανιχνευθούν μακροπρόθεσμα, αλλά σχηματίζονται μόνο μετά από παρατεταμένη κατανάλωση αλκοόλ (με εξαίρεση τον λόγο 5-υδροξυτρυπτοφόλη/5-υδροξυινδολεϊκό οξύ (5-HTOL/5-HIAA), που ανήκει στους βραχυπρόθεσμους δείκτες) (Woźniak et al., 2018).



Σχήμα 2: Ταξινόμηση των βιοδεικτών κατανάλωσης αιθανόλης.

1.2.1.1 Αιθυλογλυκουρονίδιο (EtG)

Το αιθυλογλυκουρονίδιο (αιθυλ β-D-6-γλυκουρονίδιο, EtG) προτάθηκε για πρώτη φορά το 1995 ως βιοδείκτης της κατανάλωσης αιθανόλης (Schmitt et al., 1995). Το EtG είναι ένας δευτερεύων μεταβολίτης που σχηματίζεται στη μη-οξειδωτική μεταβολική διαδικασία. Περίπου το 0,6-1,5% της συνολικής καταναλωθείσας αιθανόλης αποβάλλεται με αυτόν τον τρόπο, ωστόσο ορισμένοι ερευνητές πρότειναν λιγότερο από 0,1% ή ακόμη και 0,02-0,06% (Kugelberg & Jones, 2007). Το EtG παράγεται στο ήπαρ με την ενζυματική σύζευξη της αιθανόλης με γλυκουρονικό οξύ μέσω της δράσης της UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράσης (UGT) (Foti & Fisher, 2005). Στη συνέχεια, το EtG μεταφέρεται με το αίμα από το ήπαρ στα νεφρά και αποβάλλεται με τα ούρα (περίπου 0,04% της λαμβανόμενης αιθανόλης) (Goll et al., 2002). Παρά τη χαμηλή συγκέντρωση του EtG στα ούρα, ο προσδιορισμός του είναι επαρκής για την τοξικολογική ανάλυση. Έχει βρεθεί ότι μετά την κατανάλωση αλκοόλ, η μέγιστη συγκέντρωση EtG επιτυγχάνεται 2-3 ώρες στο αίμα και 5-6 ώρες στα ούρα μετά την κορύφωση της συγκέντρωσης αιθανόλης. Το EtG μπορεί να ανιχνευτεί στα ούρα έως 3 ημέρες σε περιπτώσεις μεμονωμένων περιστατικών οξείας κατανάλωσης οινοπνεύματος και έως 5 ημέρες σε περιπτώσεις χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ και στο αίμα περίπου έως 8 ώρες μετά την πλήρη απέκκριση της αιθανόλης από το αίμα (Høiseith et al., 2007; Wurst et al., 2001). Επιπλέον, εξαιτίας του γεγονότος ότι ο ρυθμός αποβολής του EtG από τον οργανισμό είναι χαμηλότερος από εκείνον της αιθανόλης, το EtG συσσωρεύεται σε όλα τα βιολογικά υγρά όσων καταναλώνουν αλκοόλ και συνεπώς, αυξάνεται ο χρόνος ανίχνευσης του βιοδείκτη.

Η συγκέντρωση του EtG στα βιολογικά υγρά εξαρτάται από την ποσότητα του αλκοόλ που καταναλώνεται, η οποία επηρεάζει το χρονικό διάστημα ανίχνευσης και τις δυνατότητές του για χρήση ως βιοδείκτη. Δυστυχώς, είναι αδύνατο να εκτιμηθεί με ακρίβεια πόση αιθανόλη καταναλώθηκε με τον προσδιορισμό του EtG. Περίπου το 80% του EtG στα ούρα αποβάλλεται κατά τις πρώτες 10-12 ώρες και περίπου το 95-99%, 24 ώρες μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Ωστόσο, τα άτομα με νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να έχουν μεγαλύτερο διάστημα ανίχνευσης EtG στα ούρα σε σύγκριση με υγιή άτομα, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα (Rosano & Lin, 2008). Επιπλέον, η συγκέντρωση του EtG στα ούρα έχει παραλληλιστεί με το επίπεδο της κρεατινίνης, το οποίο μειώνεται μετά την κατανάλωση μεγάλου όγκου νερού ή άλλων ποτών. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί

ότι το επίπεδο του EtG θα πρέπει να ομαλοποιηθεί στην τιμή της κρεατινίνης για να αποφευχθεί η επίδραση της αραίωσης των ούρων (Goll et al., 2002).

Ο προσδιορισμός του EtG στα βιολογικά υγρά είναι πολύ σημαντικός, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις θανάτων. Εάν η αιθανόλη σχηματίστηκε μεταθανάτια από τη δράση μικροοργανισμών, το EtG δεν θα πρέπει να ανιχνευτεί, επειδή είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού που σταματά μετά τον θάνατο. Επομένως, το EtG μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση της μεταθανάτιας προέλευσης της αιθανόλης από την προθανάτια κατανάλωση αλκοόλ (Sundström et al., 2014). Ωστόσο, έχει προταθεί ότι χαμηλά επίπεδα EtG μπορούν να ανιχνευτούν σε περιπτώσεις όπου δεν αναμενόταν η χρήση αλκοόλ (Rosano & Lin, 2008). Μεταξύ 13 παιδιών ηλικίας 1-10 ετών, ανιχνεύτηκε EtG σε 10 άτομα σε περιοχή συγκέντρωσης από 11-80 µg/L. Επομένως, πιστεύεται ότι το χαμηλό επίπεδο ενδογενούς αλκοόλης είναι αρκετό για να σχηματιστεί EtG. Μόνο υψηλότερη συγκέντρωση EtG (πάνω από 100 µg/L) που ανιχνεύεται στα βιολογικά υγρά μπορεί να υποδηλώσει κατανάλωση αλκοόλ.

Τα τελευταία χρόνια, η ποσοτικοποίηση του EtG στα μαλλιά (hEtG) έχει καθιερωθεί ως ο πιο αξιόπιστος δείκτης της μακροχρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ τόσο σε κλινικό όσο και σε ιατροδικαστικό πλαίσιο (Biondi et al., 2019; Crunelle et al., 2014; Kharbouche et al., 2012; G. Skopp et al., 2000). Παραδείγματα κλινικών χρήσεων περιλαμβάνουν τον έλεγχο για διαταραχές από τη χρήση αλκοόλ, υποτροπές κατά την κατανάλωση αλκοόλ, έκθεση εμβρύου σε αλκοόλ και αξιολόγηση της καταλληλότητας για μεταμόσχευση ήπατος. Παραδείγματα ιατροδικαστικών χρήσεων περιλαμβάνουν το δικαίωμα στην άδεια οδήγησης και στη χρήση πυροβόλων όπλων, μεταθανάτιες περιπτώσεις και έλεγχος στον χώρο εργασίας (Andresen-Streichert et al., 2018; Biondi et al., 2019). Το EtG εμφανίζει υψηλότερη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα, μεγαλύτερο διάστημα ανίχνευσης (3-6 μήνες) και καλύτερη συσχέτιση με την ποσότητα αλκοόλ που καταναλώνεται (Boscolo-Berto et al., 2014; Høiseth et al., 2009). Κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης, οι ουσίες μπορούν να εισέλθουν στα μαλλιά είτε μέσω ενσωμάτωσης με διάχυση από το αίμα σε αναπτυσσόμενα κύτταρα είτε με εναπόθεση από ιδρώτα ή σμήγμα στον ολοκληρωμένο άξονα της τρίχας (Albermann et al., 2010). Το επίπεδο ενσωμάτωσης επηρεάζεται από την ποσότητα έκθεσης στα μαλλιά από καθεμία από αυτές τις πηγές, το pH των περιβαλλόντων θρεπτικών υλικών, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας, την ευκαιρία και την ικανότητά της να διεισδύσει στα μαλλιά και στις θέσεις πρόσδεσής της.

Η μέτρηση των επιπέδων του EtG μπορεί να είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της νηφαλιότητας των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία για τον αλκοολισμό, όταν δεν ανιχνεύεται αιθανόλη στα βιολογικά υγρά. Ωστόσο, λόγω του σύντομου χρόνου ανίχνευσης, η εξέταση θα πρέπει να γίνεται κάθε λίγες ημέρες (Skipper et al., 2004).

Η σταθερότητα του EtG στα δείγματα ούρων είναι ικανοποιητική. Όταν αποθηκεύεται στους 4°C, η συγκέντρωση παραμένει σταθερή για 5 εβδομάδες (Schloegl et al., 2006). Η βακτηριακή μόλυνση των ούρων μπορεί να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της ανάλυσης EtG (Helander & Dahl, 2005). Αντίθετα, το EtG μπορεί να σχηματιστεί σε ένα βιολογικό δείγμα μετά τη συλλογή, εάν το δείγμα έχει μολυνθεί με *Escherichia coli* και υπάρχει ή παράγεται αιθανόλη κατά την αποθήκευση. Αυτό δεν μπορεί πάντα να αποφευχθεί με προσθήκη φθοριούχου νατρίου ή αποθήκευση στους 4°C (Helander et al., 2007).

Το EtG είναι μία μη πτητική, υδατοδιαλυτή ένωση και ως εκ τούτου, οι καλύτερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της EtG με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα είναι η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας και διαδοχική φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS και Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS). Η τεχνική αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος, αλλά απαιτείται ένα βήμα παραγωγοποίησης για τη λήψη πτητικών ενώσεων, διαδικασία που είναι πιο χρονοβόρα. Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) με μέθοδο έμμεσης ανίχνευσης UV αναπτύχθηκε, επίσης, για τον προσδιορισμό της EtG στα βιολογικά υγρά. Το αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτείται πολύπλοκο και δαπανηρό στάδιο προετοιμασίας των δειγμάτων, όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Η ευαισθησία είναι ικανοποιητική, αλλά η παρουσία κάποιων άλλων ενώσεων στο υπόστρωμα, όπως π.χ. το γαλακτικό, το οξικό και το ουρικό, μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία και την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού και την ανάλυση (Alsayed et al., 2021; Křivánková et al., 2005).

1.2.1.2 Θεικός αιθυλεστέρας (EtS)

Ο θεικός αιθυλεστέρας, EtS, είναι άλλος ένας μη οξειδωτικός μεταβολίτης της αιθανόλης. Μέχρι περίπου το 2004, ο EtS θεωρούνταν μεταβολίτης της αιθανόλης σε ζωικά μοντέλα, ωστόσο βρέθηκε ότι αποτελεί κοινό συστατικό στα ούρα των ανθρώπων μετά την πρόσληψη αλκοόλ (Helander & Beck, 2004). Περίπου το 0,1% της καταναλωθείσας αιθανόλης συζεύγνυται με θεικά άλατα, τα οποία υπάρχουν φυσικά στον οργανισμό, για να σχηματίσουν EtS. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από μια υπεροικογένεια κυτοσολικών σουλφοτρανσφερασών (Sulfotransferase, SULF). Διαπιστώθηκε ότι μπορεί να εμφανιστεί γενετικός πολυμορφισμός στα γονίδια SULF, που οδηγεί σε διαφορές στη δραστηριότητα αυτών των ενζύμων. Ως εκ τούτου, μπορεί να παραχθούν διαφορετικές ποσότητες EtS μεταξύ διαφορετικών ατόμων, γεγονός που οδηγεί σε δυσκολίες στον καθορισμό της συσχέτισης μεταξύ της ποσότητας της καταναλωθείσας αιθανόλης και του επιπέδου του EtS (Carlini et al., 2001; Maenhout et al., 2013).

Μόνο περίπου το 0,010-0,016% της καταναλωθείσας αιθανόλης απεκκρίνεται ως EtS στα ούρα, αλλά αυτό το ποσοστό είναι αρκετό για τοξικολογική ανάλυση. Η μέγιστη συγκέντρωση του EtS επιτυγχάνεται περίπου 2-3 ώρες στο αίμα και 4-6 ώρες στα ούρα μετά την πρόσληψη αλκοόλ. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος της λαμβανόμενης αιθανόλης αποβάλλεται ως EtS στα ούρα μετά από περίπου 12-24 ώρες. Αυτό προκαλεί δυσκολίες στην ανίχνευση του EtS μετά από περισσότερες από 24-48 ώρες μετά τη λήψη αιθανόλης, λόγω της πολύ γρήγορης μείωσης του επιπέδου της στα βιολογικά υγρά. Ο χρόνος ανίχνευσης του EtS είναι περίπου 10-14 ώρες στον ορό και 2-4 ημέρες στα ούρα (ανάλογα με την ποσότητα της αιθανόλης) (Halter et al., 2008; Wurst et al., 2006).

Ο EtS μπορεί, επίσης, να παραχθεί με ζύμωση των ζυμομυκήτων, καθώς παρατηρήθηκε αυξημένο επίπεδο EtS στα ούρα μετά από κατάποση μαγιάς αρτοποιίας και ζάχαρης (Thierauf et al., 2010). Επομένως, ακόμη και χαμηλή συγκέντρωση EtS μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς πρόσληψη αλκοόλ. Είναι πιθανό ότι η αιθανόλη που παράγεται από μικροοργανισμούς στο εσωτερικό του οργανισμού μπορεί να είναι πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό EtS.

Η σταθερότητα του EtS στα ούρα στους 4°C είναι συγκρίσιμη με εκείνη του EtG, δηλαδή περισσότερο από 3 εβδομάδες (Wurst et al., 2006). Σε αντίθεση με το EtG, το EtS είναι βιοαποδομήσιμο μόνο υπό συνθήκες υψηλής βακτηριακής μόλυνσης (Baranowski et

al., 2008). Η συγκέντρωση του EtS στα ούρα μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την κατανάλωση υπερβολικών ποσοτήτων νερού ή υγρών πριν την ανάλυση.

Έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό του EtS στην εργαστηριακή πρακτική. Λόγω της πολικής του φύσης, οι πιο συχνά αναφερόμενες στη βιβλιογραφία μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ή διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS ή LC-MS/MS). Οι τεχνικές αυτές είναι πρόσφορες, επειδή δεν απαιτούν βήμα παραγωγοποίησης. Επίσης, το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος είναι απλό· συνήθως το δείγμα αραιώνεται με μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, το οποίο οδηγεί σε καθίζηση πρωτεϊνών και μειώνει τα φαινόμενα επίδρασης του υποστρώματος. Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE) με την έμμεση ανίχνευση UV μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος για τον προσδιορισμό του EtS (Alsayed et al., 2021; Jung et al., 2008).

Παρά τις πολλές ομοιότητες μεταξύ του EtS και του EtG, το EtG είναι πιο γνωστή ένωση, καθώς χρησιμοποιείται συχνότερα ως βιοδείκτης κατανάλωσης αλκοόλ και υπάρχουν περισσότερες μέθοδοι που περιγράφονται στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του. Ωστόσο, λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας ζωής του EtS στα ούρα, προτείνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του σε σύγκριση με εκείνης του EtG.

1.2.1.3 Φωσφορικός αιθυλεστέρας (EtP)

Ο σχηματισμός του φωσφορικού αιθυλεστέρα, EtP, περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1972 στο ήπαρ αρουραίων μετά από λήψη αλκοόλ. Ο EtP ανιχνεύτηκε, επίσης, σε δείγματα ορού και ούρων που ελήφθησαν από αλκοολικούς, όπου τα αποτελέσματα για EtG και EtS ήταν, επίσης, θετικά. Έχει προταθεί ότι το EtP μπορεί να σχηματιστεί κατά τη διάρκεια της αιθανόλυσης των φωσφορικών εστέρων που απαντώνται φυσιολογικά στον άνθρωπο και μπορεί να συσχετιστεί με την κατανάλωση αιθανόλης (Tomaszewski & Buchowicz, 1972). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το επίπεδο του EtP στα ανθρώπινα ούρα μπορεί να αυξηθεί μετά την κατανάλωση αλκοόλ, ωστόσο, το χρονικό διάστημα ανίχνευσης είναι μικρό και η ευαισθησία αυτής της ένωσης ως βιοδείκτη κατανάλωσης αιθανόλης είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα EtG και EtS (Bicker et al., 2006).

1.2.1.4 Φωσφατιδυλαιθανόλη (PEth)

Η φωσφατιδυλαιθανόλη, PEth, προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1984 στο ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα νεφρά αρουραίων μετά από λήψη αλκοόλ (Alling et al., 1984). Είναι ένα μοναδικό φωσφολιπίδιο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως βιοδείκτης για την κατανάλωση αιθανόλης, γιατί σχηματίζεται μόνο μετά την πρόσληψη αλκοόλ. Η PEth δεν είναι ένα μεμονωμένο μοριακό είδος, αλλά μια ομάδα φωσφολιπιδίων με κοινή μη πολική ομάδα κεφαλής φωσφοαιθανόλης πάνω στην οποία συνδέονται δύο τμήματα λιπαρών οξέων με μεταβλητό μήκος ανθρακικής αλυσίδας και βαθμό κορεσμού (σε θέση sn-1 και sn-2) (Maenhout et al., 2013).

Η PEth συντίθεται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες των ερυθροκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και των ιστών του εγκεφάλου και του ήπατος από αιθανόλη και φωσφατιδυλοχολίνη (Phosphatidylcholine, PC). Η αιθανόλη προσκολλάται στη φωσφατιδυλοχολίνη μέσω μιας αντίδρασης τρανσφωσφατιδυλίωσης μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης D (Phospholipase D, PLD), η οποία οδηγεί στον σχηματισμό μορίων PEth και χολίνης (Gustavsson, 1995). Η PLD είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη βιοχημική υδρόλυση της PC σε φωσφατιδυλικό οξύ. Ωστόσο, παρουσία αιθανόλης, ο ρυθμός τρανσφωσφατιδυλίωσης της PC επιταχύνεται, επειδή η PLD προτιμά τα μόρια αιθανόλης έναντι του νερού ως υπόστρωμα (η συγγένεια για την αιθανόλη είναι περίπου 1000 φορές μεγαλύτερη από ότι για το νερό) (Aradottir & Olsson, 2005).

Η PEth έχει προταθεί ως βιοδείκτης κατανάλωσης αιθανόλης λόγω της υψηλής ευαισθησίας της (σε πολλές περιπτώσεις ως 100%), της ειδικότητάς της και του αργού ρυθμού αποδόμησης (Wurst et al., 2010). Το ολικό αίμα προτείνεται ως το βιολογικό υλικό για τη μέτρηση της PEth λόγω της συγγενείας του με τις κυτταρικές μεμβράνες. Όσοι κάνουν κατάχρηση αλκοόλ έχουν συγκέντρωση PEth στο αίμα που κυμαίνεται από 5 έως 35 $\mu\text{mol/L}$, ανάλογα με την περίοδο κατανάλωσης και την ημερήσια δόση αιθανόλης. Επιπλέον, η PEth είναι ο μόνος βιοδείκτης που δεν δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, πράγμα που σημαίνει ότι δεν ανιχνεύεται μεταξύ όσων απέχουν από το αλκοόλ (δεν μπορεί να σχηματιστεί από ενδογενή αιθανόλη) (Hansson et al., 1997). Επίσης, η PEth δεν ανιχνεύεται μετά από μία μόνο λήψη μεγάλης δόσης αλκοόλ. Επομένως, σε συνδυασμό με το EtG ή τον EtS, μπορεί να χρησιμεύει ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ οξείας και χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ, αλλά απαιτείται επίσης σημαντική πρόσληψη αλκοόλ (η μέση ημερήσια δόση αιθανόλης θα πρέπει να είναι περίπου 50 g σε μία περίοδο λίγων ημερών)

(Varga et al., 1998). Το διάστημα ανίχνευσης της PEth δεν είναι πλήρως σαφές, επειδή συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την καταναλωθείσα ποσότητα αιθανόλης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η PEth παραμένει ανιχνεύσιμη ως και 14 ημέρες μετά τη λήψη περίπου 60-300 γραμμαρίων αιθανόλης τις προηγούμενες 7 ημέρες (Hansson et al., 1997). Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ότι μια δόση μεγαλύτερη από 1000 g αιθανόλης που λαμβάνεται για περίοδο τριών εβδομάδων (περίπου 60 g/ημέρα) είναι επαρκής για την ανίχνευση PEth στο αίμα για χρονικό διάστημα έως και 21 ημέρες (Varga et al., 1998). Επιπλέον, δεν βρέθηκαν διαφορές φύλου για τα επίπεδα PEth. Ωστόσο, η ευαισθησία της ανίχνευσης του PEth μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, το οποίο είναι το κύριο μειονέκτημα της χρήσης αυτής της ένωσης ως βιοδείκτη (Wurst et al., 2010). Επίσης, βρέθηκε ότι η σύνθεση της PEth μπορεί να λάβει χώρα *in vitro* κατά την αποθήκευση δειγμάτων αίματος που περιέχουν αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου. Για να αποφευχθεί αυτό το ζήτημα απαιτείται η κατάψυξη των δειγμάτων σε υγρό άζωτο και η αποθήκευσή τους στους -80°C πριν την εκχύλιση (Aradottir et al., 2004).

Η PEth είναι μία μη πτητική ένωση κι επομένως, έχει προταθεί η εκχύλιση υγρού-υγρού από ολικό αίμα με μείγμα εξάνιου και ισοπροπανόλης (Hexane and Isopropanol, HIP) ως μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων (Woźniak et al., 2018). Διαπιστώθηκε ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες ανακτήσεις όταν προστίθενται ισοπροπανόλη και εξάνιο στην ίδια αναλογία, αλλά χωριστά, ένα προς ένα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι κυτταρικές μεμβράνες των ερυθροκυττάρων διαταράσσονται από την προπανόλη, η οποία καθιστά τα εσωτερικά φωσφολιπίδια, όπως τη PEth, πιο διαθέσιμα για το εξάνιο (Aradottir et al., 2004). Η διαχυτική υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της PEth. Τα ληφθέντα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά (ανακτήσεις στην περιοχή 66-74 με ακρίβεια που κυμαίνεται από 80 έως 120%) με επιπλέον μείωση της ποσότητας των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται στο στάδιο προετοιμασίας του δείγματος, που είναι το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου (Cabarcos et al., 2013).

Αρχικά, η PEth προσδιορίστηκε με πυκνομετρική σάρωση με ανίχνευση UV. Ωστόσο, ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation, CV) αυτής της μεθόδου ήταν σχετικά υψηλός (Hansson et al., 1997). Ως εκ τούτου, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με τη μέθοδο ανίχνευσης της σκέδασης του φωτός με εξάτμιση (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) αναπτύχθηκε για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα. Επιπλέον, με την ανάπτυξη των

τεχνικών χρωματογραφίας, πολλοί ερευνητές χρησιμοποίησαν το LC-MS ή το LC-MS/MS ως τις πιο ευαίσθητες και ακριβείς τεχνικές για τον προσδιορισμό της PEth.

Αν και οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και επιτρέπουν τη λήψη χαμηλών ορίων ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης, σε πολλές περιπτώσεις απαιτούν περίπλοκες διαδικασίες προετοιμασίας δείγματος και ακριβή οργανολογία. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί ανοσολογικές (Nissinen et al., 2008, 2012) και ηλεκτροφορητικές μέθοδοι (Nalesso et al., 2010; Varga & Nilsson, 2008) που εφαρμόζονται πιο εύκολα. Δημιουργήθηκαν μονοκλωνικές κυτταρικές σειρές που παράγουν αντισώματα IgM (Immunoglobulin M) που συνδέονται ειδικά με τη PEth, αλλά όχι με δομικά ή χημικά παρόμοια φωσφολιπίδια, όπως φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδικό οξύ ή καρδιολιπίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αντισώματα αντι-PEth μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση PEth σε μια δοκιμασία φθορίζουσας PEth και ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων που ενεργοποιούνται με φθορισμό (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS) (Nissinen et al., 2008). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί οι τρεις ανοσοσφαιρίνες του πλάσματος IgG (Immunoglobulin G), IgA (Immunoglobulin A) και IgM και τα αντισώματά τους που συνδέονται ειδικά με τη PEth μεταξύ των ατόμων που έχουν καταναλώσει αλκοόλ (Nissinen et al., 2012). Ωστόσο, άτομα με υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης πλάσματος σε PEth και μειωμένα επίπεδα αντισωμάτων αντι-PEth σε σύγκριση με τα άτομα με περιστασιακή χρήση αιθανόλης. Επομένως, τα επίπεδα μέτρησης της δέσμευσης ανοσοσφαιρίνης στη PEth δείχνουν μεγάλη δυνατότητα χρήσης της ως βιοδείκτης για τη διάκριση της υπερβολικής και μέτριας χρήσης αλκοόλ, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτής της μεθόδου.

Έχει, επίσης, αναπτυχθεί η ανάλυση της PEth χρησιμοποιώντας μη υδατική τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Nonaqueous Capillary Electrophoresis, NACE) με ανίχνευση UV. Η NACE έχει υψηλότερη ανάλυση και απόδοση διαχωρισμού, απαιτεί μικρότερους όγκους δειγμάτων, έχει μικρότερο χρόνο ανάλυσης και δεν απαιτεί ακριβή οργανολογία σε σύγκριση με τις μεθόδους LC (Nalesso et al., 2010; Varga & Nilsson, 2008).

1.2.1.5 Αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEEs)

Το 1996, ο προσδιορισμός των αιθυλεστερών των λιπαρών οξέων, FAEEs, στο αίμα θεωρήθηκε χρήσιμος δείκτης τόσο για την οξεία όσο και για τη χρόνια πρόσληψη αλκοόλ (Doyle et al., 1996). Λιγότερο από 0,1% της καταναλωθείσας αιθανόλης απεκκρίνεται συζευγμένη με λιπαρά οξέα. Ο μυριστικός αιθυλεστέρας, ο παλμιτικός αιθυλεστέρας, ο στεατικός αιθυλεστέρας και ο ελαϊκός αιθυλεστέρας είναι οι κύριες ενώσεις που σχηματίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την κατανάλωση αλκοόλ, από ελεύθερα λιπαρά οξέα, καθώς και από τριακυλογλυκερόλες, λιποπρωτεΐνες και φωσφολιπίδια με ενζυματική εστεροποίηση με αιθανόλη μέσω της δράσης της συνθάσης των FAEEs (Chang et al., 1997). Άλλοι FAEEs δεν βρίσκονται πάντα ή εμφανίζονται σε χαμηλά επίπεδα. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι υπάρχουν περισσότερα ένζυμα που εμπλέκονται στον σχηματισμό των FAEEs, όπως οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, η παγκρεατική εστεράση της χοληστερόλης, η καρβοξυλεστεράση του λιπώδους ιστού, η παγκρεατική καρβοξυλεστερική λιπάση και η παγκρεατική τριγλυκεριδική λιπάση, αλλά ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πλήρως κατανοητός (Dasgupta, 2015). Ωστόσο, πιστεύεται ότι οι λιπάσες που υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς, π.χ. στις τριακυλογλυκερόλες σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, παίζουν βασικό ρόλο στον σχηματισμό των FAEEs, καθώς τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι πιο προσιτά για τα μόρια αιθανόλης στην αντίδραση εστεροποίησης από εκείνα που συνδέονται με τα λιπίδια. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στον σχηματισμό των FAEEs είναι υψηλότερη στα όργανα που καταστρέφονται συχνότερα από τη δηλητηρίαση με αιθανόλη, ειδικά στο πάγκρεας και το ήπαρ, και σε μικρότερο βαθμό στην καρδιά, τον εγκέφαλο και τον λιπώδη ιστό (Doyle et al., 1994). Στον ορό οι FAEEs συνδέονται με την αλβουμίνη και τις λιποπρωτεΐνες (Dasgupta, 2015; Doyle et al., 1994). Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι παρουσία αιθανόλης μπορεί να παραχθούν FAEEs σε ανθρώπινα αιμοπετάλια. Ωστόσο, η υδρόλυση σύνθετων αιμοπεταλίων με FAEEs είναι πολύ γρήγορη (Salem et al., 2005). Οι FAEEs ταυτοποιούνται μόνο σε ολικό αίμα για κλινική χρήση ρουτίνας, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και όργανα (ήπαρ, πάγκρεας, καρδιά, εγκέφαλος ή λιπώδης ιστός) για ιατροδικαστική εφαρμογή (Doyle et al., 1994). Επιπλέον, από το 2001 έχει καθιερωθεί ο προσδιορισμός των FAEEs σε τρίχες, ωστόσο είναι κατάλληλος μόνο για την επαλήθευση της κατανάλωσης αλκοόλ και όχι της αποχής (Andresen-Streichert et al., 2018; Auwärter et al., 2001).

Μελέτες έδειξαν ότι οι FAEEs παρέμειναν στο αίμα για τουλάχιστον 24 ώρες μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για σχηματισμό των FAEEs από ενδογενή αιθανόλη. Αυτό οφείλεται στον γρήγορο ρυθμό υδρόλυσής τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και αιθανόλη από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (Doyle et al., 1996; Saghir et al., 1999). Η συγκέντρωση των FAEEs στον ορό εξαρτάται από τη χρονική περίοδο κατανάλωσης αλκοόλ, και επομένως σε μακροχρόνια χρήση τα επίπεδα αυτών των ενώσεων είναι υψηλότερα από ότι μετά από μία μόνο εφάπαξ κατανάλωση. Ως εκ τούτου, είναι ανιχνεύσιμοι για μεγαλύτερο διάστημα μετά από χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (έως 48 ή ακόμη και ως 100 ώρες). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις τους μειώνονται γρήγορα (περίπου 95% κατά τις πρώτες 24 ώρες). Τα μέγιστα επίπεδα FAEEs στον ορό μπορούν να παρατηρηθούν περίπου 1,5-2 ώρες μετά την κατανάλωση αιθανόλης, ενώ δεν έχουν ανιχνευτεί στα ούρα. Παρά το σύντομο διάστημα ανίχνευσης σε σύγκριση με άλλους βιοδείκτες, οι συγκεντρώσεις των FAEEs στον ορό είναι χρήσιμες για τοξικολογική ανάλυση μόνο λόγω της υψηλής ειδικότητάς τους (Borucki et al., 2007; Laposata, 1997).

Οι FAEEs είναι ενώσεις χαμηλής πολικότητας κι επομένως, οι πιο δημοφιλείς μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο στάδιο προετοιμασίας του δείγματος βασίζονται στην εκχύλιση υγρού-υγρού με μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο, ή μη πολικούς διαλύτες που περιέχουν χαμηλές ποσότητες πολικών διαλυτών (μείγμα εξανίου και ακετόνης, χλωροφόρμιο ή νερό). Αρχικά, αναπτύχθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων, ακολουθούμενη από ανάλυση αέριας χρωματογραφίας (GC). Ωστόσο, οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 61 έως 67% για εκχύλιση με εξάνιο (Bernhardt et al., 1996) και 70% στην περίπτωση εκχύλισης με μείγμα χλωροφορμίου και μεθανόλης (Kaphalia et al., 2004). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) με στήλη αμινοπροπυλοπυριτίου για την ενίσχυση των ανακτήσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ανακτήσεις αυξήθηκαν έως και περισσότερο από 90% (ανάλογα με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνταν για την εκχύλιση) (Kulig et al., 2006). Μελέτες έδειξαν σχηματισμό FAEEs *in vitro* κατά την αποθήκευση δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (ακόμη και για 24 ώρες), η οποία προκαλείται από τη συνθετική δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων ή των αιμοπεταλίων, που έχουν δραστηριότητα συνθάσης των FAEEs. Η αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C ή στους -80°C για έως και δύο ημέρες δεν μεταβάλλει τη συγκέντρωση των FAEEs και ως εκ τούτου προτείνεται η αποθήκευση των δειγμάτων σε αυτή τη θερμοκρασία πριν από την ανάλυση (Maenhout et al., 2013).

Η πτητική φύση των FAEEs τα καθιστά κατάλληλα για GC ανάλυση. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικές στήλες με πολική στατική φάση, αλλά οι χρόνοι ανάλυσης κυμαίνονταν από 30 έως 40 λεπτά (Bernhardt et al., 1996; Doyle et al., 1996; Kaphalia et al., 2004). Ωστόσο, η εφαρμογή λιγότερο πολικών στηλών, όπως π.χ. με διμεθυλοπολυσιλοξάνη ή (5%-Φαινυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνη ως προσροφητικά υλικά, προσφέρει καλή ανάλυση με πολύ μικρότερο χρόνο κατακράτησης (ο χρόνος μειώθηκε έως και 60%) (Borucki et al., 2007; Kulig et al., 2006). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε είτε με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας είτε με φασματομετρία μάζας. Η HPLC ανάστροφης φάσης με μέθοδο ανίχνευσης UV χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον διαχωρισμό των FAEEs, αλλά ο χρόνος ανάλυσης ήταν μεγαλύτερος από 95 λεπτά με χαμηλή ευαισθησία.

1.2.1.6 Οξειδωτικά προϊόντα του μεταβολισμού της αιθανόλης

Έχει αναφερθεί ότι το 90-95% της καταναλωθείσας αιθανόλης μεταβολίζεται σε ακεταλδεΐδη κι έπειτα σε οξικό οξύ μέσω της δράσης των ηπατικών ενζύμων αλκοολική αφυδρογονάση και αλδεϋδική αφυδρογονάση, αντίστοιχα. Τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης βρέθηκαν ότι ήταν σημαντικά υψηλότερα στο ολικό αίμα, στα ούρα (Otsuka et al., 1999) και στο σάλιο (Ramdzan et al., 2013) μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές δε βρίσκουν εφαρμογή στην τοξικολογική ανάλυση, επειδή τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης και του οξικού οξέος μειώνονται πολύ γρήγορα (επιστρέφουν σε επίπεδα που δε διαφέρουν σημαντικά από τα αρχικά περίπου 3,5 ώρες μετά το τέλος της κατανάλωσης). Η συγκέντρωση της ελεύθερης ακεταλδεΐδης στα βιολογικά υγρά είναι εξαιρετικά χαμηλή λόγω της ικανότητάς της να συζεύγνυται με πρωτεΐνες, π.χ. αιμοσφαιρίνη, αλβουμίνη και αμίνες (η ακεταλδεΐδη σχηματίζει τη βάση του Schiff με αυτές τις ενώσεις), οι οποίες περιέχουν θραύσματα αμίνης. Τα προϊόντα προσθήκης ακεταλδεΐδης είναι εξαιρετικά σταθερά κι εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερο χρόνο ανίχνευσης, ακόμη και έως ένα μήνα. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ότι οι ενώσεις αυτές είναι μια καλύτερη επιλογή για την παρακολούθηση της πρόσληψης αλκοόλ από την ελεύθερη ακεταλδεΐδη ή το οξικό οξύ. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα προσθήκης ακεταλδεΐδης έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται στα ερυθροκύτταρα των μη αλκοολικών, ακόμη και μετά από περιστασιακή κατανάλωση αλκοόλ. Τα επίπεδα των προϊόντων προσθήκης ακεταλδεΐδης εξαρτώνται, επίσης, από το φύλο και είναι χαμηλότερα στις γυναίκες λόγω του χαμηλότερου επιπέδου

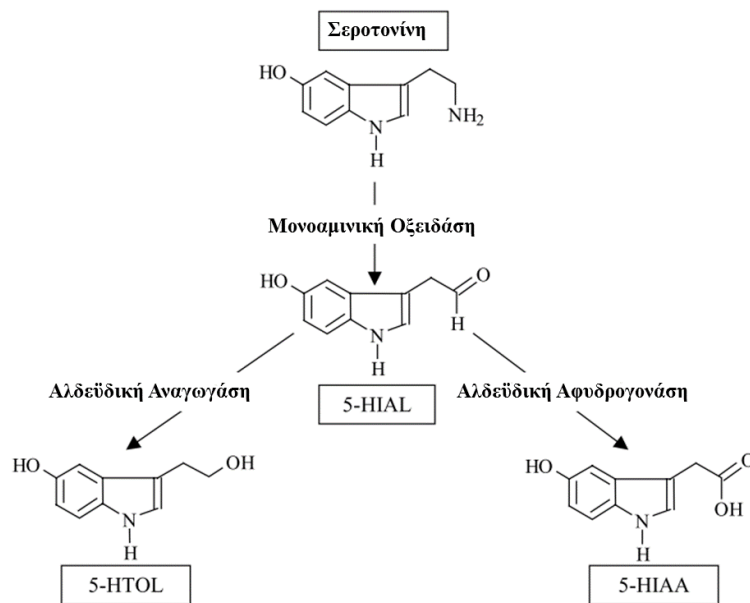
της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Bean et al., 2001). Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι το κάπνισμα αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα ακεταλδεΐδης στο σάλιο, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Αυτή η επίδραση δεν παρατηρήθηκε για τα προϊόντα προσθήκης ακεταλδεΐδης, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα χρήσης αυτών των μορίων ως βιοδείκτες της κατανάλωσης αλκοόλ (Salaspuro & Salaspuro, 2004). Ωστόσο, οι δίαιτες πλούσιες σε λιπαρά, το καρκίνωμα των νεφρών, η χρόνια παγκρεατίτιδα και οι ηπατικές δυσλειτουργίες προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας της αλκοολικής αφυδρογονάσης και διεγείρουν τον σχηματισμό ακεταλδεΐδης και προϊόντων προσθήκης ακεταλδεΐδης και δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Niemelä, 2007). Επίσης, οι άνθρωποι εκτίθενται συχνά στην ακεταλδεΐδη που εμφανίζεται στον αέρα ή στα τρόφιμα ως μολυσματικό παράγοντα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα μειονεκτήματα, προτάθηκε ότι ο προσδιορισμός των προϊόντων προσθήκης ακεταλδεΐδης μπορεί να παρέχει διαγνωστικές εφαρμογές για την ανίχνευση ασθένειας που προκαλείται από την αιθανόλη παρά την παρακολούθηση της κατανάλωσής της (Niemelä & Alatalo, 2010).

1.2.1.7 Μεταβολίτες της σεροτονίνης

Η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη ή 5-HT) είναι ένας νευροδιαβιβαστής, ο οποίος υφίσταται οξειδωτική απαμίνωση στο ήπαρ που καταλύεται από τη μονοαμινοξειδάση (Monoamine Oxidase, MAO) για την παραγωγή μιας ενδιάμεσης αλδεΐδης, της 5-υδροξυ-ινδολακεταλδεΐδης (5-Hydroxyindoleacetaldehyde, 5-HIAL). Η τελευταία μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω με αλδεΐδική αφυδρογονάση (ALDH) σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA), το οποίο στη συνέχεια απεκκρίνεται μέσω των νεφρών με τα ούρα. Ωστόσο, ένα μικρό κλάσμα του 5-HIAL ανάγεται από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) σε έναν αλκοολικό μεταβολίτη, την 5-υδροξυτρυπτοφόλη (5-HTOL), η οποία συζευγνύεται με γλυκουρονικό οξύ πριν την απέκκριση στα ούρα. Χωρίς κατάποση αιθανόλης, το 5-HIAA είναι ο κυρίαρχος μεταβολίτης σε σύγκριση με την 5-HTOL σε αναλογία 1000:1, επομένως, η αναλογία συγκέντρωσης 5-HTOL/5-HIAA στα ούρα έχει μονάδα pmol/nmol (Beck & Helander, 2003).

Μετά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, ο πρωτεύων μεταβολίτης της αιθανόλης, η ακεταλδεΐδη, ανταγωνίζεται την 5-HIAL για τη θέση δέσμευσης στην ALDH. Επιπλέον, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του ήπατος μετατοπίζεται σε ένα πιο ανηγμένο

δυναμικό κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της αιθανόλης με αποτέλεσμα την περίσσεια NADH, την ανηγμένη μορφή του συμπαραγόντα NAD⁺. Η αυξημένη αναλογία NADH/NAD⁺ προάγει τη μείωση της 5-HIAL σε 5-HTOL (Voltaire et al., 1992). Συνολικά, ο αυξημένος λόγος NADH/NAD⁺ και ο ανταγωνισμός για ALDH ευθύνονται για την παρατηρούμενη υψηλότερη αναλογία 5-HTOL/5-HIAA στα ούρα μετά την κατανάλωση αιθανόλης, η οποία χρησιμεύει ως βιοδείκτης της πρόσφατης κατανάλωσης αλκοόλ (Beck et al., 2007). Συγκεκριμένα, αν ο λόγος 5-HTOL/5-HIAA είναι >15 (pmol/nmol), αυτό υποδεικνύει ότι η αιθανόλη έχει υποστεί μεταβολισμό, γεγονός που υποδηλώνει την προθανάτια κατάποση αλκοόλ (Helander et al., 1992; Johnson et al., 2005). Στο **Σχήμα 3** απεικονίζεται η μεταβολική αλληλεπίδραση μεταξύ της 5-HT και της αιθανόλης.



Σχήμα 3: Ο μεταβολισμός της σεροτονίνης (5-HT) στην αντίστοιχη αλδεϋδη (5-HIAL) από τη μονοαμινοξειδάση και η μετατροπή της τελευταίας σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA) ή στον ανηγμένο μεταβολίτη 5-υδροξυτρυπτοφόλη (5-HTOL). Όταν η αιθανόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ, ο μεταβολισμός της 5-HT μετατοπίζεται προς τον μεταβολίτη 5-HTOL, που οδηγεί σε αυξημένο λόγο 5-HTOL/5-HIAA στα ούρα (Lin et al., 2020).

Ο λόγος 5-HTOL/5-HIAA έχει δύο πλεονεκτήματα όσον αφορά τη διάκριση της προέλευσης της αιθανόλης μεταθανάτια. Πρώτον, ο παραπάνω λόγος είναι ιδιαίτερα ειδικός για την κατανάλωση αιθανόλης. Οι γενετικές διαφορές και η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε σεροτονίνη, όπως η μπανάνα, ή η φαρμακευτική αγωγή με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης 5-HT δεν αλλοιώνουν τον μεταβολισμό της 5-HT (Johnson et al., 2005).

Δεύτερον, η 5-HTOL και το 5-HIAA είναι σταθερά στα ούρα και δεν παρουσιάζουν αξιόλογη αποδόμηση μετά την αποθήκευση των δειγμάτων για 180 ημέρες στους -20°C (Johnson et al., 2005).

1.2.2 Ενδογενής αλκοολογένεση εν ζωή

Το σύνδρομο εντερικής ζύμωσης (auto-brewery syndrome, ABS) ή ενδογενής ζύμωση αιθανόλης είναι μία σπάνια ιατρική πάθηση κατά την οποία παράγονται ποσότητες αιθανόλης μέσω της ενδογενούς ζύμωσης υδατανθράκων στο πεπτικό σύστημα (Kaji et al., 1984). Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, γνωστός για τη χρήση του στην παραγωγή ψωμιού και αλκοολούχων ποτών, αλλά και ως προβιοτικό συμπλήρωμα, έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας αυτής της πάθησης. Ωστόσο, και άλλοι μικροοργανισμοί έχουν θεωρηθεί υπεύθυνοι, όπως η *Klebsiella pneumoniae*, η οποία μπορεί να ζυμώσει υδατάνθρακες σε αιθανόλη στο έντερο, γεγονός που μπορεί να επιταχύνει τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (Yuan et al., 2019). Το ABS έχει βρεθεί ότι εμφανίζεται σε ασθενείς με σύνδρομο βραχέος εντέρου μετά από χειρουργική εκτομή, στο πλαίσιο της νόσου του Crohn στους ενήλικες και της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε μικρά παιδιά. Η έλλειψη λειτουργικού λεπτού εντέρου μπορεί να προδιαθέσει τους ασθενείς σε ζύμωση δυσαπορροφούμενων υδατανθράκων και συμπτώματα όπως διάρροια, αφυδάτωση, υποσιτισμό, απώλεια βάρους φούσκωμα, καούρα, ναυτία, εμετό, κοιλιακή δυσφορία, κόπωση, δυσανεξία στη λακτόζη και κόπρανα με δυσάρεστη οσμή (Dinis-Oliveira, 2021).

Η πρώτη περίπτωση ενδογενούς παραγωγής αιθανόλης αναφέρθηκε το 1948 και αφορούσε ένα 5χρονο αγόρι από την Αφρική που πέθανε αφού ανέπτυξε διάτρηση στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα λόγω υπερβολικής διάτασης αερίου (Ladkin & Davies, 1948). Το ενδιαφέρον για το φαινόμενο της ενδογενούς αλκοολογένεσης συνεχίστηκε αμείωτο με τα χρόνια και πολλές εικασίες έχουν προκύψει σχετικά με το εάν ένα άτομο μπορεί να φτάσει σε μία τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα που μπορεί να επιφέρει ποινικές κυρώσεις ($> 0,50-0,80 \text{ g/L}$) χωρίς να έχει καταναλώσει πραγματικά αλκοολούχα ποτά (Logan & Jones, 2000). Ο Ιαπωνικός πληθυσμός είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε αυτό το σύνδρομο, καθώς πολλοί Ασιάτες κληρονομούν μία ανενεργή μορφή αλδεϋδικής αφυδρογονάσης (ALDH), η οποία μετατρέπει την ακεταλδεϋδη σε οξικό οξύ. Η ελαττωματική ALDH που σχετίζεται με υψηλότερες ηπατικές συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναγωγή

της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη μέσω μιας αναστρέψιμης αντίδρασης NAD^+/NADH που καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) (Dinis-Oliveira, 2016).

Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, σε κάθε μελέτη ενδογενούς παραγωγής αιθανόλης, θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν δύο ανεξάρτητες μέθοδοι ανάλυσης αιθανόλης ή να εξεταστεί η παρουσία αιθανόλης σε περισσότερα βιολογικά υλικά. Πρέπει, επίσης, να ληφθεί υπόψη ο κίνδυνος μόλυνσης των βιολογικών υγρών κατά τη διαδικασία δειγματοληψίας ή κατά την προετοιμασία για ανάλυση (Jones, 1994).

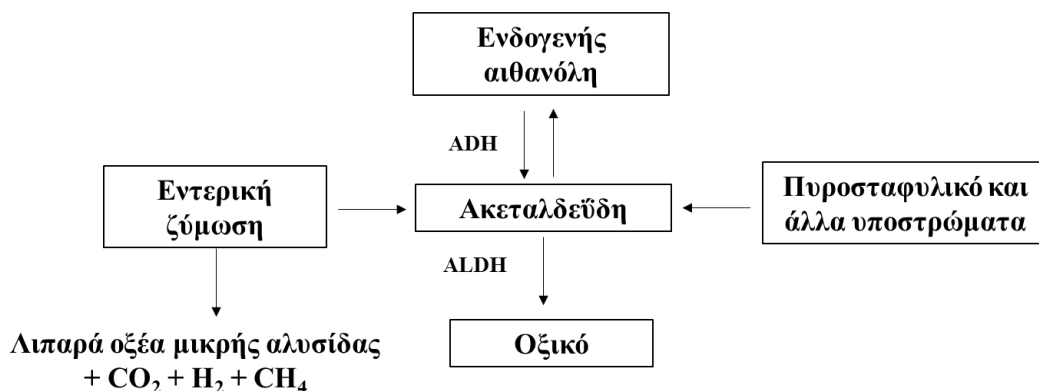
1.2.2.1 Αιτιολογία και παθοφυσιολογία του ABS

Παρόλο που το ABS μπορεί να εμφανιστεί σε υγιή άτομα και έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία, είναι πιο διαδεδομένο σε άτομα που πάσχουν από νοσήματα, όπως είναι ο διαβήτης, η ηπατική νόσος που σχετίζεται με την παχυσαρκία, η νόσος του Crohn, η μαζική διαστολή του λεπτού εντέρου, η λαπαροτομία, η γαστρεκτομή, η αντιβιοτική θεραπεία, η ανοσοκαταστολή, οι αυτοάνοσες καταστάσεις, τα περιοδοντικά βακτήρια και η διαίτα πλούσια σε υδατάνθρακες (Takahashi et al., 2021; Welch et al., 2016). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η χειρουργική επέμβαση γαστρικής παράκαμψης προκαλεί μία σαφή αλλαγή στη δομή και τη σύνθεση του μυκητιακού και βακτηριακού μικροβιόκοσμου του εντέρου σε παχύσαρκους ασθενείς (Steinert et al., 2020). Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι, επίσης, ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων και την εμφάνιση ABS και υψηλότερων συγκεντρώσεων αιθανόλης στο αίμα, όχι όμως τόσο υψηλών ώστε να επιφέρουν ποινικές διώξεις (Steinert et al., 2020).

Η μικροχλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου παρουσιάζει μια πυκνή και εξαιρετικά ποικιλόμορφη μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από βακτήρια, μύκητες, φάγους, ιούς, πρωτόζωα και αρχαία που κατοικούν στον γαστρεντερικό σωλήνα και εμπλέκονται στη φυσιολογία του ξενιστή. Η χρήση αντιβιοτικών, ειδικά αν είναι συχνή ή μακροχρόνια, μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου και να συμβάλει στην υπερανάπτυξη των ζυμομυκήτων (Clemente et al., 2012). Οι μύκητες αποτελούν λιγότερο από το 2% του συνόλου των μικροοργανισμών του εντέρου, με μόνο περίπου 60 γένη και 180 είδη. Μια βλάβη της μικροχλωρίδας του εντέρου, που χαρακτηρίζεται από αλλαγές στη σύνθεση και τη λειτουργία του, παρατηρείται συνήθως σε γαστρεντερικές και συστηματικές ασθένειες. Η *Candida albicans* και ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι οι κύριοι

μικροοργανισμοί που εμπλέκονται, καθώς μπορούν να μετατρέψουν αναερόβια τους υδατάνθρακες σε ενδογενή αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα κι έχουν ανιχνευτεί στις εντερικές εκκρίσεις και στα κόπρανα (Boumba et al., 2008; Mukherjee et al., 2015). Ωστόσο, και άλλοι μύκητες, όπως *Candida glabrata*, *Candida intermedia*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* και *Candida kefyr*, αλλά και βακτήρια, όπως *Enterococcus faecalis* και *Klebsiella pneumoniae*, έχουν ενοχοποιηθεί (Tameez Ud Din et al., 2020). Γενικά, οι *S. cerevisiae* και *C. albicans* είναι οξεόφιλα και, ως εκ τούτου, αναπτύσσονται καλύτερα υπό όξινες συνθήκες στο βέλτιστο εύρος pH, από 4 έως 6. Επομένως, η υποοξύτητα του στομάχου, η πέψη των υδατανθράκων και η αντίστροφη ροή του περιεχομένου του δωδεκαδάκτυλου στο στομάχι παρέχουν όλα ένα ευνοϊκό περιβάλλον (Narendranath & Power, 2005; Sherrington et al., 2017). Η *in vitro* παραγωγή αιθανόλης από την *C. albicans* στο αίμα αποδείχτηκε ότι εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τον χρόνο, την περιεκτικότητα σε γλυκόζη (ή υδατάνθρακες), το pH του μέσου και τις ενδογενείς αλλαγές στη σύνθεση του μέσου με την πάροδο του χρόνου. Επομένως, η παραγωγή μικροβιακής αιθανόλης, είτε *in vitro* μετά τη συλλογή δειγμάτων είτε *in situ* σε πτώματα πριν την αυτοψία, θα μπορούσε να περιπλέξει τα αποτελέσματα και να παραπλανήσει τις ερμηνείες (Velivasi et al., 2021b; Yajima et al., 2006; Ziavrou et al., 2005). Δεδομένου ότι η αιθανόλη απορροφάται κυρίως στο στομάχι και το λεπτό έντερο, ο αποικισμός αυτών των εντερικών τμημάτων φαίνεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις. Σε μία περίπτωση, το ABS περιγράφηκε για πρώτη φορά λόγω του αποικισμού της *C. albicans* στη στοματική κοιλότητα, αλλά κυρίως λόγω των βακτηρίων *Streptococcus* και *Klebsiella pneumoniae* από βλάβες της περιοδοντικής νόσου (Takahashi et al., 2021).

Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε αρουραίους απαλλαγμένους από μικρόβια και σε ζώα στα οποία χορηγούνταν μεγάλες δόσεις αντιβιοτικών για την εξάλειψη της εντερικής μικροχλωρίδας, οι χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης ήταν ακόμη μετρήσιμες στο αίμα, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα νεφρά (Jones et al., 1984). Αυτό δείχνει ότι υπάρχουν και μη μικροβιακά μονοπάτια για την παραγωγή ενδογενούς αιθανόλης, όπως τα τελικά στάδια του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Το πυροσταφυλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη, η οποία ανάγεται σε αιθανόλη από την αλκοολική αφυδρογονάση (**Σχήμα 4**) (Ostrovsky, 1986).



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης και της απέκκρισης της ενδογενούς αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης. ADH: αλκοολική αφυδρογονάση, ALDH: αλδεϋδική αφυδρογονάση

1.2.2.2 Ιατροδικαστική σημασία της ενδογενώς παραγόμενης αιθανόλης

Το ABS αφορά πιθανότατα μία υποδιαγνωσμένη κατάσταση. Υπό κανονικές συνθήκες, και με λίγες εξαιρέσεις, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στο περιφερικό φλεβικό αίμα είναι εξαιρετικά μικρές και επομένως, στερούνται κλινικής ή ιατροδικαστικής σημασίας. Μια μεγάλη μελέτη από τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα διαπίστωσε, χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας, ότι σε 1557 συμμετέχοντες διαφορετικών εθνικοτήτων, ηλικιών και φυλών, το διάμεσο επίπεδο ενδογενούς αιθανόλης (δηλαδή, φυσιολογική αιθανόλη στο αίμα) ήταν 0,00113 g/L. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα που αναφέρθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν 0,0352 g/L και 0,0320 g/L σε άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα (Al-Awadhi et al., 2004). Άλλες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η συγκέντρωση ενδογενούς αιθανόλης στο περιφερικό φλεβικό αίμα υγιών ατόμων, καθώς και εκείνων που πάσχουν από διάφορες μεταβολικές διαταραχές (π.χ. διαβήτη, ηπατίτιδα και κίρρωση) κυμαίνεται από 0 έως 0,0008 g/L (Logan & Jones, 2000). Μια μελέτη από τη Σαουδική Αραβία στην οποία συμμετείχαν 1400 άτομα που ανήκαν σε διαφορετικές εθνικότητες εντόπισε πολύ μικρά ενδογενώς παραγόμενα επίπεδα αιθανόλης χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (Ragab, 2015). Η μελέτη, η οποία διεξήχθη για τον καθορισμό των γαστρεντερικών επιπέδων αιθανόλης για την παροχή συμβουλών σχετικά με τα νόμιμα όρια, αποκάλυψε μία μέση ενδογενή συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 0,0014 g/L, με μέγιστο 0,0153 g/L και 0,0141 g/L σε άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα, μακριά από το κατώφλι των θετικών επιπέδων αιθανόλης που σχετίζονται με ιατροδικαστικά ζητήματα. Πράγματι, οποιαδήποτε ποσότητα

ενδογενούς αιθανόλης παραγόμενη από μικροβιακή δραστηριότητα στο έντερο απομακρύνεται αποτελεσματικά όταν το αίμα της πυλαίας φλέβας περάσει από το ήπαρ για πρώτη φορά. Αυτό οφείλεται στην αφθονία της ηπατικής ADH και στη λειτουργία του συντελεστή κινητικής Michaelis-Menten με τιμή k_m 0,05-0,10 g/L, η οποία είναι αποτελεσματική στον μεταβολισμό της αιθανόλης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Levitt & Levitt, 2000). Ωστόσο, αυτά τα συμπεράσματα πιθανότατα βασίζονται σε φυσιολογικές καταστάσεις, καθώς ενδέχεται να μην υπάρχουν περιπτώσεις ABS. Έχει αναφερθεί ρυθμός κάθαρσης 0,1 g αιθανόλης/kg σωματικού βάρους/ώρα, που σημαίνει ότι ένας ενήλικας με σωματικό βάρος 70 kg μπορεί να διαθέσει περίπου 7 g/ώρα είτε λόγω μεταβολισμού είτε λόγω αναπνοής και απέκκρισης στα ούρα κι έχει διαπιστωθεί ότι η «φυσιολογική» συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα των ανθρώπων κυμαίνεται έως και 0,0015 g/L (Jones, 2010; Logan & Jones, 2000). Οι αναφερόμενες τιμές αναφοράς είναι το αποτέλεσμα συνεχούς παραγωγής από ακεταλδεΐδη, η οποία είναι ένα μεταβολικό υποπροϊόν του πυροσταφυλικού, της θρεονίνης, της 5-φωσφορικής δεοξυριβόζης, της φωσφοαιθανολαμίνης, της ανιλίνης και πιθανώς άλλων υποστρωμάτων. Η διακύμανση των τιμών αναφοράς για την ενδογενή αιθανόλη είναι πιθανή συνέπεια των διακυμάνσεων στην πρόσληψη υδατανθράκων, της πείνας, της γήρανσης, του στρες, της επινεφριδεκτομής και παραγόντων που μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα αιθανόλης (Ostrovsky, 1986; Sarkola & Eriksson, 2001). Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικά ιατροδικαστικά ζητήματα κατά την εξέταση του ABS λόγω της πιθανότητας ακατάλληλης χρήσης σε στρατηγικές νομικής άμυνας. Αν και σπάνια, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα μπορεί να υπερβεί το νόμιμο όριο σε περιπτώσεις ABS και το άτομο να παρουσιάσει συμπτώματα μέθης (Hafez et al., 2017). Έχουν αναφερθεί επεισόδια ABS μετά την κατανάλωση φυσιολογικών ποσοτήτων αλκοόλ και σε τέτοιες περιπτώσεις είναι αδύνατο να προσδιοριστεί η συνεισφορά της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα από την κατανάλωση αλκοόλ έναντι της ενδογενούς παραγωγής αιθανόλης στο έντερο.

Σε άλλη περίπτωση, ο ασθενής κρατήθηκε υπό επίβλεψη για 24 ώρες χωρίς καμιά πιθανότητα κατανάλωσης αλκοόλ και λήφθηκε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα, παρέχοντας στοιχεία για την ιατροδικαστική και κλινική σημασία αυτής της κατάστασης (Akbaba, 2020). Επίσης, έχει αναφερθεί ο ρόλος του ABS στην παθογένεση του συνδρόμου αιφνίδιου βρεφικού θανάτου (SIDS), αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτό το επιχειρήμα (Geertinger et al., 1982).

1.2.3 Μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης

Η μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1936 και είναι δυνατόν να λαμβάνει χώρα τόσο σε πτώματα όσο και σε βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία (Wagner, 1936). Η παραγωγή αιθανόλης μετά τον θάνατο παρατηρήθηκε σε πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης. Τα πτώματα είτε προέρχονταν από περιστατικά που υποβάλλονταν σε αυτοψία ρουτίνας (Corry, 1978; Lima & Midio, 1999) είτε βρέθηκαν σε υπαίθριους χώρους μετά από θανατηφόρα αεροπορικά δυστυχήματα (Canfield et al., 1993; Kuhlman et al., 1991; Mayes et al., 1992) είτε ανασύρθηκαν από το νερό (Gilliland & Bost, 1993; Hadley & Smith, 2003; Fumio Moriya & Hashimoto, 2004).

Εκτεταμένη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης αναφέρθηκε σε περιπτώσεις αεροπορικών θανάτων, όπου τα πτώματα βρέθηκαν αρκετές ώρες έως αρκετές ημέρες μετά τον θάνατο. Σε αυτά τα περιστατικά, το 27% (Canfield et al., 1993), το 57% (Kuhlman et al., 1991) και το 100% (Mayes et al., 1992) των δειγμάτων αίματος θετικών για αιθανόλη, που ελήφθησαν από πτώματα σε διαφορετικά στάδια σήψης, αποδόθηκαν στον μεταθανάτιο σχηματισμό αιθανόλης.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης αποδόθηκε σε μεταθανάτια παραγωγή, οι προσδιοριζόμενες τιμές θεωρήθηκαν πολύ μικρές ως μέτριες ($< 0,70$ g/L), σε σύγκριση με τα νομικά όρια 0,50 ή 0,80 g/L (O'Neal & Poklis, 1996). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις μεταθανάτια παραγόμενης αιθανόλης (προσδιοριζόμενες με αέρια χρωματογραφία), που κυμαίνονταν από 1,20 έως 2,20 g/L. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν:

- α. πτώματα σε αποσύνθεση: ένα περιστατικό με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 2,20 g/L (Zumwalt et al., 1982), ένα περιστατικό με συγκέντρωση 1,20 g/L (Caplan & Levine, 1990) και ένα περιστατικό με συγκέντρωση αιθανόλης 1,60 g/L (Gilliland & Bost, 1993),
- β. πτώματα που προήλθαν από αεροπορικά δυστυχήματα: δύο περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 1,80 g/L (Canfield et al., 1993) και ένα με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 1,90 g/L (Mayes et al., 1992) και
- γ. ένα περιστατικό που προήλθε από πνιγμό με συγκέντρωση αιθανόλης στο μεσοθωράκιο υγρό 1,70 g/L (Nanikawa & Kotoku, 1974).

Τέλος, έχει καταγραφεί ένα περιστατικό με την εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα 3,0 g/L, που αποδόθηκε εξολοκλήρου σε μεταθανάτια παραγωγή (Canfield et al., 1993).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε βιολογικά υλικά που ελήφθησαν μεταθανάτια, έδειξαν ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων είναι δυνατόν να μεταβληθεί. Η μεταβολή αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε οξείδωση ή/και εξάτμιση της αιθανόλης είτε στη μικροβιακή δραστηριότητα (Chang & Kollman, 1989; Helander et al., 1995; Nanikawa et al., 1988; Sulkowski et al., 1995). Η σημαντικότερη μεταβολή στη συγκέντρωση της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά μετά τη δειγματοληψία μπορεί να προκληθεί από τη δράση του μικροβιακού φορτίου του δείγματος και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης μέχρι και 0,40 g/L (Corry, 1978). Η διατήρηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των δειγμάτων θεωρείται εξαιρετικής σπουδαιότητας αφού είναι δυνατόν να ζητηθεί επανεξέταση των δειγμάτων από την εντολοδότιδα αρχή μετά από εβδομάδες ή ακόμα και μήνες από τη δειγματοληψία (Skopp, 2004). Η αναγκαία διαδικασία που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η σταθερότητα των δειγμάτων που αναλύονται για την παρουσία αιθανόλης, κατά την αποθήκευσή τους, συνίσταται στη συλλογή των δειγμάτων όσο πιο γρήγορα γίνεται μετά τον θάνατο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών στο πτώμα και κατ' επέκταση στα δείγματα. Επίσης, στα σωληνάρια αιμοληψίας θα πρέπει να τοποθετείται τόσο δείγμα ώστε να μην αφήνεται διαθέσιμος χώρος για εξάτμιση, να πραγματοποιείται άμεση προσθήκη του κατάλληλου συντηρητικού στα δείγματα και άμεση αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία κοντά στους 0°C (Skopp, 2004; Sulkowski et al., 1995). Τα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για το σκοπό αυτό είναι τα άλατα του φθορίου, αν και κάτω από ειδικές συνθήκες αποδείχτηκαν μη επαρκή για τη συντήρηση (Chang & Kollman, 1989; Helander et al., 1995).

1.2.3.1 Διαδικασία σήψης

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ανθρώπινο σώμα αρχίζει να αποσυντίθεται αμέσως μετά το θάνατο. Η αποσύνθεση είναι μια περίπλοκη διαδικασία που μπορεί να διαφέρει από σώμα σε σώμα, από περιβάλλον σε περιβάλλον, ακόμα και από ένα μέρος του ίδιου

πτώματος σε άλλο. Περιλαμβάνει πολλές υποκατηγορίες, οι οποίες μπορεί να συγχωνεύονται μεταξύ τους ή να είναι ομοιόμορφες στο ίδιο πτώμα (Saukko & Knight, 2004).

Η σήψη χαρακτηρίζεται από την προοδευτική διάσπαση των μαλακών ιστών και την αλλοίωση των πρωτεϊνών τους, των υδατανθράκων και των λιπαρών συστατικών: ουσιαστικά οφείλεται στις δράσεις πολλών ενζύμων, μερικά από τα οποία υπάρχουν ήδη σε ενεργό ή λανθάνουσα μορφή στους ιστούς, ενώ άλλα προέρχονται από βακτήρια και μύκητες από το έντερο και το εξωτερικό περιβάλλον και μερικές φορές από έντομα που μπορεί να ωριμάσουν ή βρίσκονται σε στάδιο προνύμφης (Saukko & Knight, 2004).

1.2.3.1.1 Μεταθανάτια αποσύνθεση από ενδογενή ένζυμα

Αμέσως μετά τον θάνατο, η καρδιακή δραστηριότητα σταματά και η έλλειψη οξυγόνου οδηγεί σε σημαντικές φυσιολογικές αλλαγές. Το γλυκογόνο αποδομείται σε γαλακτικό οξύ στους σκελετικούς μύες και αυτή η διαδικασία μειώνει το pH κατά τις πρώτες ώρες μετά τον θάνατο. Στην περίπτωση υψηλής μυϊκής δραστηριότητας πριν τον θάνατο, η παραπάνω διαδικασία μπορεί να συμβεί ακόμη και λίγα λεπτά μετά τον θάνατο, επειδή ο μυς έχει ήδη έλλειψη οξυγόνου. Άλλη μία συνέπεια είναι η διακοπή της μεταφοράς πυροσταφυλικού διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η οξείδωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA σταματά και το ακετυλο-CoA δεν μπορεί να εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού. Η αναπνευστική αλυσίδα απαιτεί τη χαμηλή ηλεκτραρνητικότητα του οξυγόνου, επειδή δημιουργεί τη βαθμίδα ηλεκτρονίων που είναι απαραίτητη για την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Καθώς το ATP είναι μια καθολική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, ο τερματισμός του αναβολισμού του οδηγεί στη διακοπή του τακτικού μεταβολισμού. Μία από τις συνέπειες των χαμηλών επιπέδων ATP είναι η δέσμευση του συμπλέγματος μυοσίνης-ακτίνης στους μύες, με αποτέλεσμα την ακαμψία του θανάτου. Άλλο ένα αποτέλεσμα είναι η αδυναμία των κυττάρων να επισκευάσουν τις δικές τους μεμβράνες και κατά συνέπεια, τα λυσοσωμικά υδρολυτικά ένζυμα απελευθερώνονται με ανεξέλεγκτο τρόπο στα κύτταρα (Paczkowski & Schütz, 2011). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα που απελευθερώνονται περιλαμβάνουν λυσοσωμικές καθεψίνες και ενδοπεπτιδάσες που εξαρτώνται από ασβεστό στα μυϊκά κύτταρα. Οι ενδοπεπτιδάσες αποτελούνται κυρίως από καλπαΐνη I για χαμηλά επίπεδα ασβεστίου λίγο μετά τον θάνατο

και καλπαΐνη Π για υψηλά επίπεδα ασβεστίου. Τα υψηλά επίπεδα ασβεστίου προκύπτουν από την αυξανόμενη εισροή λόγω της έναρξης της αποσύνθεσης των διαμηκών σωληναρίων στα μυϊκά κύτταρα. Αυτά τα πρωτεολυτικά ένζυμα κατακερματίζουν τα μυοϊνίδια των μυϊκών κυττάρων κατά μήκος του δίσκου z και αντιδρούν με τροπονίνες T και I, τροπομυοσίνη, C-πρωτεΐνη, φιλαμίνη, βινκουλίνη, δεσμίνη, τιτίνη και νεβουλίνη (Goll et al., 1983; Koochmaraie, 1992). Επιπλέον, η λιποπρωτεϊνική λιπάση υπάρχει στους σκελετικούς μύες των αρουραίων και υδρολύει δι- και τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας σε βέλτιστη τιμή pH από 8 έως 9 (Miller et al., 1987). Η λιπάση λυσοσωμικού οξέος βρέθηκε στο ανθρώπινο ήπαρ, τον πλακούντα, την αορτή και τα λευκοκύτταρα και υδρολύει λιπίδια σε βέλτιστη τιμή pH από 4 έως 5 (Negre et al., 1985). Αυτό υποδηλώνει ότι η δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης σταματά λίγο μετά τον θάνατο λόγω συσσώρευσης γαλακτικού οξέος. Το χαμηλό pH καταστέλλει τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και υποστηρίζει τη δραστηριότητα της λιπάσης του λυσοσωμικού οξέος. Επιπλέον, τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών αποδομούνται από τις φωσφολιπάσες. Σε αναερόβιο περιβάλλον, τα λιπαρά οξέα μπορεί να παραμείνουν με τη μορφή σαπωνοποίησης (Yan et al., 2001).

Γενικά, τα λυσοσωμικά υδρολυτικά ένζυμα είναι ενεργά σε μία βέλτιστη θερμοκρασία 37°C. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα είναι, επίσης, ενεργά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, αλλά έχουν χαμηλότερη δραστηριότητα. Για παράδειγμα, ορισμένες καθεψίνες είναι ενεργές στους 25°C, ενώ η εξαρτώμενη από το Ca²⁺ πρωτεϊνάση (CAF) στους 0-4°C. Η θερμοκρασία και η ενζυμική δραστηριότητα σχετίζονται με μη γραμμικό τρόπο (Goll et al., 1983).

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) σχηματίζονται ενζυμικά, χημικά και φωτοχημικά και αντιδρούν με λιπίδια, αμινοξέα και σάκχαρα. Τα οξειδωμένα λιπίδια απελευθερώνουν πτητικές αλδεϋδες, αλκοόλες ή αλκένια. Η οξειδωμένη μεθειονίνη σχηματίζει H₂S, ενώ τα οξειδωμένα σάκχαρα σχηματίζουν κετόνες. Οι ζωντανοί οργανισμοί αντισταθμίζουν τις αντιδράσεις διάσπασης των ROS με διεργασίες επιδιόρθωσης ή καταστέλλουν αυτά τα μόρια με αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς (Cadenas, 1989). Μετά τον θάνατο, αυτοί οι μηχανισμοί επισκευής σταματούν και οι εκπομπές αέριων προϊόντων ROS αυξάνονται. Κατά τα πρώιμα και προχωρημένα στάδια της αποσύνθεσης, αυτές οι εκπομπές διαδραματίζουν μικρό ρόλο σε σύγκριση με τα πτητικά προϊόντα που παράγονται από τη μικροβιακή δραστηριότητα.

1.2.3.1.2 Μεταθανάτια αποσύνθεση από μικροοργανισμούς

Η μικροβιακή αποσύνθεση ενός πτώματος είναι μία δυναμική διαδικασία που εξαρτάται από μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη συσσώρευση μικροβιακών ειδών, τις αλληλεπιδράσεις τους και τις κλιματικές συνθήκες του οικοσυστήματος (Corry, 1978). Η θερμοκρασία έχει ισχυρή επίδραση στη σύσταση των μικροβιακών ειδών. Για παράδειγμα, τα ψυχότροπα ή μεσόφιλα βακτήρια παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε διαφορετικές θερμοκρασίες κι επίσης, απελευθερώνουν διάφορα πτητικά (Ercolini et al., 2009). Επιπλέον, τη σύνθεση των μικροβιακών ειδών επηρεάζουν η ταφή, ο πνιγμός ή η έκθεση ενός πτώματος σε εξωτερικό χώρο (Dent et al., 2004; Statheropoulos et al., 2005). Γενικά, η αποσύνθεση ενός πτώματος είναι μια διαδικασία που συμβαίνει σε διαφορετικά στάδια και μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αποσύνθεση ή διατήρηση, όπως η μουμιοποίηση. Η ταχύτητα αποσύνθεσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου που μεσολάβησε μετά τον θάνατο, των εσωτερικών ή εξωτερικών συνθηκών, της εισβολής από έντομα, της θερμοκρασίας και της υγρασίας του αέρα του περιβάλλοντος, της κυκλοφορίας του αέρα, της βύθισης στο νερό και της έκτασης του τραύματος και της ζημιάς στο πτώμα. Η ολίσθηση του δέρματος, το φούσκωμα, ο αποχρωματισμός του δέρματος, η παρουσία σκουληκιών και η άσχημη οσμή είναι ισχυρές ενδείξεις σήψης (Kugelberg & Jones, 2007).

Ο αριθμός των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο έντερο εκτιμήθηκε ότι υπερβαίνει τα 10¹¹ κύτταρα/g εντερικού περιεχομένου (Moore & Holdeman, 1974). Πολλά δυνητικά ή υποχρεωτικά αναερόβια είδη, όπως η *Escherichia coli* και το *Clostridium perfringens* βρίσκονται στο υγιές έντερο όπου μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά που εισέρχονται από το στομάχι (Corry, 1978). Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσαρμόσουν τον μεταβολισμό τους στη διατροφή των ζωντανών οργανισμών. Οι σχετικές ποσότητες αμμωνίας στα ούρα που εκπέμπονται, οι πτητικές ενώσεις θείου, η φαινόλη και η 4-μεθυλοφαινόλη στα ανθρώπινα κόπρανα εξαρτώνται από τη σχετική αναλογία κρέατος στη διατροφή των οργανισμών (Geypens et al., 1997). Οι εντερικοί μικροοργανισμοί προτιμούν διαφορετικά υποστρώματα, όπως υδατάνθρακες ή αμινοξέα ως πηγή διατροφής τους ή εξαρτώνται από τα μεταβολικά προϊόντα άλλων μικροβίων. Διάφορα μικρόβια υπάρχουν, επίσης, στους βλεννογόνους, τα γεννητικά όργανα και το δέρμα. Επιπλέον, ζυμομύκητες και βακτήρια μπορεί να υπάρχουν στο λεμφικό και αγγειακό σύστημα πριν τον θάνατο ως αποτέλεσμα μόλυνσης ή πρόσληψης κατά τη διατροφή (Paczkowski & Schütz, 2011).

Λίγο μετά το θάνατο, οι μικροοργανισμοί από τα έντερα μεταναστεύουν στους τοπικούς ιστούς και αποκτούν πρόσβαση στα λεμφικά και τριχοειδή αγγεία και τις φλέβες και στη συνέχεια μέσω του αίματος και της λέμφου στους ιστούς του σώματος. Σε πολλές περιπτώσεις, μια παρόμοια βακτηριακή εισβολή ξεκινά από το αναπνευστικό σύστημα. Αυτή η εισβολή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η θέση του σώματος και αν ο θάνατος προκλήθηκε από βακτηριακή μόλυνση. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί εξαντλούν τους ιστούς από οξυγόνο και παρόλο που ο πληθυσμός τους μειώνεται, καθώς μειώνεται το διαθέσιμο οξυγόνο, δημιουργούν ευνοϊκές χημικές συνθήκες για τους πιο καταστροφικούς αναερόβιους μικροοργανισμούς που προέρχονται κυρίως από τον εντερικό σωλήνα. Σε μεταγενέστερα στάδια αποσύνθεσης μερικά αναερόβια είδη μπορεί να προέρχονται από το έδαφος ή τον αέρα. Έτσι, η βακτηριακή χλωρίδα μεταβάλλεται από τα αερόβια είδη, κυρίως κολοβακτηριδίων, σταφυλόκοκκου, πρωτέα, σε αναερόβιους πληθυσμούς στους οποίους κυριαρχούν τα κλωστηρίδια (Kugelberg & Jones, 2007; Saukko & Knight, 2004).

Υπάρχει αξιοσημείωτη μείωση του pH του αίματος αμέσως μετά τον θάνατο (Skopp, 2004). Καθώς το αίμα σταματά να κυκλοφορεί, προκαλείται ανεπάρκεια οξυγόνου σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε η οξειδωτική αναπνοή παύει και οι συνθήκες γίνονται αναερόβιες. Τα μικροβιακά ένζυμα υδρολύουν τις πολυμερείς ενώσεις (λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες) και τις μετατρέπουν σε μονομερή (λιπαρά οξέα, γλυκερίνη, μονοσακχαρίτες και αμινοξέα). Ως αποτέλεσμα το pH του αίματος αυξάνεται σταθερά και δύσσομες ενώσεις και αέρια (π.χ. αλκυλοσουλφίδια και μεθάνιο) παράγονται μαζί με την αιθανόλη και πολλές άλλες πτητικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (Jones et al., 1991; Lewis et al., 2004; O'Neal & Poklis, 1996; Skopp, 2004; Sulkowski et al., 1995). Γενικά, το pH και το δυναμικό οξειδοαναγωγής των ιστών μετά θάνατον επηρεάζουν, επίσης, τον τύπο των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν, καθώς και το ρυθμό ανάπτυξής τους (Corry, 1978).

Πολλά είδη βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μυκήτων έχουν αποδειχτεί ικανά να παράγουν αιθανόλη μετά θάνατον (Corry, 1978; O'Neal & Poklis, 1996). Τα ακόλουθα είδη βακτηρίων έχουν αναφερθεί ως οι κύριοι αποικιστές σε πτώματα και παράλληλα, οι κύριοι παραγωγοί αιθανόλης: το *Clostridium perfringens* και άλλα είδη κλωστηριδίων, εντεροβακτήρια (ιδιαίτερα τα είδη *Escherichia coli*, *Klebsiella* και *Proteus*), μικρόκοκκοι (κυρίως *Staphylococcus aureus*), στρεπτόκοκκοι (κυρίως *Streptococcus faecalis* και μη αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι) και είδη βάκιλλων (κυρίως *Bacillus subtilis*). Ζυμομύκητες

ικανοί να παράγουν αιθανόλη μπορούν, επίσης, να βρεθούν σε αποσυντεθειμένα πτώματα, αλλά σε μικρότερο βαθμό (*Candida albicans* και άλλα είδη *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae* και άλλα είδη σακχαρομυκήτων κ.λπ.). Οι μεγαλύτερες αυξήσεις στα επίπεδα αιθανόλης έχουν συνήθως αποδοθεί σε εντερόκοκκους ή εντερικούς βάκιλλους (Corry, 1978).

1.2.3.2 Δείκτες μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης

Με τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης έχει συνδεθεί η ταυτόχρονη ανίχνευση και ο προσδιορισμός και άλλων πτητικών ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους στα βιολογικά δείγματα, η παρουσία των οποίων περιλαμβάνεται στα κριτήρια που προσδιορίζουν την προέλευση της προσδιοριζόμενης αιθανόλης μετά το θάνατο. Οι πτητικές αυτές ουσίες θεωρούνται ότι παράγονται μεταθανάτια, κυρίως λόγω μικροβιακής δραστηριότητας και η ταυτότητα και η ποσότητά τους εξαρτώνται από το είδος και τον αριθμό των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα πτώματα στα διαφορετικά στάδια της σήψης (Boumba, 2022; Corry, 1978; Ziavrou et al., 2005). Επίσης, η παρουσία διάφορων πτητικών ουσιών έχει αναφερθεί σε μεταθανάτια δείγματα που αφορούσαν χρόνιους αλκοολικούς και διαβητικούς, των οποίων ο θάνατος αποδόθηκε σε αλκοολική κετοξέωση (Pounder et al., 1998; Smialek & Levine, 1998). Επιπλέον, διάφορες πτητικές ενώσεις, ποικίλων συγκεντρώσεων, έχουν προσδιοριστεί στο αίμα ζωντανών ατόμων, είτε μετά την κατανάλωση αλκοολούχων ποτών από αλκοολικούς και από μη αλκοολικούς είτε ως προϊόντα μεταβολικών διεργασιών (Haffner et al., 1997a,b; Kalapos, 2003).

Μεταξύ των πτητικών ενώσεων που συχνά ανιχνεύονται σε μεταθανάτια δείγματα περιλαμβάνονται οι λεγόμενες ανώτερες αλκοόλες. Ο όρος «ανώτερες αλκοόλες» χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για να ορίσει κυρίως την 1-προπανόλη, την ισοβουτανόλη (2-μεθυλο-προπανόλη), τη 2-μεθυλο-1-βουτανόλη (αμυλική αλκοόλη), την 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη) και την 1-βουτανόλη. Επίσης, περιλαμβάνονται μεταξύ των «συγγενών αλκοολών» που προσδιορίζονται κατά την ανάλυση αλκοολούχων ποτών ή αίματος (Rodda et al., 2013; Ziavrou et al., 2005). Επιπλέον, ο όρος «αλκοόλες διακλαδισμένης αλυσίδας» χρησιμοποιείται για τον ορισμό της ισοβουτανόλης, της ισοαμυλικής και της αμυλικής αλκοόλης, καθώς προέρχεται από τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, αντίστοιχα.

Στις περισσότερες σχετικές μελέτες, η παρουσία ανώτερων αλκοολών (κυρίως 1-προπανόλης) έχει θεωρηθεί ως ποιοτικός δείκτης μεταθανάτιας μικροβιακής δραστηριότητας (Bonte & Hey, 1983; Flanagan & Connally, 2005; Gubala, 1990; Kugelberg & Jones, 2007; Paczkowski & Schütz, 2011; Skopp, 2010; Statheropoulos et al., 2005; Ziavrou et al., 2005) ή ημιποσοτικός (Boumba et al., 2019; Moriya & Hashimoto, 2004; Nanikawa et al., 1988; Nanikawa et al., 1982). Η ταυτόχρονη παρουσία δύο ή περισσότερων ανώτερων αλκοολών σε μεταθανάτιο δείγμα αίματος αποτελεί ένδειξη ότι η προέλευση της αιθανόλης στο συγκεκριμένο δείγμα πρέπει να ερευνηθεί (Kugelberg & Jones, 2007; Lewis et al., 2004). Συγκεκριμένα, η παρουσία της 1-βουτανόλης, είτε μόνης είτε μαζί με την 1-προπανόλη, έχει υποδηλώσει μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης σε περιστατικά πνιγμού (Bonte, 1987; Bonte & Hey, 1983; Gubala, 1990).

1.2.3.2.1 Ανώτερες αλκοόλες σε περιστατικά νεκροτομών

Οι αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στο αίμα από περιστατικά νεκροτομών, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους (κατανάλωση αλκοόλ ή μικροβιακή παραγωγή) είναι σπάνιες και αφορούν κυρίως τις συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης (Bonte, 1987; Boumba et al., 2012a; Jungmann et al., 2011; Z. Lin et al., 2020; Velivasi et al., 2021b; Wang et al., 2020). Σημαντικές συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών έχουν αναφερθεί σε ένα σύνολο 93 μεταθανάτιων δειγμάτων αίματος από αντίστοιχα περιστατικά νεκροτομών, με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μεγαλύτερη από 0,10 g/L (Velivasi et al., 2021b). Εκτός από ένα περιστατικό, η 1-προπανόλη ανιχνεύτηκε ταυτόχρονα με την αιθανόλη, ενώ οι μεθυλοβουτανόλες (το άθροισμα της αμυλικής και της ισοαμυλικής αλκοόλης) ανιχνεύτηκαν σε λιγότερα δείγματα.

Σε μία άλλη περίπτωση, που αφορούσε ένα θύμα αυτοκτονίας, το μηριαίο και το καρδιακό αίμα αναλύθηκε για αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες (Jungmann et al., 2011). Το ιστορικό του θανάτου ανέφερε την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ πριν από τον θάνατο, ο θάνατός του αποδόθηκε στην τοξικότητα της αιθανόλης και δεν αναφέρθηκαν σημεία σήψης κατά τη νεκροψία. Σε αυτό το περιστατικό, η πιο πιθανή πηγή προέλευσης των προσδιοριζόμενων ανώτερων αλκοολών θα πρέπει να είναι η κατανάλωση αλκοόλ πριν τον θάνατο, αν και η μικροβιακή παραγωγή δεν μπορούσε να αποκλειστεί ούτε να υποστηριχτεί με βεβαιότητα.

Σε δύο ακόμη μελέτες αναφέρθηκαν συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης στο αίμα από μεταθανάτια περιστατικά (Boumba et al., 2012a; Wang et al., 2020). Η πρώτη μελέτη ανέφερε τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και 1-προπανόλης στο αίμα (μεταξύ άλλων πτητικών) που προσδιορίστηκαν σε περιπτώσεις αυτοψίας από φυσικές, βίαιες και απροσδιόριστες αιτίες θανάτου (Boumba et al., 2012a). Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στο αίμα ήταν υψηλότερες σε περιπτώσεις θανάτου απροσδιόριστης αιτίας από ότι σε περιπτώσεις βίαιων και φυσικών αιτιών θανάτου και συγκεκριμένα σε περιστατικά με παρουσία σημείων σήψης (Boumba et al., 2012a). Η δεύτερη μελέτη ανέφερε συγκεντρώσεις αιθανόλης και 1-προπανόλης στο αίμα σε 42 μεταθανάτια περιστατικά. 18 από αυτά τα περιστατικά ήταν αρνητικά για 1-προπανόλη (Wang et al., 2020). Και οι δύο προαναφερθείσες μελέτες (Boumba et al., 2012a; Wang et al., 2020) ανέφεραν ότι η αιθανόλη ή η 1-προπανόλη δεν ανιχνεύτηκαν σε όλα τα μεταθανάτια δείγματα, ούτε σε όλα τα περιστατικά με παρουσία σήψης (Boumba, 2020). Τέλος, σε μία μελέτη αναφέρθηκε συγκέντρωση 1-βουτανόλης στο αίμα υψηλότερη από 0,03 mg/dL και προτάθηκε ότι αποτελεί βιοδείκτη σήψης, λόγω μικροβιακής δράσης (Bonte, 1987).

1.2.3.2 Παραγωγή ανώτερων αλκοολών μετά τη δειγματοληψία

Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί η μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης μετά τη δειγματοληψία σε μεταθανάτια δείγματα (Kugelberg & Jones, 2007; Lin et al., 2020; Zianrou et al., 2005). Αντιθέτως, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών μετά τη δειγματοληψία σε μεταθανάτιο αίμα έχει αναφερθεί μόνο για την 1-προπανόλη σε μία μόνο μελέτη, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης που προσδιορίστηκαν (έως 3,0 mg/dL) θεωρήθηκαν αμελητέες (Yajima et al., 2006). Ωστόσο, σύμφωνα με διάφορες μελέτες και ανασκοπήσεις, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης που έχουν προσδιοριστεί είναι ενδεικτικές της μικροβιακής παραγωγής (Boumba, 2022; Boumba et al., 2013; Boumba et al., 2012a,b; Velivasi et al., 2021a,b; Wang et al., 2020; Yajima et al., 2006). Θεωρητικά, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών μετά τη δειγματοληψία είναι εξίσου δυνατή, υπό ορισμένες συνθήκες, δεδομένου ότι υπάρχει μικροβιακή προέλευση.

Η αυξημένη θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της αιθανόλης μετά τη δειγματοληψία (Jones et al., 1999), εκτός από το μικροβιακό φορτίο που υπάρχει

στο δείγμα (Ahmad et al., 2021; Dinis-Oliveira, Vieira, & Magalhães, 2016). Επιπλέον, η παρουσία ή όχι γλυκόζης στο δείγμα μπορεί να καθορίσει την παραγωγή αιθανόλης μετά τη δειγματοληψία (Petković et al., 2008). Γενικά, για τη μείωση ή την εξάλειψη της μικροβιακής δραστηριότητας μετά τη δειγματοληψία, θα πρέπει τα δείγματα να τοποθετούνται σε σωληνάρια με συντηρητικά και να αποθηκεύονται σε κατάλληλες συνθήκες στους 4°C (Dinis-Oliveira, Vieira, & Magalhães, 2016; Jones et al., 1999).

1.2.3.2.3 Ανώτερες αλκοόλες στο αίμα ζωντανών ατόμων

Από τις ανώτερες αλκοόλες, η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη έχουν θεωρηθεί οι πιο σημαντικοί βιοδείκτες της κατανάλωσης αλκοόλ (Rodda et al., 2013), ενώ οι μεθυλοβουτανόλες θεωρήθηκαν δευτερευούσης σημασίας λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων στο αίμα μετά την κατανάλωση αλκοόλ (Rodda et al., 2013; Wunder et al., 2017).

Σε μία μελέτη, η κατανάλωση αλκοολούχου ποτού που δεν περιείχε 1-προπανόλη, είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση αμελητέας συγκέντρωσης 1-προπανόλης, που αποδόθηκε σε ενδογενή παραγωγή (Wunder et al., 2021). Ωστόσο, από τη βιβλιογραφία δεν υποστηρίζεται η μικροβιακή παραγωγή 1-προπανόλης παρουσία αιθανόλης, και καθώς δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ανίχνευση των υπόλοιπων ανώτερων αλκοολών, η πιθανότητα ενδογενούς παραγωγής θα πρέπει να αμφισβητηθεί και να διερευνηθεί περαιτέρω. Τέλος, η ανίχνευση 1-βουτανόλης δεν αναφέρθηκε σε δείγματα από ζωντανά άτομα.

Τα αναφερόμενα επίπεδα ανώτερων αλκοολών σε μεταθανάτιες περιπτώσεις είναι σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα μετά από κατανάλωση αλκοόλ σε προθανάτια δείγματα. Γενικά, η μικροβιακή δραστηριότητα σε ένα ανθρώπινο πτώμα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ποικίλων συγκεντρώσεων αιθανόλης και ανώτερων αλκοολών. Σε μεταθανάτια περιστατικά με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα είναι πιθανό μέρος ή όλη η ποσότητα της προσδιορισθείσας αιθανόλης να οφείλεται σε προθανάτια κατανάλωση αλκοόλ· το ίδιο θα μπορούσε να ισχύει και για τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών (Boumba, 2022).

1.2.3.2.4 Ο ρόλος της 1-προπανόλης

Η ανώτερη αλκοόλη που σχετίζεται κυρίως με τη σήψη και την παραγωγή μικροβιακής αιθανόλης είναι η 1-προπανόλη (Lewis et al., 2004; Moriya & Hashimoto, 2004; Nanikawa et al., 1988; Nanikawa et al., 1982). Σε μία μελέτη προτάθηκε η ημιποσοτική προσέγγιση του προσδιορισμού του λόγου των συγκεντρώσεων αιθανόλης και 1-προπανόλης για τη διάκριση της πηγής προέλευσης της αιθανόλης. Ο λόγος της αιθανόλης προς την 1-προπανόλη που προτάθηκε ήταν μικρότερος από 20:1 σε μεταθανάτιο αίμα από πτώματα αρουραίων, υποδηλώνοντας μεταθανάτια παραγωγή (Nanikawa et al., 1982). Μία άλλη μελέτη ανέφερε ότι όταν η συγκέντρωση αιθανόλης στον εγκέφαλο ήταν $\geq 0,50$ mg/g με τον λόγο εγκεφαλικής αιθανόλης προς 1-προπανόλη ≥ 40 και όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν 0,10 έως 0,49 mg/g με τον λόγο αιθανόλης προς 1-προπανόλη ≥ 60 , θα πρέπει να υπάρχει υποψία για κατανάλωση αλκοόλ (Moriya & Hashimoto, 2004). Ωστόσο, άλλες μελέτες αμφισβήτησαν ή διέψευσαν την αξιοπιστία του λόγου της συγκέντρωσης αιθανόλης προς 1-προπανόλη, κυρίως επειδή η 1-προπανόλη δεν ανιχνεύτηκε σε όλες τις μεταθανάτιες περιπτώσεις όπου υπήρχε υποψία παραγωγής αιθανόλης (Boumba, 2020; Liang et al., 2016). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι διαφορετικά βακτήρια μπορούν να παράγουν 1-προπανόλη και άλλες αλκοόλες σε μεταβλητές συγκεντρώσεις ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (Boumba et al., 2013; Boumba et al., 2012a; Velivasi et al., 2021a,b).

Σε μία άλλη πρόσφατη ημιποσοτική προσέγγιση, η συγκέντρωση 0,104 mg/dL της 1-προπανόλης (το «κριτήριο της 1-προπανόλης») προτάθηκε ως κατώφλι για τη «σήμανση» ενός μεταθανάτιου δείγματος αίματος ως θετικό ή αρνητικό για μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης (Boumba et al., 2019). Προτάθηκε ως μετρήσιμος εργαστηριακός δείκτης παραγωγής μικροβιακής αιθανόλης σε δείγματα όπου ανιχνεύτηκαν 1-προπανόλη και αιθανόλη, ο οποίος θα μπορούσε να διακρίνει τα «θετικά» δείγματα για μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης από τα «αρνητικά», ακόμη και σε περιπτώσεις χωρίς εμφανή σημεία σήψης, όπως πτώματα με εξωτερικές ή εσωτερικές τραυματικές αλλοιώσεις (Boumba et al., 2019).

1.3 Μηχανισμός μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης-Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής μεταθανάτιων πτητικών ενώσεων

Η ποσότητα αιθανόλης που σχηματίζεται μεταθανάτια θεωρείται ότι εξαρτάται από το είδος των μικροοργανισμών που υπάρχουν, τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων, τις συνθήκες πριν τον θάνατο και την κατάσταση αποθήκευσης του πτώματος πριν από τη συλλογή των δειγμάτων για τοξικολογική ανάλυση (O'Neal & Poklis, 1996).

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων υποστρωμάτων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τον σχηματισμό μικροβιακής αιθανόλης, όπως υδατάνθρακες (κυρίως γλυκόζη), αμινοξέα, γλυκερόλη και λιπίδια (Corry, 1978).

Οι παράγραφοι 1.3.1 έως 1.3.6, που ακολουθούν, αποτελούν μετάφραση της δημοσιευμένης εργασίας «Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses» της συγγραφέως και επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας, Μπούμπα Βασιλικής, στο επιστημονικό περιοδικό *Forensic Science International*, έτος 2008, τόμος 174, σελίδες 133-151 (Boumba et al., 2008) και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή κατόπιν άδειάς της.

1.3.1 Μεταβολισμός των μικροβίων υπό αναερόβιες συνθήκες

Τα περισσότερα μικρόβια είναι ετερότροφα, ικανά να επιβιώσουν με μια ποικιλία ανθρακικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, λιπιδίων, γλυκολιπιδίων, δικαρβοξυλικών και αμινοξέων. Ο μεταβολισμός του άνθρακα παρέχει στο βακτηριακό κύτταρο ενέργεια με τη μορφή των αναγωγικών ισοδύναμων και της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), καθώς και βασικές βιοσυνθετικές πρόδρομες ουσίες (Gottschalk, 1986).

Στο φυσικό τους περιβάλλον, οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με καταστάσεις ώστε μεταβάλλονται συχνά και γρήγορα σε σχέση με τη θερμοκρασία, το pH, τη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Σε περιπτώσεις όπου είναι διαθέσιμα μίγματα διαφορετικών υποστρωμάτων και πηγών ενέργειας, πολλοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ένα υπόστρωμα κατά προτίμηση και καταναλώνουν τα υπόλοιπα υποστρώματα μόνο όταν το προτιμώμενο έχει εξαντληθεί. Μια ποικιλία συντονισμένων και

προσαρμοσμένων μηχανισμών και ρυθμιστικών κυκλωμάτων έχουν εξελιχθεί από τα μικρόβια προκειμένου να προσαρμόσουν τη φυσιολογία τους, ώστε να τους επιτρέψει βέλτιστη ανάπτυξη. Αυτή η προσαρμογή συχνά μεσολαβείται από ειδική επαγωγή ή καταστολή καταβολικών γονιδίων (Allison & Macfarlane, 1998; Bruckner & Titgemeyer, 2002; Gibson et al., 1993; Saier, 1998; Ueno et al., 2001).

Από μικροβιολογικής άποψης η χημική σύνθεση, η φυσική μορφή και η ποσότητα των διαθέσιμων υποστρωμάτων επηρεάζει το βακτηριακό μεταβολισμό, ο οποίος, επίσης, εξαρτάται από τον τύπο και τον αριθμό των διαφορετικών βακτηριακών πληθυσμών, τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των καταβολικών (Bruckner & Titgemeyer, 2002), τη διαθεσιμότητα ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων, όπως τα νιτρικά (Allison & Macfarlane, 1998) και τα θειικά (Gibson et al., 1993), καθώς και ανταγωνιστικές και συναγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών στη μικροχλωρίδα (Ueno et al., 2001).

Υπό αναερόβιες συνθήκες, τα μικρόβια διεξάγουν έναν συγκεκριμένο τύπο ετερότροφου μεταβολισμού που ονομάζεται ζύμωση (Gottschalk, 1986). Η ζύμωση χρησιμοποιεί οργανικό άνθρακα ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων αντί οξυγόνου ή ανόργανων ανιόντων που χρησιμοποιούνται κατά τον αναπνευστικό μεταβολισμό. Αυτό σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δεν χρησιμοποιείται μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για την οξείδωση του NADH (ανηγμένο νικοτινάμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο) σε NAD⁺ (οξειδωμένο νικοτινάμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο). Ως εκ τούτου, θα πρέπει να υπάρχει εναλλακτικός τρόπος εξισορρόπησης αυτής της αναγωγικής ισχύος (NADH) και διατήρησης της παροχής NAD⁺ που απαιτείται για άλλες μεταβολικές διεργασίες (π.χ. γλυκόλυση) (Boumba et al., 2008).

Οι ζυμωτικοί οργανισμοί συνήθως δε λειτουργούν έναν πλήρη κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος για την αποφυγή υπερπαραγωγής NADH (Saier, 1998). Στις ζυμωτικές διεργασίες εμπλέκεται μία ποικιλία αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που συνήθως συνδέονται με το υπόστρωμα σε επίπεδο φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Σε αντιδράσεις φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος μια οργανική ένωση που προέρχεται από το αρχικό υπόστρωμα ζύμωσης φωσφορυλιώνεται για την παραγωγή μιας οργανικής ένωσης υψηλής ενέργειας (γενικά στη μορφή ενός CoA-εστέρα). Η φωσφορική ομάδα από την υψηλής ενέργεια ένωση που περιέχει φωσφορικά μεταφέρεται στη διφωσφορική αδενίνη (ADP) για να σχηματίσει ATP. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το NADH και άλλοι συμπαραγόμενοι (φερρεδοξίνες, φλαβίνες) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πολλών διαφορετικών αναγόμενων μεταβολικών

παραπροϊόντων και για την αναγέννηση του NAD^+ που απαιτείται για την γλυκόλυση (Boumba et al., 2008).

Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος είναι ενεργειακά αναποτελεσματικές σε σύγκριση με τον οξειδωτικό μεταβολισμό κι έχουν ως αποτέλεσμα σχετικά χαμηλές αποδόσεις ATP. Επομένως, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες υποστρώματος για την ανάπτυξη των ζυμωτικών μικροοργανισμών, που οδηγεί στο σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων μεταβολικών τελικών προϊόντων. Οι αντιδράσεις ζύμωσης πρέπει να είναι αυτοεξισορροπούμενες όσον αφορά το σχηματισμό και την κατανάλωση αναγωγικής ισχύος, με τη διαφορά οξειδοαναγωγής μεταξύ υποστρωμάτων και τελικών προϊόντων να καθορίζουν την ποσότητα ενέργειας που μπορεί να παραχθεί (Saier, 1998).

Σε μεγάλο βαθμό, η διαδικασία αυτή επηρεάζει τη ροή του άνθρακα μέσω των βακτηρίων, την ενεργειακή απόδοση που μπορεί να ληφθεί από το υπόστρωμα και τα προϊόντα ζύμωσης που δημιουργούνται (Allison & Macfarlane, 1998; Bruckner & Titgemeyer, 2002; Gibson et al., 1993; Saier, 1998; Ueno et al., 2001). Η σύνθεση των αναγόμενων προϊόντων συμπεριλαμβανομένων του υδρογόνου, του γαλακτικού, του ηλεκτρικού, του βουτυρικού και της αιθανόλης χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής κατά τη ζύμωση, ενώ ο σχηματισμός των περισσότερων προϊόντων οξείδωσης, όπως το οξικό, σχετίζεται με την παραγωγή ATP. Αντιθέτως, ο σχηματισμός περισσότερων προϊόντων αναγωγής έχει ως αποτέλεσμα τις συγκριτικά χαμηλότερες αποδόσεις ATP (Saier, 1998). Πολλά αναερόβια μικρόβια εκμεταλλεύονται την ευελιξία που προσφέρουν τα διακλαδισμένα μονοπάτια ζύμωσης, που τους επιτρέπουν να προσαρμόσουν τη θερμοδυναμική αποτελεσματικότητα του καταβολισμού του υποστρώματος, ως απόκριση στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, μέσω της ρύθμισης του σχηματισμού του ATP και της ισορροπίας οξειδοαναγωγής. Βασικά μόρια ελέγχου στο μικροβιακό μεταβολισμό είναι οι μεταβολίτες πυροσταφυλικό και ακετυλο-CoA, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε μεγάλη γκάμα προϊόντων.

Οι σχέσεις μεταξύ των ζυμωτικών οργανισμών είναι τέτοιες ώστε τα προϊόντα μιας ομάδας οργανισμών μπορούν να χρησιμεύουν ως υποστρώματα για μια άλλη ομάδα οργανισμών. Με άλλα λόγια, οι διάφοροι οργανισμοί παρατάσσονται με τις καταβολικές τους δραστηριότητες και σχηματίζουν τη λεγόμενη «αναερόβια τροφική αλυσίδα» (Gibson et al., 1993; Gottschalk, 1986; Ueno et al., 2001).

Οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται από δυνητικά ή υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια. Συνήθως, ταξινομούνται σύμφωνα με το κύριο τελικό προϊόν της διαδικασίας (π.χ. αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση) (Gottschalk, 1986).

1.3.2 Οι υδατάνθρακες ως μικροβιακά υποστρώματα

Οι υδατάνθρακες και κυρίως οι εξόζες, όπως η γλυκόζη, είναι οι προτιμώμενες πηγές άνθρακα και ενέργειας για πολλούς μικροοργανισμούς. Τα μικρόβια διαθέτουν δύο μηχανισμούς για τον καταβολισμό των υδατανθράκων: το γλυκολυτικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) και το μονοπάτι Entner-Doudoroff (ED). Το τελικό προϊόν αυτών των γλυκολυτικών διεργασιών είναι το πυροσταφυλικό.

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μονοπάτι για την πρόσληψη γλυκόζης και τη μετατροπή της σε πυροσταφυλικό είναι το μονοπάτι EMP και πραγματοποιείται σε ζώα, φυτά, πολλά βακτήρια και ζυμομύκητες. Το άθροισμα των αντιδράσεων με τη δημιουργία δύο μορίων πυροσταφυλικού και ATP ανά μόριο γλυκόζης έχει ως εξής:



Όπου, P_i: ανόργανο ορθοφωσφορικό.

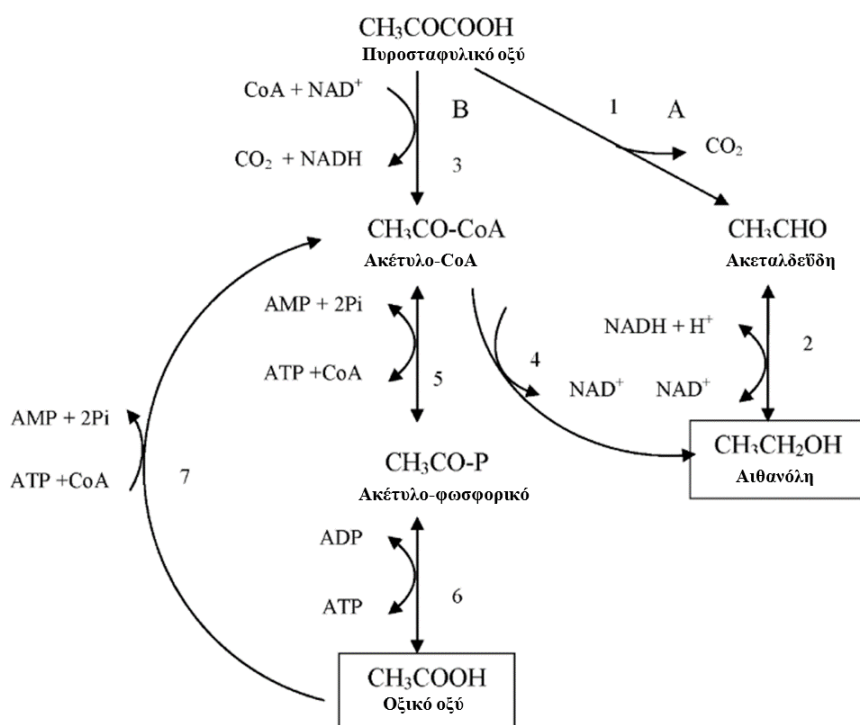
Το μονοπάτι ED, το οποίο απουσιάζει στα θηλαστικά, θεωρείται ότι είναι αρκετά διαδεδομένο ιδιαίτερα μεταξύ των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ δεν απαντάται συχνά στους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Το μονοπάτι ED αποδίδει μόνο ένα μόριο ATP ανά δύο μόρια πυροσταφυλικού.

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν αιθανόλη από τη γλυκόζη είναι διαδεδομένη και οι περισσότερες διαθέσιμες πληροφορίες αφορούν αυτό το υπόστρωμα. Πολλά είδη σχηματίζουν αιθανόλη ως κύριο τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους καθώς είναι ένας εξαιρετικά ανηγμένος μεταβολίτης (Boumba et al., 2008; Fuhrer et al., 2005; Gottschalk, 1986).

1.3.2.1 Αλκοολική ζύμωση από ζυμομύκητες και βακτήρια

Η αιθανόλη προέρχεται από τη ζυμωτική διάσπαση της γλυκόζης και άλλων εξοζών από διάφορους ζυμομύκητες, βακτήρια και μύκητες (Hahn-Hägerdal et al., 2006; Lin &

Tanaka, 2006). Οι ζύμες αναπτύσσονται μόνο για μερικές γενιές υπό αναερόβιες συνθήκες δεδομένου ότι δεν είναι πραγματικά δυνητικά αναερόβια μικρόβια (Gottschalk, 1986). Ο *S. cerevisiae* θεωρείται ο κύριος αιθανολοπαραγωγός από τα είδη των ζυμομυκήτων (Piskur et al., 2006). Η διάσπαση της γλυκόζης στους ζυμομύκητες πραγματοποιείται μέσω της οδού EMP. Το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται από την πυροσταφυλική καρβοξυλάση σε ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη από την αλκοολική αφυδρογονάση (Gottschalk, 1986; Piskur et al., 2006), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5** στο μονοπάτι A.



Σχήμα 5: Ζύμωση γλυκόζης σε αιθανόλη από ζυμομύκητες και βακτήρια. Οι αντιδράσεις που εμφανίζονται ξεκινούν από το στάδιο του πυροσταφυλικού ως τα τελικά προϊόντα. (A) Ζυμομύκητες και ορισμένα είδη βακτηρίων, 1: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, 2: αλκοολική αφυδρογονάση, (B) βακτήρια, 3: πυροσταφυλική αφυδρογονάση ή πυροσταφυλική-μυρμηκική λυάση, 4: ακεταλδεϊδική/αλκοολική αφυδρογονάση, 5: φωσφοτρανσακετυλάση, 6: οξική κινάση, 7: AMP-ακετυλο-CoA συνθετάση (Boumba et al., 2008; Wolfe, 2005).

Η αλκοολική ζύμωση της γλυκόζης και άλλων υδατανθράκων μπορεί, επίσης, να πραγματοποιηθεί από βακτήρια (Lin & Tanaka, 2006). Σε ορισμένα από αυτά η μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό επιτυγχάνεται μέσω της οδού ED (όπως για το *Zygomonas sp.*) (Rogers et al., 1984), ενώ σε άλλα είδη μέσω της οδού EMP (Lin & Tanaka, 2006). Η

τελική μετατροπή του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη περιλαμβάνει τα ένζυμα πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και αλκοολική αφυδρογονάση, όπως στην περίπτωση των ζυμομυκήτων (**Σχήμα 5A**). Αυτή η ζυμοτική οδός διεξάγεται από είδη όπως *Zymomonas mobilis*, *Zymomonas anaerobica*, *Sarcina ventriculi* και *Erminia amylovora* (Gottschalk, 1986; Lin & Tanaka, 2006; Rogers et al., 1984).

Ωστόσο, η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση είναι σπάνια στα βακτήρια (Fuhrer et al., 2005). Γι'αυτά τα βακτήρια, όπως πολλά βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Streptococcus lactis*, *Leucocostoc mesenteroides*, κ.λπ.), εντεροβακτήρια (*E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, κ.λπ.) και κλωστρίδια (*C. splenoides*, *C. sporogenes*, κ.λπ.) ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων αιθανόλης από υδατάνθρακες επιτυγχάνεται μέσω του ακετυλο-συνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) (Gottschalk, 1986). Το ακετυλο-CoA είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν υψηλής ενέργειας που βρίσκεται στο σταυροδρόμι του κεντρικού μεταβολισμού. Η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA μπορεί να συμβεί οξειδωτικά υπό αερόβιες συνθήκες και μη οξειδωτικά υπό αναερόβιες συνθήκες. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση καταλύεται από το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Η μη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA και μυρμηκικό καταλύεται από το σύστημα της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λύασης (Wolfe, 2005).

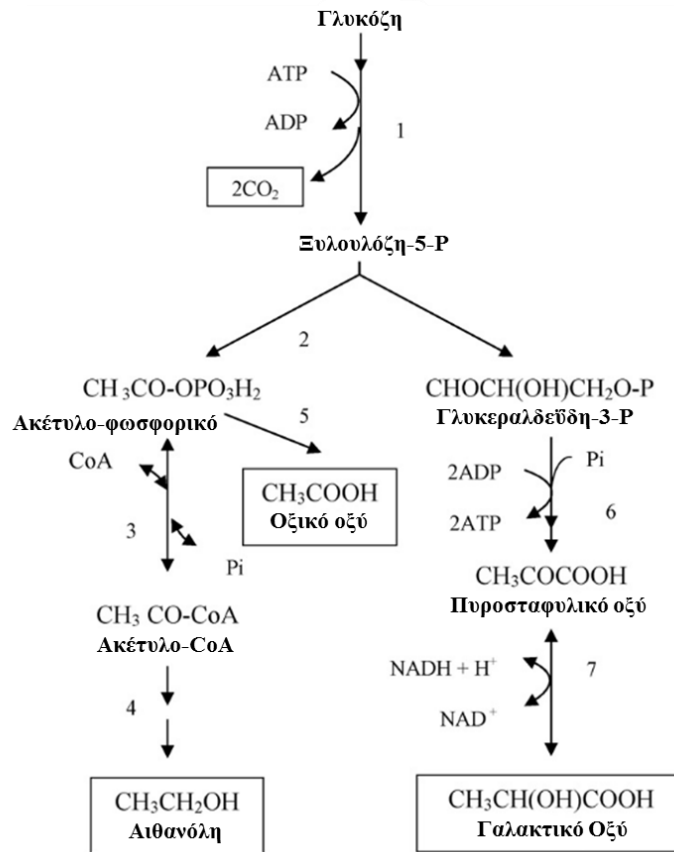
Το ακετυλο-CoA (**Σχήμα 5B**) μπορεί να ακολουθήσει δύο εναλλακτικές οδούς: είτε μετατροπή σε οξικό είτε αναγωγή σε αιθανόλη. Η μετατροπή του ακετυλο-CoA σε οξικό καταλύεται από το σύστημα φωσφοτρανσακετυλάσης-οξικής κινάσης, παράγει ATP και δεν καταναλώνει αναγωγικά ισοδύναμα. Η αναγωγή του ακετυλο-CoA σε αιθανόλη καταλύεται από την ακεταλδεϋδική/αλκοολική αφυδρογονάση, μέσω του σχηματισμού ακεταλδεϋδης και καταναλώνει αναγωγικά ισοδύναμα. Επομένως, τα βακτήρια μπορούν να εξισορροπήσουν τις απαιτήσεις τους για αναγωγικά νουκλεοτίδια και ενέργεια ρυθμίζοντας την ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης και του οξικού. Η παραγωγή αιθανόλης μέσω του ακετυλο-CoA έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαφόρων άλλων παραπροϊόντων (Wolfe, 2005).

1.3.2.2 Γαλακτική ζύμωση

Μερικά είδη βακτηρίων, που ονομάζονται βακτήρια γαλακτικού οξέος, παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο μεταβολικό τελικό προϊόν των ζυμώσεων των υδατανθράκων (Carr

et al., 2002; Garvie, 1980). Είναι δυνητικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί κι έχουν περιορισμένη βιοσυνθετική ικανότητα. Τα γένη που περιλαμβάνουν είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* και *Enterococcus*. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ταξινομούνται σύμφωνα με τα κύρια μονοπάτια ζύμωσης εξόζης σε δύο ομάδες (Gottschalk, 1986). Τα ομοζυμωτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος καταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού EMP σε πυροσταφυλικό το οποίο ανάγεται περαιτέρω σε γαλακτικό οξύ από τη γαλακτική αφυδρογονάση.

Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος μετατρέπουν τη γλυκόζη σε διάφορα οξέα (γαλακτικό, οξικό, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα). Στο **Σχήμα 6** φαίνονται σχηματικά οι αντιδράσεις που εμπλέκονται στη γαλακτική ζύμωση. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό με τη βοήθεια της γαλακτικής αφυδογονάσης (Garvie, 1980) ή σε ακετυλο-CoA και CO₂ με το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης ανάλογα με το αν ο ρυθμός πρόσληψης σακχάρου είναι υψηλός ή χαμηλός (Melchiorssen et al., 2001). Η μεταγενέστερη αναγωγή του ακετυλο-CoA από την ακεταλδεϋδική και την αλκοολική αφυδρογονάση αποδίδει ως τελικό προϊόν αιθανόλη. Επιπλέον, παράγεται οξικό οξύ.



Σχήμα 6: Ζύμωση γλυκόζης από βακτήρια γαλακτικού οξέος μέσω της ετεροζυμωτικής οδού σε αιθανόλη, γαλακτικό και διοξείδιο του άνθρακα. 1: εξοκινάση/αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης/6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση/επιμεράση της 5-φωσφορικής-3-ριβουλόζης, 2: φωσφοκετολάση (η αντίδραση διάσπασης καταλήγει στο σχηματισμό της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης και ακετυλοφωσφορικού) (Gottschalk, 1986), 3: φωσφοτρανσακετυλάση, 4: ακεταλδεΰδική/αλκοολική αφυδρογονάση, 5: οξική κινάση, 6: ένζυμα της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (Gottschalk, 1986), 7: γαλακτική αφυδρογονάση.

Το γαλακτικό θα μπορούσε να θεωρηθεί σημαντικό υπόστρωμα για το σχηματισμό αιθανόλης μεταθανάτια, αφού η γαλακτική αφυδρογονάση και το γαλακτικό βρίσκεται σε ανθρώπινους ιστούς. Στην πραγματικότητα, η μετατροπή του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό είναι εφικτή λόγω της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Σχήμα 6). Το πυροσταφυλικό μπορεί περαιτέρω να χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό αιθανόλης, όπως έχει αναφερθεί (Σχήμα 5) (Boumba et al., 2008).

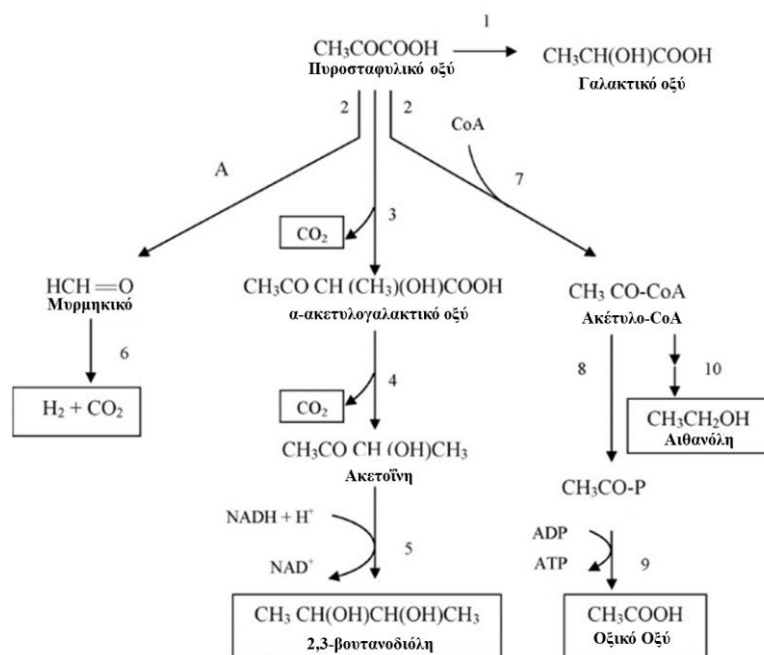
Επιπλέον, το γαλακτικό αποτελεί προτιμώμενο υπόστρωμα των βακτηρίων προπιονικού οξέος που είναι αναερόβια ως μικροαερόφιλα (Wood, 1981). Η αντίδραση της προπιονικής ζύμωσης είναι ως ακολούθως:



Το οξικό θα μπορούσε να μετατραπεί μέσω της δράσης της οξικής κινάσης ή της συνθετάσης του ακετυλο-CoA σε ακετυλο-CoA προκαλώντας το σχηματισμό αιθανόλης (Σχήμα 5) ή θα μπορούσε να συσσωρευτεί στο μέσο (Wolfe, 2005). Το προπιονικό από τα προπιονοβακτήρια θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό 1-προπανόλης (Wood, 1981).

1.3.2.3 Μικτή ζύμωση οξέων και βουτανοδιόλης

Αυτός ο τύπος ζύμωσης πραγματοποιείται από τα εντεροβακτήρια (Gottschalk, 1986). Είδη που ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Salmonella* και *Shigella* ζυμώνουν τα σάκχαρα σε ένα μίγμα προϊόντων που αποτελείται από γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και μυρμηκικό (μικτή ζύμωση οξέων). Επιπλέον, σχηματίζονται CO₂, H₂ και αιθανόλη (Σχήμα 7). Είδη των γενών *Enterobacter*, *Serratia* και *Erwinia* παράγουν λιγότερα οξέα, περισσότερο αέριο (CO₂) και αιθανόλη και κυρίως μεγάλες ποσότητες 2,3-βουτανοδιόλης (βουτανοδιολική ζύμωση) (Syu, 2001).



Σχήμα 7: Μικτή ζύμωση οξέων και βουτανοδιόλης που πραγματοποιείται από εντεροβακτήρια. 1: γαλακτική αφυδρογονάση, 2: πυροσταφυλική-μυρμηκική λυάση, 3: μυρμηκική-υδρογονική λυάση, 4: α-ακετογαλακτική συνθάση, 5: α-ακετογαλακτική αποκαρβοξυλάση, 6: 2,3-βουτανοδιολική αφυδρογονάση, 7: φωσφοτρανσακετυλάση, 8: οξική κινάση, 9: ακεταλδεϊδική/αλκοολική αφυδρογονάση.

Τα εντεροβακτήρια χρησιμοποιούν το μονοπάτι EMP για τη διάσπαση των εξοζών (Gottschalk, 1986). Στο **Σχήμα 7** παρουσιάζονται τα βιοχημικά μονοπάτια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια της μικτής ζύμωσης οξέων και βουτανοδιόλης. Το ηλεκτρικό προκύπτει από το φωσφοενολοπυρουβικό, την πρόδρομη ένωση του πυροσταφυλικού (δεν φαίνεται). Όλα τα υπόλοιπα τελικά προϊόντα (εκτός από το ηλεκτρικό) προέρχονται από το πυροσταφυλικό. Στη μικτή όξινη ζύμωση μεγάλες ποσότητες γαλακτικού σχηματίζονται από τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Μόνο μικρή ποσότητα γαλακτικού παράγεται κατά τη ζύμωση της βουτανοδιόλης. Η αναλογία των προϊόντων ζύμωσης που σχηματίζονται εξαρτάται από τη δραστηριότητα των συστημάτων τριών ενζύμων που μπορούν να δράσουν στο πυροσταφυλικό. Το πρώτο ένζυμο είναι η γαλακτική αφυδρογονάση, υπεύθυνη για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό (Garvie, 1980). Το δεύτερο ένζυμο είναι το σύστημα πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης που αποδίδει μυρμηκικό και ακετύλο-CoA (Bagramyan & Trchounian, 2003). Το τρίτο είναι η συνθάση του α-ακετογαλακτικού, η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε α-ακετογαλακτικό (Chipman et al., 2005).

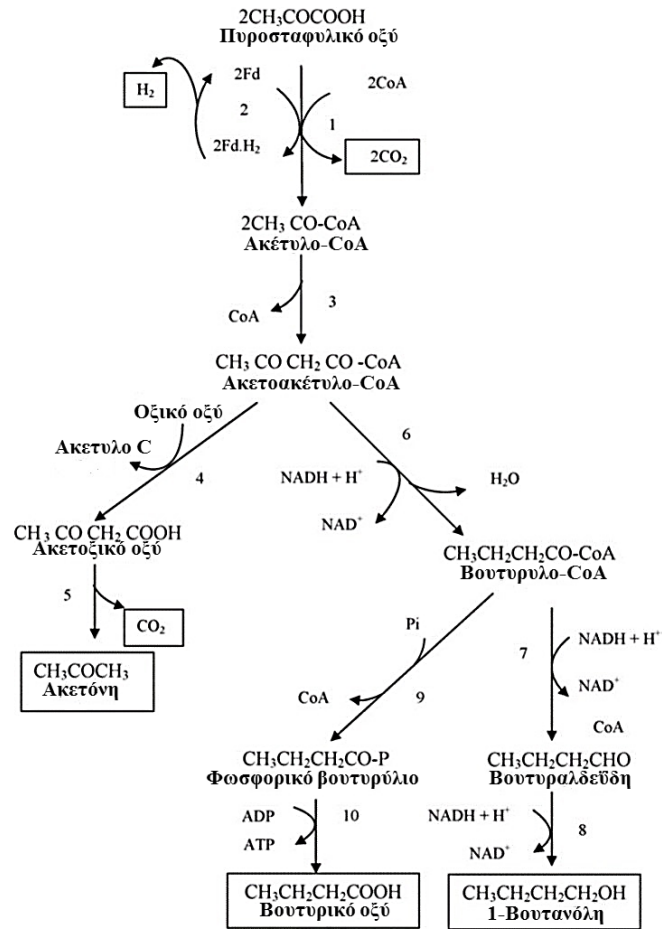
Τα εντεροβακτήρια διαθέτουν δύο ενζυμικά συστήματα για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετύλο-CoA. Το πρώτο είναι το πολυενζυμικό σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης που εμπλέκεται στον αερόβιο μεταβολισμό και δημιουργεί δύο επιπλέον μόρια NADH ανά μόριο γλυκόζης, ενώ το NADH αναστέλλει τη δραστηριότητά του. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις του NADH το οποίο δεν μπορεί να αποξειδωθεί σε NAD⁺ κι επιπλέον, δε συντίθεται πια. Αντιθέτως, υπό αναερόβιες συνθήκες, επάγεται η σύνθεση της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης. Το πλεονέκτημα της πυροσταφυλικής-μυρμηκικής λυάσης έναντι του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης είναι ότι ο σχηματισμός του ακετύλο-CoA δε συνοδεύεται από την αναγωγή του NAD⁺ (Wolfe, 2005).

Το ένζυμο συνθάση του α-ακετογαλακτικού είναι, επίσης, υπεύθυνο για το σχηματισμό της 2,3-βουτανοδιόλης από το πυροσταφυλικό από βακίλους (Chipman et al., 2005). Η συνθάση αυτή σχηματίζεται και είναι ενεργή υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες.

1.3.2.4 Ζύμωση βουτυρικού και βουτανόλης-ακετόνης

Το βουτυρικό σχηματίζεται ως κύριο προϊόν ζύμωσης από έναν αριθμό υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών που ανήκουν στα τέσσερα γένη *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* και *Fusobacterium*. Τα κλωστρίδια χρησιμοποιούν την οδό EMP για την αποδόμηση των εξοζών σε πυροσταφυλικό (Gottschalk, 1986; Mitchell, 1997).

Η αλληλουχία των αντιδράσεων που περιλαμβάνονται σε αυτόν τον τύπο ζύμωσης συνοψίζονται στο **Σχήμα 8**. Το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA από το ενζυμικό σύστημα πυροσταφυλικής-φερρεδοξίνης οξειδοοδουκτάσης. Το ακετυλο-CoA μετατρέπεται περαιτέρω σε ακετοακέτυλο-CoA, το οποίο μέσα από δύο διακλαδώσεις μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό είτε ακετόνης είτε βουτυρυλο-CoA. Το βουτυρυλο-CoA μπορεί είτε να μετατραπεί σε βουτυρικό είτε να αναχθεί σε 1-βουτανόλη. Το βουτυρικό δεν σχηματίζεται από το βουτυρυλο-CoA με απλή υδρόλυση. Αντιθέτως, το βουτυρυλο-CoA μετατρέπεται σε φωσφορικό βουτυρύλιο και τέλος, η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται στο ADP. Αυτές οι αντιδράσεις προχωρούν με κατάλυση των ενζύμων φωσφοτρανσβουτυρυλάση και βουτυρική κινάση, τα οποία είναι ανάλογα με τη φωσφοτρανσακετυλάση και την οξική κινάση (Gottschalk, 1986).



Σχήμα 8: Μεταβολική οδός για το σχηματισμό 1-βουτανόλης και ακετόνης από κλωστρίδια. 1: οξειδοοδονκτάση πυροσταφυλικού-φερρεδοξίνης, 2: υδρογονάση, 3: ακετυλο-CoA-ακετυλοτρανσφεράση (θειολάση), 4: μεταφορά του ακετοακετυλο-CoA-οξικό συνένζυμο A, 5: ακετοξική αποκαρβοξυλάση, 6: L(+)-β-υδροξυβουτυρυλο-CoA αφυδρογονάση, κροτονάση και βουτυρυλο-CoA αφυδρογονάση, 7: βουτυραλδεΐδική αφυδρογονάση, 8: βουτανολική αφυδρογονάση, 9: φωσφοτρανσβουτυρυλάση, 10: βουτυρική κινάση.

Μερικά κλωστρίδια που παράγουν βουτυρικό σχηματίζουν ταυτόχρονα μικρές ποσότητες 1-βουτανόλης. Αυτά συμπεριλαμβάνουν τα είδη *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. tetanomorphum* και *C. aurantibutyricum* (Mitchell, 1997). Δεδομένου ότι η 1-βουτανόλη είναι πολύ τοξική, η τελική της συγκέντρωση είναι της τάξης του 2% (σχετικά χαμηλή) (Gottschalk, 1986).

Αξίζει να αναφερθεί ότι σε αυτό το είδος ζύμωσης παράγονται παράλληλα οξικό, γαλακτικό και αιθανόλη. Αν και οι μεταβολικές οδοί έχουν περιγραφεί, η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισής τους είναι ατελής. Όπως συμβαίνει συνήθως στις διακλαδισμένες ζυμώσεις, η ροή προς τα κάτω σε κάθε διακλάδωση ποικίλλει σε απόκριση σε διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν το pH, την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ATP και των

ανηγμένων νουκλεοτιδίων πυριδίνης, τον περιορισμό των θρεπτικών συστατικών και την αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών ή της ροής άνθρακα και ηλεκτρονίων (Mitchell, 1997).

1.3.2.5 Χαρακτηριστικά των ζυμώσεων των υδατανθράκων

Η γλυκόζη και άλλες εξόζες είναι οι προτιμώμενες πηγές άνθρακα και ενέργειας για πολλά βακτήρια, με την έννοια ότι επιτυγχάνεται καλύτερος ρυθμός ανάπτυξής τους (Saier, 1998). Σε συνθήκες όπου είναι διαθέσιμο ένα μίγμα διαφορετικών υποστρωμάτων, πολύ οργανισμοί χρησιμοποιούν κατά προτίμηση μία πηγή άνθρακα και καταναλώνουν τις επιπλέον πηγές άνθρακα μόνο όταν το προτιμώμενο εξαντληθεί ή είναι εξαιρετικά περιορισμένο (Bruckner & Titgemeyer, 2002). Αυτή είναι η κατάσταση που επικρατεί σε ένα πτώμα κατά τη διαδικασία της σήψης.

Ο κύριος σκοπός του μεταβολισμού των σακχάρων είναι να παρέχει ενέργεια στο βακτηριακό κύτταρο με τη μορφή αναγωγικών ισοδύναμων και ATP, καθώς και βασικές βιοσυνθετικές πρόδρομες ουσίες (Saier, 1998). Οι περισσότεροι από τους διαθέσιμους υδατάνθρακες θα μπορούσαν να μετατραπούν σε μίγμα προϊόντων ζύμωσης. Τα κυριότερα διαλυτά προϊόντα είναι οξικό και αιθανόλη (Bruckner & Titgemeyer, 2002; Ueno et al., 2001).

Η παραγωγή οξικού και αιθανόλης προκύπτει από την ανάγκη αναγέννησης του NAD^+ που καταναλώνεται στη γλυκόλυση και για την ανακύκλωση του συνενζύμου A (CoASH) που απαιτείται για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA. Η πλήρης οξείδωση του ακετυλο-CoA προς το διοξείδιο του άνθρακα πραγματοποιείται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Ένας αριθμός περιβαλλοντικών παραγόντων επηρεάζουν τη σύνθεση των απεκκρινόμενων προϊόντων. Ένας από τους πιο σημαντικούς είναι το pH: κοντά ή πάνω από την τιμή 7, τα κυρίαρχα προϊόντα είναι το οξικό, η αιθανόλη και το μυρμηκικό, ενώ καθώς το pH μειώνεται, τα κύτταρα παράγουν περισσότερο γαλακτικό παρά οξικό και μυρμηκικό (Wolfe, 2005).

Μετά το θάνατο, καταναλώνονται πρώτα οι υδατάνθρακες καθώς είναι το προτιμότερο υπόστρωμα για πολλά μικρόβια. Οι ζυμώσεις των υδατανθράκων, όποτε οι συνθήκες το ευνοούν, δημιουργούν το μεγαλύτερο ποσοστό της μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός ότι η σύνθεση της αιθανόλης

παρατηρείται στα αρχικά στάδια της σήψης. Παράλληλα μπορούν, επίσης, να σχηματιστούν 1-βουτανόλη, ακετόνη και 2-προπανόλη, ωστόσο, σε πολύ μικρότερο βαθμό.

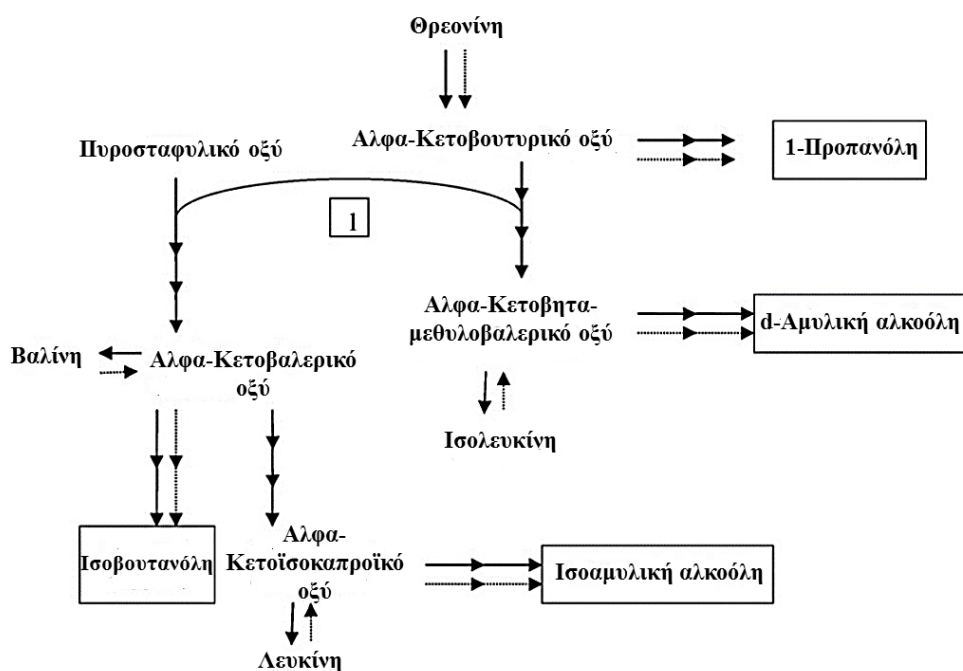
Καθώς οι υδατάνθρακες εξαντλούνται, τα μικρόβια αρχίζουν να καταναλώνουν άλλα διαθέσιμα υποστρώματα (αμινοξέα, γλυκερίνη και λιπαρά οξέα). Εν τω μεταξύ, η μικροχλωρίδα στο πτώμα αλλάζει και η διαδοχή των μικροβίων επιτρέπει την ανάπτυξη περισσότερων καταστροφικών ειδών, όπως τα κλωστρίδια. Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός σύνθεσης της αιθανόλης μειώνεται και τα επίπεδά της παραμένουν σχετικά σταθερά. Υπάρχει, επίσης, η πιθανότητα η αιθανόλη να καταναλωθεί από τα μικρόβια. Αυτό θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πτητικών ουσιών. Ωστόσο, η κατανάλωση αιθανόλης από τα βακτήρια είναι μία θερμοδυναμικά δυσμενής αντίδραση και προχωρά μόνο όταν καταναλώνονται οξικό και υδρογόνο. Ταυτόχρονα, άλλα πτητικά όπως οι ανώτερες αλκοόλες αρχίζουν να παράγονται στο αποσυντεθειμένο πτώμα ως αποτέλεσμα της ζύμωσης άλλων υποστρωμάτων (Stöhlmacher, 1996).

1.3.3 Τα αμινοξέα ως μικροβιακά υποστρώματα

Τα αμινοξέα ως μικροβιακά υποστρώματα δημιουργούν πτητικές ενώσεις, γνωστές ως ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη (2-μεθυλο-προπανόλη) 2-μεθυλο-1-βουτανόλη (d-αμυλική αλκοόλη), 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη)).

1.3.3.1 Μικροβιακός σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών

Οι βασικές ενδιάμεσες ενώσεις για τον σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών είναι τα αντίστοιχα α-κετοξέα. Αυτά τα κετοξέα μπορεί να προέρχονται είτε καταβολικά από εξωγενή αμινοξέα (μονοπάτι «Ehrlich») είτε θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα των αναβολικών βιοσυνθετικών οδών των αμινοξέων (**Σχήμα 9**). Η επιλογή της οδού εξαρτάται από την ανώτερη αλκοόλη και από τα επίπεδα των διαθέσιμων αμινοξέων. Η σημασία της αναβολικής οδού μειώνεται καθώς ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στην αλκοόλη αυξάνεται και αυξάνεται καθώς εξαντλούνται τα αμινοξέα (Chen, 1978).



Σχήμα 9: Αλληλεπίδραση των μεταβολικών οδών των αμινοξέων που εμπλέκονται στο σχηματισμό ανώτερων αλκοολών. Συμπαγή βέλη: βιοσυνθετικά μονοπάτια, διακεκομμένα βέλη: μονοπάτια Ehrlich. 1: συνθάση πυροσταφυλικού ακετοϋδροξυ οξέος.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 9**, τα α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας θα μπορούσαν να συντεθούν *de novo* από υδατάνθρακες (Gottschalk, 1986). Η θρεονίνη αρχικά απαμινώνεται από την απαμινάση της θρεονίνης σε ακετοβουτυρικό. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί με α-κετοβουτυρικό σε ισολευκίνη, μία αντίδραση που καταλύεται από τη συνθάση του πυροσταφυλικού ακετοϋδροξυ οξέος. Αυτό το ένζυμο παίζει επίσης ρόλο στη μετατροπή δύο μορίων πυροσταφυλικού σε βαλίνη και λευκίνη. Η αλληλοσυσχέτιση των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αμινοξέων θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός ότι όλες οι ανώτερες αλκοόλες (αλκοόλες διακλαδισμένης αλυσίδας και 1-προπανόλη) σχηματίζονται κατά τις διεργασίες ζύμωσης. Όσον αφορά την 1-προπανόλη, θα μπορούσε να σχηματιστεί και από άλλες μεταβολικές διεργασίες ξεκινώντας από γλυκερόλη ή λιπαρά οξέα.

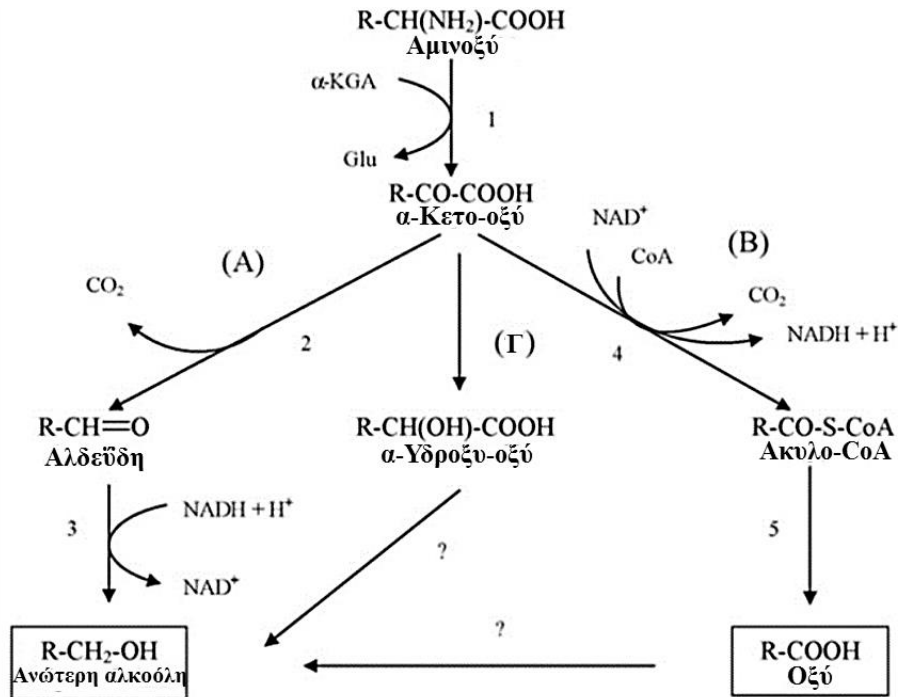
Η μεταβολική οδός σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από την απαμίνωση ή τρανσαμίνωση της εξωκυτταρικής θρεονίνης και των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, μέσω του σχηματισμού των αντίστοιχων κετοξέων είναι γνωστή ως «μονοπάτι Ehrlich» (Ehrlich, 1907). Το «μονοπάτι Ehrlich» λαμβάνει χώρα σε ζυμομύκητες και άλλα μικρόβια. Περιλαμβάνει μία αντίδραση αμινοτρανσφεράσης που αποδίδει τα αντίστοιχα α-κετοξέα

από τα αντίστοιχα αμινοξέα, μία αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αλδεϋδης και τέλος, την αναγωγή των αλδεϋδών προς τις αντίστοιχες αλκοόλες.

1.3.3.2 Σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από ζυμομύκητες

Το πρώτο βήμα αποτελείται από μία αντίδραση τρανσαμίνωσης των αντίστοιχων αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας προς α-κετοξέα (καταλύεται από μία κυτοσολική αμινοτρανσφεράση). Ακολουθούν τρία μονοπάτια που οδηγούν από τα α-κετοξέα στις ανώτερες αλκοόλες (Dickinson et al., 1997, 1998, 2000; Dickinson & Norte, 1993).

Η πρώτη οδός είναι το «μονοπάτι Ehrlich» που φαίνεται σχηματικά στο **Σχήμα 10**, μονοπάτι A. Η αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων σε αλδεϋδες πραγματοποιείται από διαφορετικά ένζυμα ως ακολούθως: το α-κετοϊσοκαπροϊκό από α-κετοϊσοκαπροϊκή αποκαρβοξυλάση, το α-κετοϊσοβαλερικό και το α-κετομεθυλοβαλερικό από διαφορετικά ισοένζυμα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (Dickinson et al., 1998). Η μετέπειτα μετατροπή των αλδεϋδών στις αντίστοιχες αλκοόλες πραγματοποιείται από αλκοολικές αφυδρογονάσες.



Σχήμα 10: Μεταβολικά μονοπάτια για το μεταβολισμό της λευκίνης, της ισολευκίνης, της βαλίνης και της θρεονίνης σε ισοαμυλική αλκοόλη, *d*-αμυλική αλκοόλη, ισοβουτανόλη και 1-προπανόλη, αντίστοιχα, σε ζυμομύκητες και βακτήρια. 1: αμινοτρανσφεράση αμινοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας, 2: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, 3: αλκοολική αφυδρογονάση, 4: αφυδρογονάση α-κετοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας, 5: ακετυλο-CoA υδρολάση, 6: αναγωγή (εικαζόμενη δραστηριότητα). R: $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-}$ για τη βαλίνη, $\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-}$ για την ισολευκίνη, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{-}$ για το α-κετοβουτυρικό οξύ που είναι το αντίστοιχο με το α-κετοξύ της θρεονίνης. Η θρεονίνη μετατρέπεται αρχικά στο ασταθές προϊόν α-αμινο-2-βουτενοϊκό οξύ από την αφυδατάση της θρεονίνης, που στη συνέχεια απαμινώνεται από την απαμινάση της θρεονίνης στο α-κετοβουτυρικό (Gottschalk, 1986). Τα α-κετοξέα που σχηματίζονται από τα αντίστοιχα αμινοξέα είναι το α-κετοϊσοβαλερικό οξύ από τη βαλίνη, το α-κετο-β-μεθυλο-βαλερικό οξύ από την ισολευκίνη, το α-κετοϊσοκαπροϊκό οξύ από τη λευκίνη και το α-κετοβουτυρικό οξύ από τη θρεονίνη.

Το μονοπάτι Β ακολουθείται από τον *S. cerevisiae* από ένα σύμπλοκο ενζύμων με δραστηριότητα αφυδρογονάσης α-κετοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας. Αυτή η δραστηριότητα καταλύει τη μετατροπή του α-κετοϊσοκαπροϊκού, α-κετομεθυλοβαλερικού και α-κετοϊσοβαλερικού σε ισοβαλερυλ-CoA, α-μεθυλοβουτυρυλ-CoA και ισοβουτυρυλ-CoA, τα οποία μετετρέπονται περαιτέρω σε ισοβαλερικό, α-μεθυλοβαλερικό και ισοβουτυρικό από την ακυλο-CoA-υδρολάση. Τα οξέα που σχηματίζονται θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ισοαμυλικής αλκοόλης, αμυλικής αλκοόλης και ισοβουτανόλης, αντίστοιχα, από τη δράση ενός ενζύμου άγνωστης ακόμη ενζυμικής

δραστηριότητας. Το μονοπάτι Γ θα μπορούσε να καταλύεται μέσω μιας αναγωγάσης που θα σχηματίζει τα αντίστοιχα α-υδροξυλικά οξέα (Boumba et al., 2008).

Στους ζυμομύκητες, το α-κετοβουτυρικό (η πρόδρομη ένωση της 1-προπανόλης) σχηματίζεται από θρεονίνη. Η θρεονίνη αρχικά μετατρέπεται από την αφυδρατάση της θρεονίνης στο ασταθές προϊόν α-αμινο-2-βουτενοϊκό οξύ και με περαιτέρω απαμίνωση από την απαμινάση της θρεονίνης στο α-κετοβουτυρικό (Gottschalk, 1986).

Το μονοπάτι Ehrlich θεωρείται ότι είναι το κυρίαρχο για τον σχηματισμό 1-προπανόλης από το α-κετοβουτυρικό από τους ζυμομύκητες (Janssen, 2004).

1.3.3.3 Σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από βακτήρια

Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών από βακτήρια από τα αντίστοιχα α-κετοξέα, ακολουθώντας τα ίδια μονοπάτια όπως οι ζύμες. Η μελέτη του Janssen (Janssen, 2004) περιγράφει ένα είδος *Clostridium* ικανό να παράγει 1-προπανόλη από θρεονίνη και δίνει ενδείξεις ότι το μονοπάτι Β, που περιγράφεται στο **Σχήμα 10**, για τον μεταβολισμό της θρεονίνης σε 1-προπανόλη μπορεί να λειτουργεί και σε βακτήρια. Η αφυδατάση της θρεονίνης μετατρέπει τη θρεονίνη σε α-κετοβουτυρικό, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε προπιονυλ-CoA από τη α-κετοβουτυρική συνθάση. Μέρος του προπιονυλ-CoA μεταβολίζεται περαιτέρω σε προπιονικό μέσω ενός μονοπατιού σχηματισμού ATP και τέλος, σε 1-προπανόλη.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τους Gram-αρνητικούς βάκιλλους του γένους *Zymomonas* έδειξαν ότι τα είδη *Zymomonas* και οι ζύμες μοιράζονται παρόμοια βιοσυνθετικά μονοπάτια για την παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Τα βακτήρια αυτά μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού ED και παρουσιάζουν μεγαλύτερες δυνατότητες από τις ζύμες για την παραγωγή αιθανόλης. Τα είδη *Zymomonas* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών τα οποία περιέχουν αρκετές ανώτερες αλκοόλες ως κύρια συστατικά, όπως η 1-προπανόλη, η ισοβουτανόλη, η ισοαμυλική αλκοόλη και η d-αμυλική αλκοόλη (Rogers et al., 1984).

Η δυνατότητα ύπαρξης παρόμοιων μεταβολικών οδών μεταξύ ζυμομυκήτων και βακτηρίων έχει υποστηριχτεί από την εύρεση μιας αφυδρογονάσης κετοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας σε πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus subtilis*,

Pseudomonas putida, *Streptococcus faecalis* και *Staphylococcus xylosus* (Boumba et al., 2008).

1.3.3.4 Σχηματισμός αιθανόλης από τη θρεονίνη

Άλλο ένα ένζυμο που θα μπορούσε να δράσει στη θρεονίνη είναι η αλδολάση της θρεονίνης, η οποία έχει χαρακτηριστεί σε ζυμομύκητες. Αυτό το ένζυμο μετατρέπει τη θρεονίνη σε γλυκίνη και ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη με αλκοολική αφυδρογονάση (Dainty, 1970).

1.3.3.5 Χαρακτηριστικά του σχηματισμού ανώτερων αλκοολών

Η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών από τα αντίστοιχα α-κετοξέα έχει προταθεί ως μηχανισμός αφομοίωσης της περίσσειας των αντίστοιχων αμινοξέων, βάλινη, λευκίνη, ισολευκίνη και θρεονίνη, τέσσερα αμινοξέα των οποίων ο μεταβολισμός έχει πολλά κοινά ενζυμικά στάδια και είναι υπό τον έλεγχο των αλληλένδετων μηχανισμών ανατροφοδότησης (Σχήμα 9). Στις καλλιέργειες ζυμομυκήτων τα αμινοξέα ή τα α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδα έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοναδική πηγή αζώτου (Dickinson et al., 1997, 1998, 2000; Dickinson & Norte, 1993).

Ενδεικτικές της φυσιολογικής σημασίας του σχηματισμού των ανώτερων αλκοολών είναι οι ακόλουθες δύο παρατηρήσεις: πρώτον, ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης απαιτείται για την παραγωγή τους και δεύτερον, ότι η εμφάνιση των ανώτερων αλκοολών συμπίπτει με τον σχηματισμό της αιθανόλης (Reazin et al., 1973). Η εξήγηση που δόθηκε σε αυτή την άποψη ήταν ότι παρουσία γλυκόζης, περισσότερο αναγωγικά συνένζυμα ήταν διαθέσιμα για τη σύνθεση των ανώτερων αλκοολών από πρόδρομες ενώσεις, παρόλο που είναι πιθανό κάποιες από τις ανώτερες αλκοόλες να παράγονταν από τη γλυκόζη. Ανταγωνισμός υπάρχει για το NADH, την αλκοολική αφυδρογονάση και την καρβοξυλάση εξηγώντας έτσι την υστέρηση μεταξύ της εξαφάνισης των αμινοξέων και της εμφάνισης των ανώτερων αλκοολών που παρατηρήθηκαν στις σχετικές μελέτες (Dickinson et al., 2000; Reazin et al., 1973). Ο αναγωγικός σχηματισμός των αλκοολών θα πρέπει να μπορεί να χρησιμεύσει ως μηχανισμός ανακύκλωσης αναγόμενων συμπαραγόντων κατά τη διάρκεια του καταβολισμού των αμινοξέων. Ως εκ τούτου, ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών, αν

και ασυνήθιστο, έχει προταθεί ως μηχανισμός απόρριψης ηλεκτρονίων κατά τη ζύμωση των αμινοξέων (Janssen, 2004).

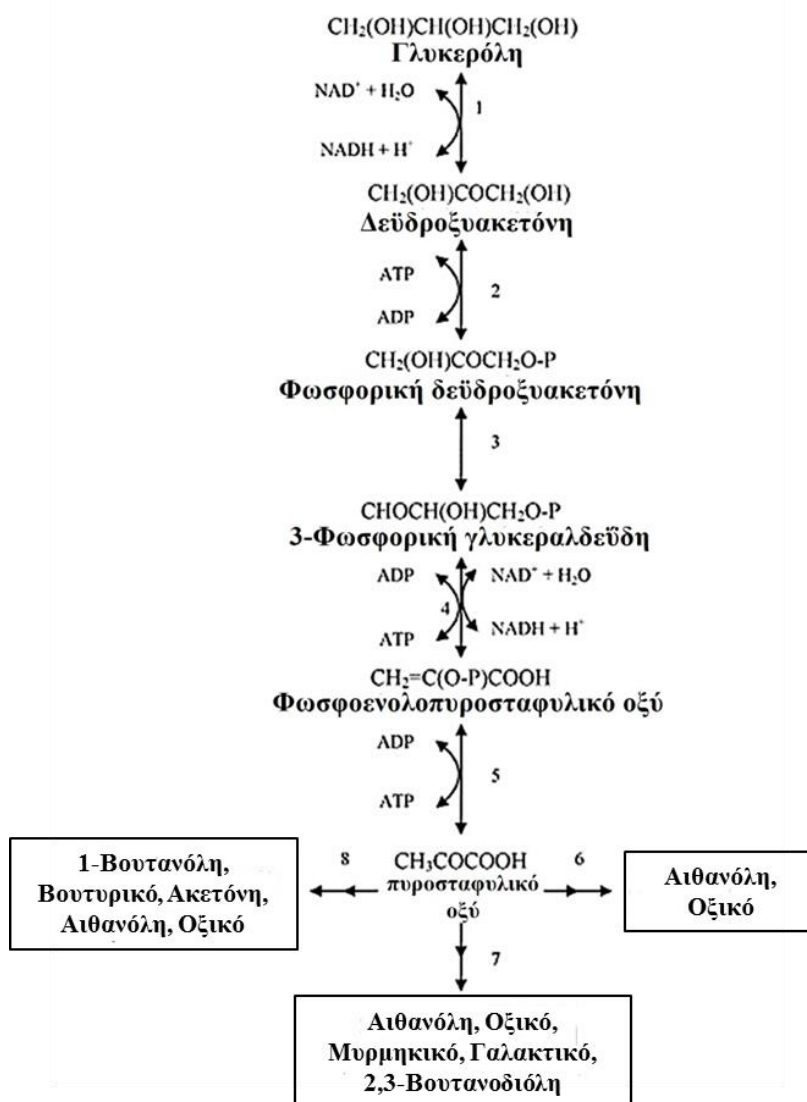
Τέλος, αν και οι ποσότητες των ανώτερων αλκοολών που σχηματίζονται είναι μεταβλητές, στις περισσότερες περιπτώσεις κυριαρχεί η 1-προπανόλη. Μία πιθανή εξήγηση σε αυτό είναι ότι η 1-προπανόλη θα μπορούσε να προκύψει απευθείας από πηγές αμινοξέων (θρεονίνη) ανεξάρτητα από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων (που απαιτείται για τις άλλες ανώτερες αλκοόλες) και τη διαθεσιμότητα γλυκόζης στο μέσο (**Σχήμα 9**). Επίσης, μία άλλη πιθανότητα είναι ο σχηματισμός της 1-προπανόλης από άλλα μονοπάτια (εκτός από το μονοπάτι Ehrlich) και υποστρώματα (εκτός από αμινοξέα).

1.3.4 Η γλυκερόλη ως μικροβιακό υπόστρωμα

Η γλυκερόλη μπορεί να προέρχεται είτε από την υδρόλυση λιπιδίων είτε από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και μπορεί να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα ζύμωσης για τους ζυμομύκητες, καθώς και για είδη βακτηρίων. Στις ζύμες που μπορούν να αφομοιώσουν τη γλυκερόλη περιλαμβάνονται οι *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *Z. rouxii*, *C. glycerogenes* και *S. pombe* (Wang et al., 2001). Τα βακτηριακά είδη που μπορούν να μεταβολίσουν τη γλυκερόλη περιλαμβάνουν εντεροβακτήρια του γένους *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*) και *Citrobacter* (*C. freundii*), *Lactobacilli* (*L. brevis* και *L. buchneri*), κλωστηρίδια (*C. butyricum* και *C. pasterianum*) και προπιονοβακτήρια (Biebl et al., 1999; Himmi et al., 2000).

Σχετικές αναφορές δείχνουν ότι μέρος της γλυκερόλης ζυμώνεται παράγοντας τα ίδια προϊόντα, όπως στις ζυμώσεις των υδατανθράκων. Αυτή η μετατροπή παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη, αλλά η απελευθέρωση ανηγμένων ισοδύναμων απαιτεί μια διαδικασία για την οξείδωσή τους. Η οξείδωση επιτυγχάνεται με αναγωγική μετατροπή ενός άλλου μέρους της γλυκερόλης που παράγει προπανοδιόλες, προπιονικό και 1-προπανόλη (Biebl et al., 1999; Himmi et al., 2000).

Το πρώτο μεταβολικό μονοπάτι έχει μελετηθεί εκτενώς σε ζυμομύκητες, ενώ πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι είναι λειτουργικό σε εντεροβακτήρια και κλωστηρίδια (Biebl et al., 1999). Στο **Σχήμα 11** φαίνονται οι μεταβολικές αντιδράσεις από γλυκερόλη σε πυροσταφυλικό και από πυροσταφυλικό σε αιθανόλη και άλλα τελικά προϊόντα.

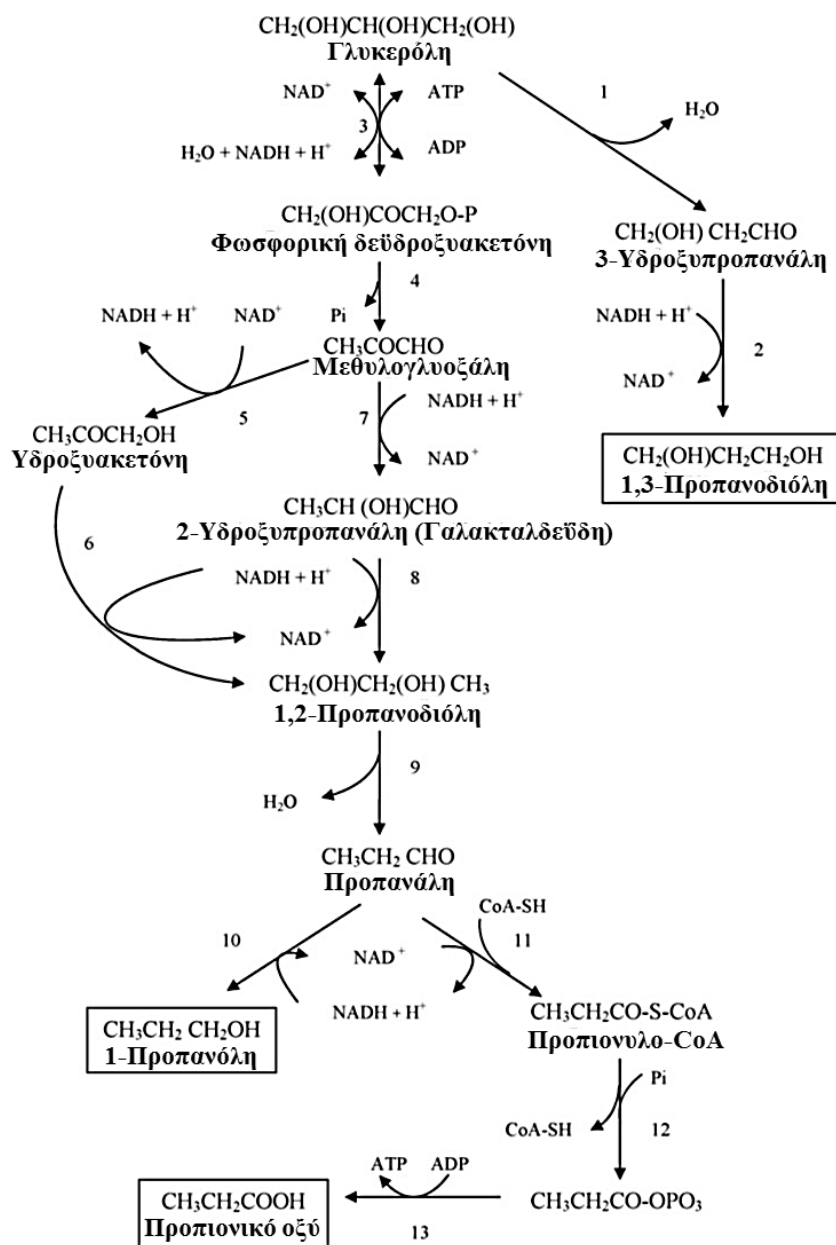


Σχήμα 11: Μεταβολισμός της γλυκερόλης με σχηματισμό προϊόντων όπως στον μεταβολισμό των υδατανθράκων για ζυμομύκητες, εντεροβακτήρια και κλωστρίδια. 1: αφυδρογονάση της γλυκερόλης, 2: κινάση της δεϋδροξυακετόνης, 3: ισομεράση της φωσφορικής τριόζης, 4: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, 5: πυροσταφυλική κινάση, 6: στους ζυμομύκητες η αιθανόλη σχηματίζεται από πυροσταφυλικό με την αλληλουχία των αντιδράσεων όπως στο **Σχήμα 5**, 7: στα εντεροβακτήρια ακολουθείται η αλληλουχία των αντιδράσεων όπως παρουσιάζονται στο **Σχήμα 7**, 8: στα κλωστρίδια ακολουθείται η αλληλουχία των αντιδράσεων όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**.

Οι αντιδράσεις μέχρι το στάδιο του πυροσταφυλικού είναι κοινές για όλους τους μικροοργανισμούς. Τα ενδιάμεσα αυτής της ακολουθίας των αντιδράσεων, η 3-φωσφορική γλυκερόλη και η δεϋδροξυακετόνη, χρησιμεύουν ως πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση φωσφολιπιδίων και γλυκερολιπιδίων, ενώ η δεϋδροξυακετόνη αποτελεί, επίσης, πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των αμινοξέων. Η μοίρα του πυροσταφυλικού είναι διαφορετική

(Biebl et al., 1998). Στα εντεροβακτήρια ακολουθείται η ίδια αλληλουχία αντιδράσεων, όπως στη ζύμωση της βουτανοδιόλης και της αιθανόλης, που παρουσιάζονται στα **Σχήματα 5 και 7**. Από το ακετυλο-CoA σχηματίζεται οξικό οξύ μέσω ακετυλο-φωσφορικού, αποδίδοντας επιπλέον ATP και αιθανόλη, που περιλαμβάνει δύο στάδια οξείδωσης NADH με την ακεταλδεύδη ως ενδιάμεσο (**Σχήμα 5**). Το πυροσταφυλικό μπορεί, επίσης, να συμπυκνωθεί σε αλφα-ακετολακτικό και τέλος, σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη (**Σχήμα 6**). Στο *C. butyricum* και σε στελέχη κλωστριδίων σχηματίζονται δύο προϊόντα: οξικό και βουτυρικό, καθώς και μικρή ποσότητα αιθανόλης. Το *C. pasteurianum* σχηματίζει επιπλέον 1-βουτανόλη, η οποία κάποιες φορές αποτελεί το κυρίαρχο προϊόν (**Σχήμα 7**) (Boumba et al., 2008).

Το δεύτερο μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκερόλης έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό προπανοδιολών και παρουσιάζεται σχηματικά στο **Σχήμα 12**. Το μονοπάτι αυτό προχωρά σε δύο διαφορετικές διακλαδώσεις που ακολουθούνται από διαφορετικά είδη βακτηρίων. Η πρώτη διακλάδωση (A) ακολουθείται από ένα ευρύ φάσμα μικροβίων των γενών *Enterobacteria* και *Clostridia* που μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκερόλη σε 1,3-προπανοδιόλη υπό αναερόβιες συνθήκες (Biebl et al., 1999). Αρχικά, η γλυκερόλη αφυδατώνεται σε 3-υδροξυπροπανάλη από την αφυδατάση της γλυκερόλης (ένα ενζυμικό σύμπλοκο πολλαπλών υπομονάδων που απαιτεί το συνένζυμο B12 ως συμπαράγοντα) (Forage & Foster, 1982). Στη συνέχεια, η 3-υδροξυπροπανάλη ανάγεται σε 1,3-προπανοδιόλη από την αφυδρογονάση της 1,3-προπανοδιόλης συνδεδεμένης με NADH.



Σχήμα 12: Αναγωγική ζύμωση της γλυκερόλης που οδηγεί στον σχηματισμό προπανοδιόλης, 1-προπανόλης και προπιονικού. 1: αφυδατάση της γλυκερόλης, 2: αφυδρογονάση της 1,3-προπανοδιόλης, 3: αφυδρογονάση της γλυκερόλης/κινάση της αφυδροξυακετόνης, 4: μεθυλογλυοξαλική συνθετάση, 5: μεθυλογλυοξαλική αναγωγή, 6: αφυδρογονάση της γλυκερόλης, 7: αφυδρογονάση της γλυκερόλης, 8: αναγωγή της γαλακταλδεΐδης, 9: αφυδατάση της διόλης, 10: αλκοολική αφυδρογονάση, 11: αφυδρογονάση της αλδεΐδης εξαρτώμενη από το CoA, 12: φωσφοτρανσακετυλάση, 13: κινάση.

Η δεύτερη διακλάδωση (B) παράγει 1,2-προπανοδιόλη (**Σχήμα 12**). Αυτή η οδός έχει μελετηθεί κυρίως στους μικροοργανισμούς *E. coli*, *C. splendens*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* και *Thermoanaerobacter ethanolyticus*

(Altaras & Cameron, 1999; Tran-Din & Gottschalk, 1985). Η γλυκερόλη μετατρέπεται σε 1-δεϋδροξυακετόνη (ακετόλη) και στη συνέχεια σε φωσφορική δεϋδροξυακετόνη, η οποία περαιτέρω αποφωσφορυλιώνεται σε μεθυλογλυοξάλη από τη συνθάση της μεθυλογλυοξάλης. Η μεθυλογλυοξάλη ανάγεται είτε σε R-γαλακταλδεϋδη όπως στο *C. splenoides* ή σε υδροξυλακετόνη (ακετόλη) όπως στο *T. Thermosacharolyticum* (Cooper, 1984). Στη συνέχεια, η γαλακταλδεϋδη και η ακετόλη ανάγονται σε 1,2-προπανοδιόλη (Cameron et al., 1998).

Η σχηματιζόμενη 1,2-προπανοδιόλη αρχικά αφυδατώνεται σε προπανάλη από το ένζυμο αφυδατάση της διόλης. Στη συνέχεια, η προπανάλη οξειδώνεται σε προπιονυλ-CoA από μία αλδεϋδική αφυδρογονάση εξαρτώμενη από το CoA. Το επόμενο βήμα είναι η τρανσακετυλίωση από προπιονυλ-CoA σε ανόργανο φωσφορικό άλας που μεσολαβείται από την α-φωσφοτρανσακετυλάση. Το προπιονυλο-φωσφορικό υδρολύεται τελικά σε προπιονικό οξύ από την οξική κινάση με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση ενός μορίου ADP σε ATP. Αυτό το στάδιο φωσφορυλίωσης είναι το μοναδικό βήμα παραγωγής ενέργειας στον μεταβολισμό της 1,2-διόλης. Εν τω μεταξύ, παράγονται δύο ισοδύναμα αναγωγικής ισχύος. Έτσι, άλλο ένα μόριο προπανάλης δρα ως δέκτης υδρογόνου και αποδίδει 1-προπανόλη.

1.3.4.1 Χαρακτηριστικά των μονοπατιών μεταβολισμού της γλυκερόλης

Τα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια της γλυκερόλης που περιγράφονται από τα **Σχήματα 11** και **12** χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα από τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς, ενώ η αιθανόλη και το οξικό παράγονται από όλα τα εμπλεκόμενα μικρόβια. Τα προϊόντα που παράγονται επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως η κυτταρική φυσιολογία, η γονιδιακή ρύθμιση, οι δραστηριότητες των γονιδιακών προϊόντων κ.λπ. (Altaras & Cameron, 1999; Biebl et al., 1999; Cameron et al., 1998; Tran-Din & Gottschalk, 1985).

Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί σε μελέτες με καλλιέργειες της *K. pneumoniae* και γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα ότι όταν η γλυκερόλη είναι περιορισμένη, παράγονται μεγάλες ποσότητες αιθανόλης, αλλά καθώς η συγκέντρωση της γλυκερόλης αυξάνεται, παύει η παραγωγή αιθανόλης και η 1,3-προπανοδιόλη πλησιάζει το μέγιστο. Στην ίδια μελέτη, έχει αποδειχτεί ότι υπό όξινες συνθήκες προηγείται η ζύμωση της 2,3-βουτανοδιόλης, ενώ σε

καλλιέργειες με μη ελεγχόμενο pH, μπορεί να ληφθεί ένα φάσμα προϊόντων που προέρχονται από όλες τις πιθανές αντιδράσεις (Biebl et al., 1998).

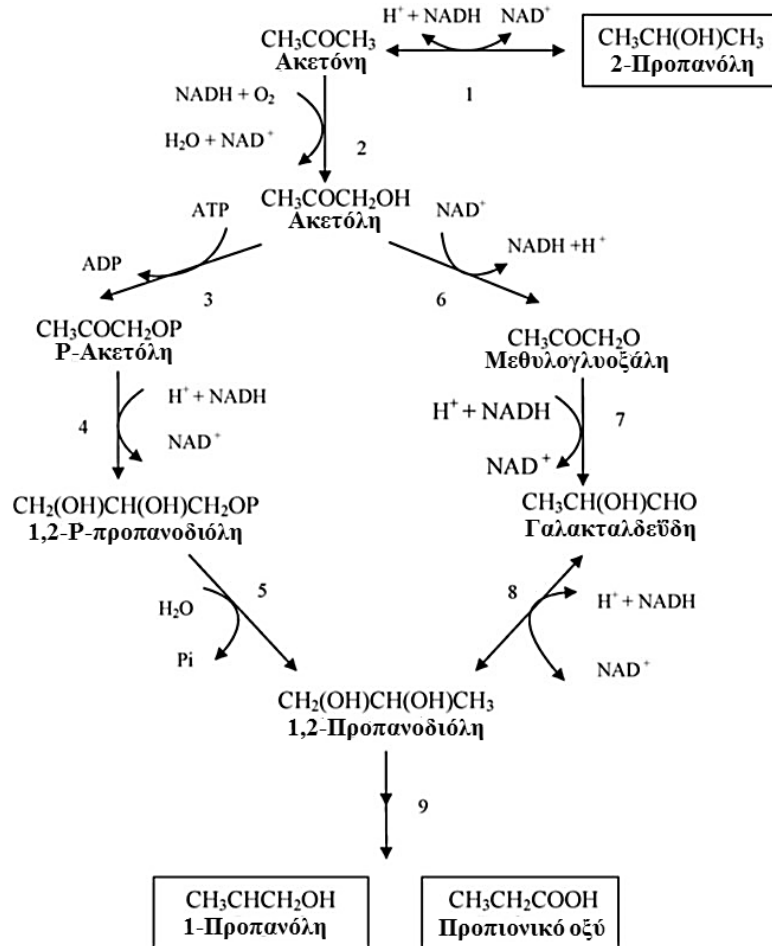
Ένα άλλο σημείο που πρέπει να υπογραμμιστεί είναι ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν είτε να παράγουν γλυκερόλη από γλυκόζη είτε να μετατρέπουν τη γλυκερόλη σε διάφορα προϊόντα μέσω των διαφορετικών οδών που αναφέρθηκαν. Η διαδικασία μετατροπής της γλυκόζης σε 1,3-προπανοδιόλη έχει επιτευχθεί σε μικτή καλλιέργεια χρησιμοποιώντας ζυμομύκητα για την παραγωγή γλυκερόλης και εντεροβακτηριοειδή για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Επομένως, μία μικτή και πολύπλοκη καλλιέργεια μικροβίων, όπως είναι το αποσυντεθειμένο πτώμα, θα μπορούσε να δημιουργήσει τα προϊόντα ζύμωσης της προπανοδιόλης (ιδιαίτερα 1-προπανόλη) με υπόστρωμα εκκίνησης γλυκόζη, μέρος της οποίας αρχικά ζυμώνεται σε γλυκερόλη. Αυτή η πιθανότητα θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει τη συσχέτιση της παραγωγής της 1-προπανόλης με τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης, καθώς και το γεγονός ότι τα επίπεδα 1-προπανόλης έχει αναφερθεί ότι είναι υψηλότερα από τα επίπεδα των υπόλοιπων ανώτερων αλκοολών (Boumba et al., 2008).

1.3.5 Τα λιπαρά οξέα ως μικροβιακά υποστρώματα

Ένας αριθμός αναερόβιων μικροοργανισμών όπως *Acinetobacter*, ψευδομονάδες, βάκιλοι και κολοβακτηρίδια μπορούν να αναπτυχθούν σε λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας, τα οποία συνήθως αποδομούνται με β-οξειδωση. Η αποδόμηση των λιπαρών οξέων μέσω αυτής της διαδικασίας έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ακετυλο-CoA από λιπαρά οξέα ζυγού αριθμού, ενώ τα λιπαρά οξέα μονού αριθμού καταλήγουν στον σχηματισμό ακετυλο-CoA και προπιονυλο-CoA (Gottschalk, 1986). Η μετατροπή του ακετυλο-CoA σε ακετόνη μέσω του σχηματισμού ακετοξικού από μικρόβια έχει περιγραφεί στο **Σχήμα 7**. Επιπλέον, στο ήπαρ θηλαστικών, το ακετυλο-CoA μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των λεγόμενων κετονοσωμάτων (ακετοξικό, d-3-υδροξυβουτυρικό και ακετόνη). Αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων ανευρίσκονται σε περιπτώσεις όπως η νηστεία, ο διαβήτης ή ο αλκοολισμός (Kalapos, 2003).

Η ακετόνη, η οποία είναι η πιο σημαντική και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις κετόνες, από βιολογική άποψη, είναι ένα προϊόν καθώς και ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης στις μεταβολικές οδούς τόσο των βακτηρίων όσο και των θηλαστικών (Kalapos, 2003).

Αναερόβια βακτήρια του γένους των κλωστριδίων παράγουν ακετόνη ως κύριο τελικό προϊόν ζύμωσης (Düffe, 1998). Ο μεταβολισμός της ακετόνης από μικρόβια χωρίζεται σε δύο διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, όπως περιγράφονται σχηματικά στο **Σχήμα 13**.



Σχήμα 13: Μεταβολισμός της ακετόνης από μικρόβια. 1: αλκοολική αφυδρογονάση, 2: μονοοξυγενάση της ακετόνης, 3: κινάση της ακετόλης, 4: 1,2-προπανοδιολ-1-φωσφοδεϋδρογονάση, 5: 1-φωσφογλυκερολική φωσφατάση, 6: μονοοξυγενάση της ακετόλης, 7: μεθυλογλυοξαλική αναγωγή, 8: γαλακταλδεϋδική αναγωγή, 9: ένζυμα και αντιδράσεις από 1,2-προπανοδιόλη στα τελικά προϊόντα, όπως στο **Σχήμα 12**.

Στο πρώτο μονοπάτι, η ακετόνη μεταβολίζεται σε ισοπροπανόλη από τη δευτεροταγή αλκοολική αφυδρογονάση σε ένα βήμα εξαρτώμενο από NAD^+ . Στο δεύτερο μονοπάτι, η ακετόνη μπορεί να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα για έναν αριθμό ποικίλων αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει δύο μηχανισμούς για τη μετατροπή της ακετόνης: μία εξαρτώμενη από οξυγόνο οξειδωση που καταλύεται από μονοοξυγενάση για την παραγωγή ακετόλης (υδροξυακετόνη) και/ή μία εξαρτώμενη από διοξείδιο του άνθρακα καρβοξυλίωση που καταλύεται από καρβοξυλάση για την

παραγωγή ακετοξικού (η αντίστροφη αντίδραση που σχηματίζει ακετόνη από ακετοξικό). Ο μηχανισμός της μετατροπής της ακετόνης μέσω της ακετόλης θα μπορούσε να οδηγήσει είτε στην 1,2-προπανοδιόλη με τελικά προϊόντα προπιονικό και 1-προπανόλη είτε στη μεθυλογλυοξάλη που μετατρέπεται σε γαλακταλδεΐδη και δίνει περαιτέρω 1,2-προπανοδιόλη (Kalapos, 2003).

Ο μεταβολισμός του προπιόνυλο-CoA μπορεί να ακολουθήσει αρκετές διαφορετικές διαδρομές. Έχει ήδη αναφερθεί η μετατροπή του σε προπιονικό (**Σχήμα 12**). Η *E. coli* και άλλα βακτήρια μπορούν να μετατρέψουν το προπιόνυλο-CoA σε πυροσταφυλικό, ενώ τα περισσότερα από αυτά το μετατρέπουν σε ηλεκτρικό-CoA, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Gottschalk, 1986).

1.3.6 Μικροβιακή παραγωγή άλλων πτητικών ενώσεων

Μεταξύ των ενώσεων που έχουν ανιχνευτεί κατά την ανάλυση της αιθανόλης σε μεταθανάτια περιστατικά περιλαμβάνονται διάφοροι αιθυλεστέρες που έχουν θεωρηθεί ως δείκτες προθανάτιας κατανάλωσης αιθανόλης (Refaai et al., 2002).

Οι εστέρες θα μπορούσαν, επίσης, να παραχθούν από τους μικροοργανισμούς που είναι παρόντες κατά τη σήψη. Ο μικροβιακός σχηματισμός των εστέρων μπορεί γενικά να προκύψει από την ενδοκυττάρια αντίδραση μεταξύ ενός λιπαρού ακυλ-συνένζυμου-A και μιας αλκοόλης που καταλύεται από μια αλκοολική ακυλοτρανσφεράση (ή συνθετάση εστέρα) (Gottschalk, 1986). Έχει αναφερθεί ότι ο κύριος παράγοντας που ελέγχει τη βιοσύνθεση των εστέρων είναι το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη δραστηριότητα της αλκοολικής ακυλοτρανσφεράσης (Lilly et al., 2000).

Συνοψίζοντας, στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται η αιθανόλη και οι ανώτερες αλκοόλες που θα μπορούσαν να παραχθούν από τα διάφορα διαθέσιμα υποστρώματα μεταθανάτια, κατά τη διάρκεια των διαφορετικών ζυμώσεων που πραγματοποιούνται, μαζί με τα είδη μικροβίων που μπορούν να ενεργοποιηθούν για την παραγωγή τους.

Πίνακας 2: Τα βιοχημικά μονοπάτια που ακολουθούνται από τα πιο κοινά είδη μικροβίων που ενεργοποιούνται μεταθανάτια για την παραγωγή αιθανόλης και ανώτερων αλκοολών.

Υπόστρωμα/Βιοχημικό μονοπάτι	Είδη μικροβίων	Αιθανόλη/ Ανώτερες Αλκοόλες
Γλυκόζη	Βακτήρια, κλωστρίδια, ζυμομύκητες	Αιθανόλη
Γλυκερόλη	Κλωστρίδια, βακτήρια, ζυμομύκητες	
Μίγμα οξέος και βουτανοδιόλης	Βακτήρια	
Ακετόνη (από πυροσταφυλικό, λιπαρά οξέα, γλυκερόλη)	Βακτήρια, κλωστρίδια,	1-Προπανόλη
Αμινοξέα	Βακτήρια, κλωστρίδια, ζυμομύκητες	
Γλυκερόλη	Βακτήρια, κλωστρίδια, ζυμομύκητες	
Βουτανόλη-ακετόνη και βουτυρικό οξύ	Κλωστρίδια, βακτήρια	1-Βουτανόλη
Γλυκερόλη	Κλωστρίδια, βακτήρια	
Αμινοξέα	Βακτήρια, κλωστρίδια, ζυμομύκητες	Ισοβουτανόλη
Αμινοξέα	Βακτήρια, κλωστρίδια, ζυμομύκητες	Αμυλική και ισοαμυλική αλκοόλη

1.4 Κατανομή της αιθανόλης στα μεταθανάτια βιολογικά υλικά

Οι σηπτικές εξεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα πτώματα μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης της αιθανόλης στα νεκροτομικά δείγματα και της πραγματικής συγκέντρωσης της αιθανόλης τη στιγμή του θανάτου. Για τον μεταθανάτιο προσδιορισμό της αιθανόλης, το βιολογικό υλικό που έχει καθοριστεί να χρησιμοποιείται είναι το αίμα, καθώς αντικατοπτρίζει καλύτερα την επίδραση της αιθανόλης στον εγκέφαλο, επειδή και τα δύο διαμερίσματα βρίσκονται σε ισορροπία, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της αιθανόλης στο αίμα να συσχετίζονται καλύτερα με την κατάσταση του ατόμου τη στιγμή του θανάτου.

Κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία του καταλληλότερου δείγματος αίματος ή του καταλληλότερου εναλλακτικού βιολογικού υλικού, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο αίμα. Επίσης, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία διαφορετικών βιολογικών υλικών στο ίδιο πτώμα, έτσι ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της προέλευσης της αιθανόλης. Πραγματοποιώντας ανάλυση σε πολλά βιολογικά δείγματα, η άτυπη κατανομή της αιθανόλης στα διάφορα διαμερίσματα του πτώματος θα μπορούσε να υποδεικνύει μεταθανάτιο σχηματισμό αιθανόλης (Corry, 1978; O'Neal & Poklis, 1996).

Ο προσδιορισμός διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης κατά την ανάλυση διαφορετικών ιστών και υγρών ενός πτώματος μπορεί να οφείλεται είτε στη μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης είτε στη μεταθανάτια ανακατανομή της αιθανόλης από τους διάφορους ιστούς στο αίμα. Η ανακατανομή μπορεί να προκληθεί από την μετά θάνατον διάχυση της αιθανόλης από το στομάχι (Pleuckhahn & Ballard, 1967), από τραυματικές κακώσεις (Winek et al., 1995), από αναρρόφηση γαστρικού περιεχομένου (Pélissier-Alicot et al., 2005; Pounder & Yonemitsu, 1991), από την εκτεταμένη πήξη του αίματος (Shepherd et al., 1992), καθώς και από μηχανικούς παράγοντες, όπως η μεταθανάτια κυκλοφορία του αίματος μέσω των αγγείων (Corry, 1978) και η μετακίνηση του πτώματος κατά την αυτοψία και τη μεταφορά του (Skopp, 2004).

Αν ο θάνατος του ατόμου επήλθε κατά τη φάση απορρόφησης της αιθανόλης, η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση της αιθανόλης σε διαφορετικούς ιστούς του πτώματος μπορεί να ποικίλλει (Briglia et al., 1992; Sylvester et al., 1998). Διαφορές έχουν καταγραφεί στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης μεταξύ του αρτηριακού και του φλεβικού αίματος ή μεταξύ του αίματος κεντρικών και περιφερικών αρτηριών (Jones et al., 1989; Levine &

Smialek, 2000; Martin et al., 1984; Sylvester et al., 1998). Αν το αίμα παραλήφθηκε από τον περικάρδιο σάκο ή από τις πλευρικές κοιλότητες είναι πολύ πιθανό να έχει αναμιχθεί με αιθανόλη που διαχύθηκε από το στομάχι (Plueckhahn & Ballard, 1967). Από την άλλη πλευρά, αν το δείγμα αίματος παραλήφθηκε από την άθικτη καρδιακή κοιλότητα ή την μηριαία αρτηρία τότε είναι απίθανο να έχει επιμολυνθεί με αιθανόλη από άλλη πηγή (Plueckhahn, 1967; Plueckhahn & Ballard, 1968).

1.4.1 Μεταθανάτια βιολογικά υλικά για τον προσδιορισμό της αιθανόλης

Τα βιολογικά δείγματα που είναι διαθέσιμα σε μεταθανάτια περιστατικά είναι πολυάριθμα και ποικίλα και μπορούν να επιλεγούν με βάση το ιστορικό της υπόθεσης, τα αιτήματα, τις νομικές πτυχές και τη διαθεσιμότητά τους. Γενικά, τα δείγματα που συλλέγονται συστηματικά κατά την αυτοψία-νεκροτομή περιλαμβάνουν υγρά, όπως αίμα από περιφερικά σημεία και την καρδιά, ούρα, υαλοειδές υγρό, χολή, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και γαστρικό περιεχόμενο και ιστούς οργάνων, όπως το ήπαρ (Skopp, 2004). Συγκεκριμένα, για την ανάλυση της αιθανόλης, τα πιο συνήθη και συνιστώμενα βιολογικά υγρά είναι το μηριαίο αίμα, το υαλοειδές υγρό και τα ούρα της ουροδόχου κύστης.

Σε περίπτωση θανάτου από υπερβολική δόση ή δηλητηρίαση, μπορεί να προκύψουν πρόσθετα ερωτήματα, όπως ο τρόπος χορήγησης, η μακροχρόνια ή πρόσφατη χρήση κ.λπ. Σε αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να συλλεχθούν πρόσθετα και εναλλακτικά δείγματα, όπως δείγματα τριχών, νυχιών ή δέρματος για να ολοκληρωθεί η τοξικολογική έρευνα. Σε περιστατικά που αφορούν αποσυντεθειμένες, σκελετωμένες ή ταριχευμένες σωρούς, η διαθεσιμότητα των δειγμάτων είναι περιορισμένη κι επομένως, οι περιπτώσεις αυτές αποτελούν πρόκληση για τον δικαστικό τοξικολόγο (Skopp, 2004).

Κάτω από βέλτιστες συνθήκες, η χρήση πολλαπλών δειγμάτων κατά τη νεκροψία-νεκροτομή από διάφορα διαμερίσματα και υποδιαμερίσματα του πτώματος βοηθά στην ακρίβεια ενός δεδομένου ποσοτικού αποτελέσματος και διευκολύνει τη βέλτιστη ερμηνεία του (Hunsaker et al., 2016).

1.4.1.1 Βιολογικά υγρά

1.4.1.1.1 Αίμα

Όπως προαναφέρθηκε, το ολικό αίμα αποτελεί το κατεξοχήν δείγμα επιλογής για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ερμηνεία των συγκεντρώσεων της αιθανόλης. Συνιστάται η συλλογή τουλάχιστον δύο δειγμάτων αίματος, ενός περιφερικού και ενός συμπληρωματικού κεντρικού, εάν το επιτρέπουν οι ειδικές περιπτώσεις. Για να αποφευχθούν οι δυσκολίες που προκύπτουν λόγω της μεταθανάτιας ανακατανομής, συνιστάται η συλλογή περιφερικού αίματος ως το βέλτιστο δείγμα, που λαμβάνεται από μία καθαρή βελόνα ευρείας οπής με μία νέα σύριγγα κατά προτίμηση από τη μηριαία φλέβα ή δευτερογενώς από την εξωτερική λαγόνια φλέβα ή υποκλείδια φλέβα (Hunsaker et al., 2016). Μετά από σοβαρό τραυματισμό, συνήθως δεν είναι διαθέσιμα δείγματα από καθορισμένα σημεία και το αίμα μπορεί να συλλεχθεί μόνο από τη θωρακική ή την κοιλιακή κοιλότητα (Skopp, 2004).

Η συλλογή αίματος από τον περικαρδιακό σάκο και το αιματηρό υγρό που ανακτάται από τις εξωαγγειακές κοιλότητες του σώματος, ειδικά σε τραύματα, είναι λιγότερο αξιόπιστα τοξικολογικά δείγματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αν δεν υπάρχει άλλη διαθέσιμη πηγή (Lemos, 2014). Το αιματηρό υγρό μπορεί να έχει είτε υψηλότερα είτε χαμηλότερα επίπεδα αιθανόλης από το κεντρικό ή περιφερικό αίμα και κατά συνέπεια μπορεί να καταστήσει αδύνατη την ερμηνεία της συγκέντρωσης αιθανόλης. Επίσης, αιματηρά υγρά από την επιφάνεια του σώματος ή το σκηνικό του εγκλήματος είναι αναξιόπιστα και ακατάλληλα για την τοξικολογική ανάλυση.

Καθώς η αιθανόλη κατανέμεται στα υδατικά διαμερίσματα του σώματος, είναι σημαντικό, πριν την έναρξη της σήψης, να λαμβάνεται υπόψη η περιεκτικότητα σε νερό του δείγματος αίματος για την ερμηνεία της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα. Για παράδειγμα, το δείγμα με χαμηλό αιματοκρίτη (όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων σε συνολικό όγκο αίματος) αποδίδει υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης, λόγω του μεγαλύτερου όγκου νερού. Σε περιπτώσεις σημαντικής υποογκαιμίας, είναι απαραίτητη η δειγματοληψία από άλλα διαμερίσματα (Hunsaker et al., 2016).

Η λήψη μεταθανάτιου δείγματος αίματος μέσω προκαρδιακής διαδερμικής περικαρδιοπαρακέντησης είναι εσφαλμένη και πρέπει να αποφεύγεται. Τα κεντρικά δείγματα αίματος λαμβάνονται άμεσα από την καρδιά ή τα μεγάλα αγγεία. Επίσης, η εξωτερική «τυφλή» παρακέντηση θώρακα δεν θεωρείται αποδεκτή διαδικασία και αποτελεί το χειρότερο δείγμα αίματος για επακόλουθη ανάλυση της αιθανόλης (Hanzlick, 2014).

Τα περισσότερα ιατροδικαστικά τοξικολογικά εργαστήρια αναλύουν μεταθανάτια δείγματα ολικού αίματος για τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Ωστόσο, συχνά καλούνται να αναλύσουν δείγματα ορού ή πλάσματος. Η χρήση ορού, πλάσματος ή ολικού αίματος για ανάλυση αιθανόλης δίνει ουσιαστικά ισοδύναμα αποτελέσματα για κλινικούς και ιατροδικαστικούς σκοπούς, εφόσον προσδιορίζεται σαφώς το δείγμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ορός ή το πλάσμα περιέχουν περίπου 10-20% περισσότερο νερό από έναν ίσο όγκο ολικού αίματος. Τα επίπεδα αιθανόλης είναι αντίστοιχα, αλλά μόνο ελαφρώς υψηλότερα σε αυτά τα δείγματα. Η μέσος λόγος αιθανόλης ολικού αίματος προς τον ορό ή το πλάσμα είναι περίπου 1:1,17, με αναφερόμενο εύρος 1,13-1,17. Οι ακόλουθες αναλογίες αιθανόλης λαμβάνονται για τη μετατροπή αυτών των συστατικών του αίματος σε ολικό αίμα: ορός = 1,12-1,17, πλάσμα = 1,10-1,35 (Hunsaker et al., 2016).

Τα σωληνάρια που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή και τη μεταφορά δειγμάτων αίματος στο εργαστήριο θα πρέπει να περιέχουν φθοριούχο νάτριο ή κάλιο ως συντηρητικό, τελικής συγκέντρωσης 1-2% w/v (**Σχήμα 14**) (Dinis-Oliveira, Vieira, & Magalhães, 2016). Τα ιόντα φθορίου λειτουργούν ως ενζυμικοί αναστολείς για την αποτροπή περαιτέρω παραγωγής αιθανόλης μεταξύ του χρόνου της αυτοψίας και της μεταφοράς στο εργαστήριο για ανάλυση.



Σχήμα 14: Σωληνάρια συλλογής αίματος Vacutainer® παρουσία συντηρητικού.

Όλοι οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή δειγμάτων κατά τη νεκροψία-νεκροτομή θα πρέπει να φέρουν επισήμανση με το είδος του υλικού, την ανατομική θέση προέλευσης, την ημερομηνία και την ώρα και σημαντικές λεπτομέρειες του περιστατικού, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας του θανόντος. Τα σωληνάρια με δείγματα αίματος που προορίζονται για τον προσδιορισμό πτητικών, όπως η αιθανόλη, θα πρέπει να έχουν μικρό χώρο αέρα για να ελαχιστοποιείται η εξάτμιση. Τέλος, οι περιέκτες θα πρέπει να είναι αεροστεγείς με ασφαλές σφράγισμα και να αποθηκεύονται στην ψύξη

στους 4°C. Η ασφαλής και προσεκτική φύλαξη των δειγμάτων είναι σημαντική, καθώς βοηθά στη διασφάλιση της ακεραιότητας των αποτελεσμάτων σε περίπτωση που τεθούν υπό αμφισβήτηση σε μεταγενέστερες δικαστικές διαδικασίες (Kugelberg & Jones, 2007).

1.4.1.1.2 Υαλοειδές υγρό

Το υαλοειδές υγρό (ΥΥ) αποτελεί ένα χρήσιμο δείγμα για τον προσδιορισμό της μεταθανάτιας αιθανόλης. Ο μηχανισμός μεταφοράς μικρών μορίων από το αίμα στα υγρά του οφθαλμού μελετήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1940 (Palm, 1946) και η πρώτη δημοσίευση που περιγράφει τη χρήση του ΥΥ για ανάλυση αιθανόλης χρονολογείται από το 1966 (Sturner & Coumbis, 1966). Το κύριο πλεονέκτημα του ΥΥ έναντι του αίματος, εκτός από την υδαρή φύση του, είναι ότι ανατομικά είναι απομακρυσμένο από το έντερο κι επομένως, λιγότερο επιρρεπές σε μόλυνση από την εξάπλωση βακτηρίων. Αυτό είναι σημαντικό εάν το πτώμα έχει υποστεί αποσύνθεση ή σοβαρό τραύμα (Harper, 1989). Η εύρεση αυξημένης συγκέντρωσης αιθανόλης στο ΥΥ αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο για την κατανάλωση αλκοόλ εν ζωή. Σε θανάτους που προκλήθηκαν από τραυματισμό, κατά την έναρξη της σήψης, η αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα σε συνδυασμό με μία πολύ χαμηλή ή αρνητική συγκέντρωση αιθανόλης στο ΥΥ μπορεί να υποδεικνύει ότι η αιθανόλη παράχθηκε στο αγγειακό σύστημα μετά τον θάνατο (Lin et al., 2020). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαφορές μεταξύ των οφθαλμών στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και άλλων βιοχημικών συστατικών είναι αρκετά μικρές (James et al., 1997; Mulla et al., 2005).

Το ΥΥ είναι ένα περιφερικό υλικό του ανθρώπινου σώματος, το οποίο παρουσιάζει καθυστέρηση τόσο στην απορρόφηση όσο και την απομάκρυνση της αιθανόλης σε σχέση με το αίμα. Επομένως, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα στη φάση απορρόφησης είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη στο ΥΥ. Στη φάση ισορροπίας, ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα προς τη συγκέντρωση στο ΥΥ είναι 1:1,05-1,34 λόγω της διαφοράς της περιεκτικότητάς τους σε νερό. Στη φάση της απέκκρισης, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο ΥΥ είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο αίμα. Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο ΥΥ είναι πολύ χρήσιμη για την εξαγωγή της πιθανής συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα τη στιγμή του θανάτου, όταν το ενδοαγγειακό αίμα ή άλλα σωματικά υγρά δεν είναι άμεσα διαθέσιμα (Hunsaker et al., 2016).

Το ΥΥ αναρροφάται ήπια από τους οφθαλμούς και αντικαθίσταται από κατάλληλη ποσότητα φυσιολογικού ορού. Η αιθανόλη και πολλά άλλα φάρμακα φαίνεται να είναι αρκετά σταθερά στο ΥΥ κατά τη διάρκεια παρατεταμένων περιόδων αποθήκευσης στους 4°C, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει φθοριούχο συντηρητικό (Dinis-Oliveira, Vieira, & Magalhães, 2016).

Η λήψη κατάλληλων δειγμάτων ΥΥ για τοξικολογική ανάλυση μπορεί να μην είναι εφικτή εάν το πτώμα είναι αισθητά αφυδατωμένο, αποτεφρωμένο ή αποσυντεθειμένο. Επιπλέον, το ΥΥ μπορεί να είναι ακατάλληλο για βιοχημική και τοξικολογική ανάλυση λόγω του μη φυσιολογικού ιξώδους ή της κυτταρικής του σύστασης ή εάν ο αποθανών έπασχε από κάποια ασθένεια των ματιών και είχε υποβληθεί σε οφθαλμικές επεμβάσεις (Parsons et al., 2003).

1.4.1.1.3 Ούρα

Τα ούρα είναι ένα δυνητικά αποδεκτό μέσο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα και για τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής φάσης κατά τη στιγμή της συλλογής του δείγματος (Biasotti & Valentine, 1985). Η δειγματοληψία των ούρων θα πρέπει να γίνεται απευθείας από την άθικτη κύστη, διεισδύοντας στο όργανο με αποστειρωμένη σύριγγα και βελόνα και να μεταφέρονται σε περιέκτη με φθοριούχο συντηρητικό (1-2%) πριν την ανάλυση αιθανόλης. Τα δείγματα θα πρέπει να διατηρούνται στο ψυγείο στους 4°C (Dinis-Oliveira, Vieira, & Magalhães, 2016).

Η τοξικολογική ανάλυση ούρων έχει γενικά μικρή ή καθόλου αξία από μόνη της για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα ενός ατόμου σε μία δεδομένη στιγμή. Στην αυτοψία, η συγκέντρωση αιθανόλης στα ούρα αντιπροσωπεύει το άθροισμα των διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης στο αίμα εν ζωή με την πάροδο του χρόνου, που περιλαμβάνει διάφορες φάσεις του μεταβολισμού της αιθανόλης (Jones & Holmgren, 2003). Από τα ούρα που συλλέγονται υπολογίζεται μια μέση συγκέντρωση αιθανόλης κατά τον χρόνο συλλογής. Η ποσοτικοποιημένη συγκέντρωση αιθανόλης στα ούρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόχειρες εκτιμήσεις της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα στο δεδομένο χρονικό πλαίσιο. Ο αναφερόμενος μέσος λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στα ούρα προς τη συγκέντρωση στο αίμα είναι 1:1,33, αλλά το πειραματικά προσδιοριζόμενο εύρος είναι μεγάλο, από 1:0,21 έως 1:2,17-2,44. Ο παραπάνω λόγος

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να οριοθετηθεί το στάδιο του μεταβολισμού στο οποίο βρίσκεται το άτομο τη στιγμή της συλλογής των δειγμάτων. Αν ο λόγος είναι <1 , υποδηλώνεται ατελής απορρόφηση αλκοόλ τη στιγμή του θανάτου, γεγονός που δείχνει σχετικά πρόσφατη κατανάλωση αλκοόλ που πιθανόν παρέμεινε μη απορροφημένο στο στομάχι. Αντιθέτως, αν ο λόγος είναι $>1,25$, υποδηλώνεται ότι η απορρόφηση και η κατανομή της αιθανόλης είχε ολοκληρωθεί μέχρι τη στιγμή του θανάτου (Jones & Holmgren, 2003).

Σε σύγκριση με τα δείγματα αίματος, ο κίνδυνος παραγωγής αιθανόλης στα ούρα μετά τον θάνατο είναι μικρότερος λόγω της έλλειψης υποστρώματος για ζύμωση. Η περιεκτικότητα σε γλυκόζη των ούρων που εκκρίνονται από υγιή άτομα είναι αμελητέα και η εξάπλωση των βακτηρίων μέσω του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης μετά τον θάνατο δεν είναι πολύ πιθανή, αν και ο αποθανών μπορεί να υπέφερε από ουρολοιμώξεις κατά τη διάρκεια της ζωής του (Fine, 1965). Ωστόσο, υπάρχει περίπτωση μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης στα ούρα εάν ο αποθανών έπασχε από διαβήτη κι επομένως, γλυκοζουρία.

1.4.1.1.4 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι ένα υδατικό και διαυγές ρευστό υλικό, λιγότερο εκτεθειμένο στην εισβολή και μόλυνση από βακτήρια λόγω του προστατευμένου περιβάλλοντός του μέσα στον εγκέφαλο και τη σπονδυλική στήλη (Skopp, 2004). Το ENY είναι ένα υλικό που χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά στην κλινική πράξη κι επομένως, είναι λιγότερο γνωστό και χαρακτηρισμένο. Ωστόσο, έχει τη δυνατότητα χρήσης ως υλικό για μεταθανάτιες τοξικολογικές αναλύσεις και είναι κατάλληλο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Wachholz et al., 2021).

Οι απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο ENY προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται μεταξύ 0,90 και 1,18 ανάλογα με τον χρόνο που έχει περάσει από την κατανάλωση του αλκοολούχου ποτού και την κινητική φάση του μεταβολισμού της αιθανόλης (Backer et al., 1980; Budd, 1982).

Ο προτιμώμενος τρόπος για τη συλλογή ENY μεταθανάτια είναι η υποϊνιακή παρακέντηση, καθώς υπάρχει σχετικά χαμηλός κίνδυνος μόλυνσης του δείγματος με αίμα. Το ENY μπορεί, επίσης, να ληφθεί από τις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου, μετά το άνοιγμα

της κρανιακής κοιλότητας. Εναλλακτικά, το ENY μπορεί να ληφθεί από τον νωτιαίο μυελό με οσφυονωτιαία παρακέντηση (Wachholz et al., 2021).

1.4.1.1.5 Χολή

Η χολή έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό υλικό για τον έμμεσο υπολογισμό της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα. Είναι λιγότερο ευαίσθητη σε μικροβιακή μόλυνση και στις διεργασίες αποσύνθεσης σε σύγκριση με το αίμα, λόγω του αλκαλικού pH και της ειδικής σύνθεσής της (Bévalot et al., 2016).

Η σύγκριση μεταξύ της συγκέντρωσης της αιθανόλης στη χολή και της αντίστοιχης συγκέντρωσης στο αίμα είναι ένας τρόπος να διακριθεί η προθανάτια κατανάλωση αλκοόλ από τη μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης. Σε σχετική μελέτη, ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στη χολή προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα υπολογίστηκε ότι είναι 0,99, με εύρος 0,48-2,04 (Backer et al., 1980). Η μεγάλη διακύμανση στην αναλογία των συγκεντρώσεων αιθανόλης δεν καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα από τη συγκέντρωση στη χολή σε θανάτους που σχετίζονται από με το αλκοόλ και ποινικές υποθέσεις.

Η ανίχνευση αιθανόλης στη χολή δεν είναι ιδανική μέθοδος για τον προσδιορισμό της προέλευσης της αιθανόλης, αλλά μπορεί να είναι αποτελεσματική σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, όταν η αιθανόλη είναι θετική στο αίμα αλλά αρνητική στη χολή, είναι πιθανό να έχει σχηματιστεί μεταθανάτια (Lin et al., 2020).

Δείγμα χολής λαμβάνεται από τη χοληδόχο κύστη είτε με αναρρόφηση του περιεχομένου της είτε, εάν είναι πολύ παχύρρευστο, με συμπίεση σε ένα δοχείο. Η δειγματοληψία της χολής είναι πιο περίπλοκη και η συγκέντρωση της αιθανόλης σε αυτή μπορεί να επηρεαστεί από την πεπτική κατάσταση τη στιγμή του θανάτου, από ηπατοχολικές νόσους κ.λπ. Ως εκ τούτου, η πρακτική χρησιμότητα της χολής ως δείγματος για ανάλυση είναι περιορισμένη (Lin et al., 2020; Skopp, 2004).

1.4.1.1.6 Γαστρικό περιεχόμενο

Η γαστρεντερική οδός είναι ένα σημαντικό διαμέρισμα για τη διερεύνηση της δηλητηρίασης. Το γαστρικό περιεχόμενο είναι ένα χρήσιμο υλικό, ειδικά όταν δεν υπάρχουν

διαθέσιμες πληροφορίες για το φάρμακο ή το δηλητήριο που χρησιμοποιήθηκε. Η συνολική ποσότητα ενός δηλητηρίου που παραμένει στο γαστρικό περιεχόμενο είναι γενικά πολύ πιο σημαντική από τη συγκέντρωσή του. Η εκτίμηση της ποσότητας του δηλητηρίου που υπάρχει στο γαστρικό περιεχόμενο είναι χρήσιμη για να καθοριστεί εάν πρόκειται για θεραπευτική δόση ή υπερδοσολογία πριν τον θάνατο. Χαμηλές συγκεντρώσεις δηλητηρίου στο στομάχι μπορεί να προκύψουν από παθητική διάχυση από το αίμα στο γαστρικό περιεχόμενο (Skopp, 2004).

1.4.1.2 Δείγματα ιστών

1.4.1.2.1 Ήπαρ

Στο ήπαρ, πολλές τοξικές ουσίες βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στο αίμα. Προτιμάται ως δείγμα όταν το αίμα δεν είναι διαθέσιμο, όπως λόγω αποσύνθεσης. Η ανάλυση ενός δείγματος ιστού ήπατος μπορεί να βοηθήσει στη διαφοροποίηση της οξείας υπερδοσολογίας από τη θεραπευτική χρήση φαρμάκων ή δηλητηρίων (Skopp, 2004).

Έχει αναφερθεί ότι ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο ήπαρ προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,47-0,85 (Christopoulos et al., 1973).

1.4.1.2.2 Εγκέφαλος

Ο εγκέφαλος είναι ένα χρήσιμο δείγμα για τον προσδιορισμό φαρμάκων, επειδή είναι η κύρια θέση δράσης τους. Η συγκέντρωση της αιθανόλης στον εγκέφαλο μεταθανάτια έχει παρουσιάσει διαφοροποιήσεις ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της. Οι απόλυτες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον εγκέφαλο προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται από 0,31 έως 8,0, γεγονός που δεν πρέπει να προκαλεί εντύπωση αν ληφθεί υπόψη η ανομοιογενής δομή του εγκεφάλου (Backer et al., 1980; Budd, 1982; Christopoulos et al., 1973; Skopp, 2004).

1.4.1.2.3 Νεφροί

Οι νεφροί μπορεί να είναι ένα χρήσιμο δείγμα για την ταυτοποίηση ενός φαρμάκου ή δηλητηρίου, καθώς οι περισσότεροι μεταβολίτες απεκκρίνονται στα ούρα μέσω των νεφρών. Ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στους νεφρούς προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 0,57-0,76 (Christopoulos et al., 1973; Skopp, 2004).

1.4.1.2.4 Μυελός των οστών

Ο μυελός των οστών είναι ένας ιστός καλά προστατευμένος από τα οστά και το λιπιδικό του υπόστρωμα μπορεί να λειτουργήσει ως αποθήκη φαρμάκων. Αποτελεί χρήσιμο δείγμα για την ανίχνευση ουσιών σε περιπτώσεις προχωρημένης σήψης, ακόμη και σκελετών (Christopoulos et al., 1973; Skopp, 2004).

Σε ζώα που έλαβαν αιθανόλη, διαπιστώθηκε μείωση της συγκέντρωσής της στον μυελό των οστών ανάλογα με τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης, ενώ παρατηρήθηκε μεταθανάτια σύνθεση αιθανόλης σε ζώα-μάρτυρες (Winek et al., 1983). Οι μέσες τιμές του λόγου της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον μυελό των οστών προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα έχει αναφερθεί ότι κυμαίνονται μεταξύ 0,34-0,79. Έχουν, όμως, σημειωθεί μεγάλες εξατομικευμένες αποκλίσεις στον λόγο, πιθανόν εξαιτίας της διαφορετικής περιεκτικότητας σε λίπος του μυελού των οστών από άνθρωπο σε άνθρωπο, με αποτέλεσμα η συσχέτιση της συγκέντρωσης της αιθανόλης του μυελού των οστών με αυτή του αίματος να μην μπορεί να είναι ασφαλής (Winek & Esposito, 1981; Winek & Jones, 1980).

1.4.1.2.5 Σκελετικός μυς

Ο σκελετικός μυς, ως μεταθανάτιο δείγμα για ανάλυση, έχει θεωρηθεί ικανοποιητικό βιολογικό υλικό, εναλλακτικό του αίματος. Υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες και επηρεάζεται λιγότερο από την αποσύνθεση των εσωτερικών οργάνων (Skopp, 2004). Ο λόγος της συγκέντρωσης της αιθανόλης στον σκελετικό μυ προς τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,89-0,91 (Nanikawa et al., 1982). Η αναλογία

αυτή εξαρτάται από τη χρονική διάρκεια απορρόφησης, της κατανομής και της απέκκρισης της αιθανόλης (Garriott, 1991).

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού αιθανόλης

Οι εργαστηριακές μέθοδοι για την ανάλυση της αιθανόλης σε βιολογικά δείγματα ταξινομούνται ως εξής: α. χημικές, β. βιοχημικές και γ. ενόργανες.

1.5.1 Χημικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονταν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης μέχρι το 1950 ήταν όλες χημικές. Στα στάδια των χημικών μεθόδων περιλαμβανόταν η παραλαβή, με απόσταξη ή εξάτμιση, των πτητικών συστατικών του δείγματος και στη συνέχεια ο προσδιορισμός των αναγωγικών συστατικών του αποστάγματος με τιτλοδότηση με μίγμα διχρωμικού καλίου/θεικού οξέος (Corry, 1978). Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η «μέθοδος Widmark», η οποία αναπτύχθηκε από τον E.M.P. Widmark, ενώ η τροποποιημένη από τον Cavett «μέθοδος Widmark» χρησιμοποιείται για την επαλήθευση της περιεκτικότητας αιθανόλης στο αίμα (Corry, 1978; Siegel & Saukko, 2012). Η μέθοδος αυτή παρέχει ικανοποιητική ακρίβεια και πιστότητα, στην περίπτωση που η αιθανόλη είναι το μόνο πτητικό αναγωγικό συστατικό στα εξεταζόμενα δείγματα. Εντούτοις, αν στο δείγμα υπάρχουν και άλλες πτητικές αναγωγικές ουσίες, όπως η ακεταλδεΐδη, η μεθανόλη και η ισοπροπανόλη, η μέθοδος δεν είναι ειδική και απαιτεί προηγούμενη επεξεργασία με πολύπλοκες διαδικασίες για την απομάκρυνση των άλλων πτητικών αναγωγικών ουσιών (Corry, 1978; Siegel & Saukko, 2012). Η χημική μέθοδος είναι ικανοποιητική για αναλύσεις ρουτίνας δειγμάτων αίματος ή ούρων κλινικών περιστατικών, εκτός από τις περιπτώσεις που κάποιος έχει εισπνεύσει ή καταπιεί μίγμα διαλυτών ή είναι διαβητικός, οπότε και αυξάνονται τα επίπεδα των κετονοσωμάτων στον οργανισμό του και κατά συνέπεια τα επίπεδα της ισοπροπανόλης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στη σωστή εφαρμογή της μεθόδου, στην καθαριότητα του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού και στην αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από διαλύτες (Corry, 1978).

Μεταθανάτια, στην περίπτωση σήψης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροοργανισμοί παράγουν όχι μόνο αιθανόλη, αλλά και άλλες πτητικές ουσίες που μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση αλκοόλης. Αυτές οι ουσίες είναι ενδεικτικές της σήψης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιβεβαίωση της διαδικασίας αποσύνθεσης. Οι χημικές μέθοδοι, όπως η τροποποιημένη μέθοδος Widmark, δεν είναι ικανές να διαχωρίζουν αυτές τις πτητικές

ουσίες από την αιθανόλη κι επομένως, είναι ακατάλληλες για την ταυτοποίηση της σήψης στο εκάστοτε βιολογικό υλικό (Siegel & Saukko, 2012).

1.5.2 Βιοχημική μέθοδος

Στις αρχές της δεκαετίας του '50 αναπτύχθηκε η ενζυμική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης στο αίμα και τα ούρα, που περιλάμβανε τη χρήση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και του νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD^+) και επέτρεπε έναν πιο εξειδικευμένο και ευαίσθητο προσδιορισμό των επιπέδων αιθανόλης, χωρίς προηγούμενη απόσταξη του δείγματος (Bonnichsen & Theorell, 1951). Το ένζυμο ADH οξειδώνει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη παρουσία του συνενζύμου NAD^+ , το οποίο ανάγεται σε NADH, που μετριέται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm (Moriya, 2004). Η ADH προέρχεται από ζύμες και αντιδρά επίσης, αλλά σε μικρότερο βαθμό με άλλες πρωτοταγείς αλκοόλες, όπως η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη. Η δραστηριότητα της ADH ελαττώνεται με την αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας των αλκοολών, ενώ η ταχύτητα της αντίδρασης οξείδωσης από την ADH στην περίπτωση της μεθανόλης είναι πολύ μικρή (Moriya, 2004). Η ενζυμική μέθοδος επηρεάζεται λιγότερο από πιθανή επιμόλυνση του δείγματος από ότι η χημική μέθοδος, όμως έχει τον περιορισμό ότι στα δείγματα δεν πρέπει να προστίθεται συντηρητικό που θα μπορούσε να μειώσει τη δραστηριότητα της ADH (Corry, 1978).

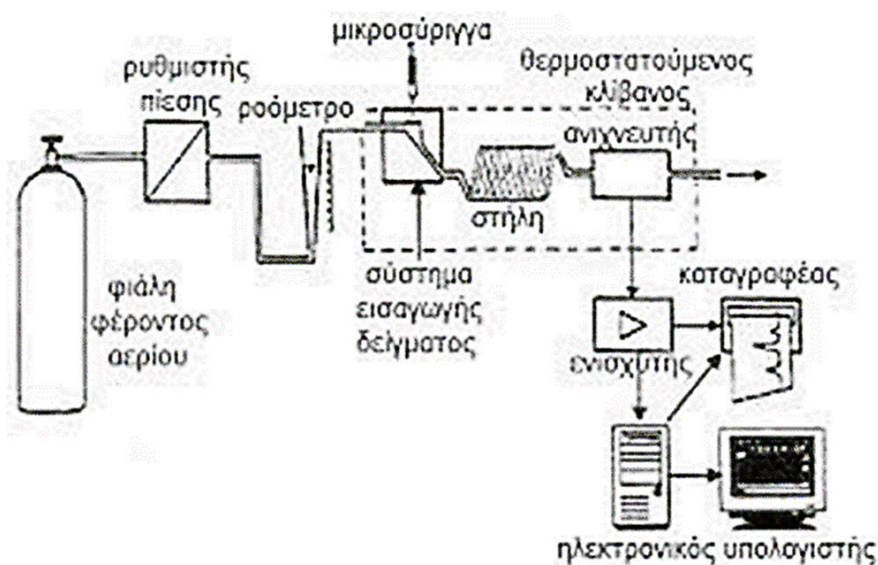
Η αυτοματοποιημένη ενζυμική μέθοδος είναι χρήσιμη για κλινικούς σκοπούς, επειδή ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων μπορεί να χειριστεί σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, σε ένα τοξικολογικό εργαστήριο δεν χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αιθανόλης σε βιολογικά δείγματα, επειδή δεν είναι ειδική (Moriya, 2004).

1.5.3 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία (GC) καθιερώθηκε ως η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών σε μεταθανάτια βιολογικά δείγματα στην ιατροδικαστική ανάλυση από το 1960 (Tagliaro et al., 1992). Παρόλο που ο εξοπλισμός της έχει υψηλό κόστος και απαιτεί συμπιεσμένα αέρια υψηλής καθαρότητας, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι σχετικά απλή, γρήγορη, με ακρίβεια και πιστότητα και

υψηλό βαθμό εξειδίκευσης. Η αέρια χρωματογραφία έχει το σαφές πλεονέκτημα ότι παρέχει μία ποιοτική ανάλυση διαλογής με βάση το χρόνο έκλυσης των ουσιών και τη ποσοτική ανάλυση με βάση την ένταση του σήματος που καταγράφεται από τον ανιχνευτή όπως αποτυπώνεται στο εμβαδόν της κορυφής ή στο ύψος της κορυφής στο προκύπτον χρωματογράφημα (Siegel & Saukko, 2012).

Στην αέρια χρωματογραφία ο διαχωρισμός των πτητικών συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ μιας στήλης (στατική φάση) και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). (Χατζηγιάννου & Κουμπάρης, 2005). Η βασική αρχή λειτουργίας της μεθόδου επεξηγείται στο **Σχήμα 15** και περιγράφεται στη συνέχεια.



Σχήμα 15: Σχηματικό διάγραμμα αερίου χρωματογράφου (Χατζηγιάννου & Κουμπάρης, 2005).

Ένα κλάσμα δείγματος εισάγεται και εξατμίζεται σε μια θερμαινόμενη θύρα έγχυσης και μεταφέρεται σε μια μακριά, λεπτή στήλη, συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, γυαλί ή ινώδες υλικό, μέσω ενός αδρανούς φέροντος αερίου όπως άζωτο ή ήλιο. Η στήλη είναι είτε πακεταρισμένη με προσροφητικό υλικό, είτε τριχοειδής με εσωτερική διάμετρο μικρότερη από 1 mm. Τα εσωτερικά τοιχώματα των τριχοειδών στηλών είναι επικαλυμμένα με μια προσροφητική μεμβράνη (Siegel & Saukko, 2012).

Ο διαχωρισμός και η κίνηση των συστατικών του δείγματος καθορίζονται από τον ρυθμό της ροής του φέροντος αερίου, τη θερμοκρασία της στήλης και τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Η ροή του φέροντος αερίου και η θερμοκρασία του κλίβανου μπορούν να ρυθμιστούν για να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος μεταξύ τους. Το προσροφητικό υλικό συγκρατεί τα πτητικά

συστατικά ανάλογα με τον βαθμό μοριακής έλξης κάθε συστατικού με το προσροφητικό υλικό. Ορισμένες ουσίες διατηρούνται στη στήλη για μικρότερους ή μεγαλύτερους χρόνους, επομένως εκκλούνται με καθορισμένη σειρά από την έναρξη της ανάλυσης, γνωστή ως χρόνος έκλυσης (Retention Time, RT), η οποία είναι η παράμετρος που χρησιμοποιείται για ποιοτική ανάλυση (Jones, 2019). Στις πακεταρισμένες στήλες, η διέλευση των συστατικών μπορεί να διαρκέσει περίπου από 15-20 λεπτά. Από την άλλη πλευρά, οι τριχοειδείς στήλες (**Σχήμα 16**) όχι μόνο επιτρέπουν την πιο γρήγορη διέλευση, αλλά έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία κι έχουν σαν αποτέλεσμα τον πιο ευδιάκριτο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος, γι' αυτό κι επιλέγονται κυρίως για τις αναλύσεις στο GC.



Σχήμα 16: Τριχοειδής στήλη σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας.

Μερικός ή πλήρης διαχωρισμός των πτητικών συστατικών πραγματοποιείται εντός της στήλης πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Το είδος ανιχνευτή που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλογός (FID), ο οποίος είναι μία φλόγα αέρα-υδρογόνου που καίγεται. Ιόντα και ηλεκτρόνια παράγονται μεταξύ μιας ανόδου και μιας καθόδου και το ρεύμα που ρέει όταν ενισχύεται μια συγκεκριμένη τάση δίνει σήματα που παρακολουθούνται και καταγράφονται ως μια σειρά από κορυφές που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα. Αν και το σήμα που παράγεται από τον ανιχνευτή είναι αναλογικό, οι ηλεκτρικοί παλμοί μπορούν να ψηφιοποιηθούν. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε έναν μετατροπέα από όπου οι ψηφιακοί παλμοί μπορούν να ποσοτικοποιηθούν. Μετρώντας τους παλμούς ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης αλκοόλης, μπορεί κανείς να συγκρίνει αυτόν τον αριθμό με τον αριθμό που παράγεται από ένα δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης αλκοόλης. Η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος μπορεί να υπολογιστεί από το γνωστό, αφού η απόκριση του ανιχνευτή είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση αλκοόλης. Ο FID είναι

ιδανικός για την ανάλυση μορίων με δεσμούς C-C ή C-H, έχει εξαιρετική γραμμικότητα σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και η ένταση του σήματος είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας στο δείγμα (Jones, 2019; Siegel & Saukko, 2012).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης, σε κάθε δείγμα που εγχέεται στη στήλη του GC προστίθεται εσωτερικό πρότυπο, ένα διάλυμα που περιέχει πτητική ένωση, και προκύπτει ένα διάλυμα αρκούντως αραιό, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του θορύβου στο υπόστρωμα που μπορεί να επηρεάσει τα αναλυτικά αποτελέσματα. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι πτητικό και να διαχωρίζεται πλήρως από την αλκοόλη που προσδιορίζεται. Ο λόγος των μετρήσεων μεταξύ του εσωτερικού προτύπου και της αλκοόλης είναι σταθερός ανεξάρτητα από τη διακύμανση των όγκων ανάμειξης ή του όγκου του αραιωμένου δείγματος που εγχέεται στη στήλη (Siegel & Saukko, 2012). Μεταξύ των ενώσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικά πρότυπα για αναλύσεις αιθανόλης σε τοξικολογικά εργαστήρια περιλαμβάνονται η 1-προπανόλη, η t-βουτανόλη, η βουτανόνη, η ισοβουτανόλη και το ακετονιτρίλιο. Η 1-προπανόλη έχει κριθεί ανεπαρκής ως εσωτερικό πρότυπο, διότι έχει ταυτοποιηθεί ως προϊόν σήψης σε μεταθανάτια βιολογικά υλικά. Το ίδιο ισχύει και για την ισοβουτανόλη, η οποία, επίσης, μπορεί να παραχθεί από μικρόβια. (Boumba et al., 2008; O'Neal & Poklis, 1996). Η χρήση της βουτανόνης ή της t-βουτανόλης έχει θεωρηθεί ασφαλέστερη επιλογή για εσωτερικό πρότυπο. Ωστόσο, η βουτανόνη έχει βρεθεί σε περιπτώσεις νεκροψίας (Caughlin, 1994), ενώ η παρουσία της t-βουτανόλης σε μεταθανάτια βιολογικά δείγματα είναι αμφιλεγόμενη (Canfield et al., 1993; Kuhlman et al., 1991; Mayes et al., 1992). Η χρήση του ακετυλονιτριλίου ως εσωτερικό πρότυπο στην ανάλυση αιθανόλης θεωρείται η καταλληλότερη επιλογή, καθώς δεν αποτελεί σε καμία περίπτωση προϊόν μικροβιακής δραστηριότητας. Επιπλέον, δεν έχει αναφερθεί ακόμη η ανίχνευσή του σε περιστατικά νεκροψίας, ούτε αποτελεί συστατικό οποιουδήποτε αλκοολούχου ποτού (Boumba et al., 2008).

Σε κάθε δείγμα προς ανάλυση αιθανόλης προστίθεται, επίσης, μικρή ποσότητα ανόργανου άλατος, όπως το χλωριούχο νάτριο, τοθειικό νάτριο ή τοθειικό αμμώνιο (Watts & McDonald, 1990). Η προσθήκη αυτή αυξάνει την τάση ατμών των μη ηλεκτρολυτών (π.χ. αιθανόλη) εντός του φιαλιδίου και ενισχύει την ευαισθησία της ανάλυσης.

Αν και η έγχυση κάθε δείγματος μπορεί να γίνει χειροκίνητα, είναι μία διαδικασία που απαιτεί κόπο και χρόνο. Ως εκ τούτου, η χειροκίνητη έγχυση του δείγματος έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από αυτόματα συστήματα δειγματοληψίας με επώαση δείγματος για σταθερή χρονική περίοδο (Headspace Sampling, HS). Κάθε τέτοιο σύστημα

εγκαθίσταται πάνω από τον αέριο χρωματογράφο και αυτόματα εξάγει ένα μικρό κλάσμα της αέριας φάσης του δείγματος (που βρίσκεται σε ισορροπία με την υγρή φάση του δείγματος) και το εγχέει στη στήλη. Τα πλεονεκτήματα της λήψης δείγματος από την αέρια φάση είναι ότι οι στήλες δεν αλλοιώνονται γρήγορα, τα συστήματα έγχυσης δεν φράζουν και μπορούν να πραγματοποιηθούν πάρα πολλές εγχύσεις στην ίδια στήλη, χωρίς τον κίνδυνο επιμόλυνσης ή αποσύνθεσης της στερεής φάσης της στήλης από τα υπολείμματα διαφόρων βιολογικών μορίων του δείγματος, κυρίως όταν αυτά προέρχονται από πτώματα σε σήψη. Για αξιόπιστες αναλύσεις θα πρέπει τα αραιωμένα δείγματα να επωάζονται σε σφραγισμένα φιαλίδια με μεγάλο υπερκείμενο χώρο σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες. Αυτή η περίοδος επώασης επιτρέπει την πλήρη ισορροπία μεταξύ αέριας και υγρής φάσης του δείγματος (Siegel & Saukko, 2012).

1.5.4 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

Μια πιο πρόσφατη μέθοδος προσδιορισμού της αιθανόλης συνδυάζει την αέρια χρωματογραφία για τον διαχωρισμό των πτητικών συστατικών με τη φασματομετρία μάζας για την ανίχνευσή τους (GC-MS). Η ταυτοποίηση της αιθανόλης γίνεται από τα θραύσματα της μάζας της m/z 31 (βασική κορυφή), m/z 46 (μοριακό ιόν) και m/z 45 (μοριακό ιόν -1) (Siegel & Saukko, 2012).

Η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας παρότι είναι πολύ ευαίσθητη και παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια δε χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της αιθανόλης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης, καθώς και των άλλων πτητικών ουσιών, αποτελεί από αναλυτικής άποψης απλή διαδικασία για την οποία η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή FID θεωρείται επαρκής.

1.6 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί συνέχεια προηγούμενων ερευνητικών εργασιών της επιβλέπουσας, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μπούμπα Βασιλικής. Σε αυτές τις μελέτες προτάθηκε η διαμόρφωση μαθηματικών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε αυστηρά αναερόβιες καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, και *Clostridium sporogenes* και σε αερόβιες/αναερόβιες καλλιέργειες του βακτηρίου *Escherichia coli* στους 25°C σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη (άθροισμα d-αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης). Ακόμη αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα για τον υπολογισμό της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε συνάρτηση με τις προαναφερόμενες αλκοόλες σε καλλιέργειες του βακτηρίου *E. coli*, αρχικά αερόβιες και στη συνέχεια αναερόβιες, επίσης στους 25°C.

Σε συνέχεια των προαναφερόμενων εργασιών πραγματοποιήθηκαν υγρές αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες καλλιέργειες, χωριστά, των βακτηριακών στελεχών *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* και του μύκητα *Candida albicans* σε διάφορες θερμοκρασίες (37°C, 25°C και 4°C), με διαφορετικά καλλιεργητικά υλικά (Brain Heart Infusion, BHI (με ή χωρίς προσθήκη επιπλέον γλυκόζης) και Sabouraud Dextrose Broth, SDB), καθώς και αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες καλλιέργειες των ανωτέρω μικροβίων, χωριστά, σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C, σε όξινες ή ουδέτερες συνθήκες pH, με ή χωρίς προσθήκη επιπλέον γλυκόζης.

Στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν:

(α) Η μελέτη των τοξικολογικών δεικτών που χαρακτηρίζουν την μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης στις προαναφερόμενες μικροβιακές καλλιέργειες στις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης.

- i) Η καταγραφή και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανώτερων αλκοολών (δείκτες) που χαρακτηρίζουν την μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης στις διαφορετικές μικροβιακές καλλιέργειες, καθώς και λοιπών πτητικών συστατικών.
- ii) Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των δεδομένων για κάθε μικροβιακή καλλιέργεια και η εξαγωγή των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων (δεικτών).

iii) Η κατασκευή μαθηματικών μοντέλων υπολογισμού της συγκέντρωσης της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε συνάρτηση με τους σημαντικούς τοξικολογικούς δείκτες κάθε μικροβιακής καλλιέργειας στους 25°C.

(β) Ο έλεγχος της εφαρμοσιμότητας των μοντέλων στις μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C (θετικά δείγματα ελέγχου), στις μικροβιακές καλλιέργειες μετουσιωμένου ανθρώπινου φυσιολογικού αίματος και σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών για τα οποία υπάρχει η υποψία μεταθανάτιας παραγωγής αιθανόλης.

i) Ο ποσοτικός προσδιορισμός των καθορισθέντων τοξικολογικών δεικτών στα βιολογικά υλικά από περιστατικά νεκροτομών.

ii) Η εφαρμογή των εξαχθέντων μαθηματικών μοντέλων και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με βάση το ιστορικό των περιστατικών.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

2.1.1 Αναλύτες και διαλύματα αυτών

Σε αυτή την ερευνητική εργασία μελετήθηκαν σε μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό οι παρακάτω αλκοόλες, οι οποίες θεωρήθηκαν τοξικολογικοί δείκτες μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης:

- i. Αιθανόλη καθαρότητας 15% v/v της εταιρίας LGC Standards Ltd. (Middlesex, UK)
- ii. 1-Προπανόλη της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
- iii. Ισοβουτανόλη της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
- iv. 1-Βουτανόλη της εταιρίας Carlo Erba (Barcelona, Spain)
- v. 3-Μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη) της εταιρίας Fluka (Munich, Germany)
- vi. 2-Μεθυλο-1-βουτανόλη (αμυλική αλκοόλη) της εταιρίας Fluka (Munich, Germany)

Επιπλέον, δευτερευόντως, προσδιορίστηκαν οι παρακάτω πτητικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν εξίσου να ανιχνευθούν σε μικροβιακές καλλιέργειες και νεκροτομικό υλικό:

- i. Μεθανόλη της εταιρίας Panreac (Barcelona, Spain)
- ii. 2-Προπανόλη της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
- iii. Ακεταλδεΐδη της εταιρίας Fluka (Munich, Germany)
- iv. Ακετόνη της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
- v. Οξικός αιθυλεστέρας της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

Για τον προσδιορισμό των πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία ως εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, I.S.) επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Για την αιθανόλη παρασκευάστηκε πρότυπο υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 4,00% w/v. Τα πρότυπα υδατικά διαλύματα της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης, της ισοαμυλικής και αμυλικής αλκοόλης παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 0,10% w/v. Τα πρότυπα υδατικά διαλύματα της μεθανόλης, της 2-προπανόλης, της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα παρασκευάστηκαν σε

συγκέντρωση 1,00% w/v. Το διάλυμα ακετονιτριλίου (εσωτερικό πρότυπο) παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 100 mg/mL. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι και έξι μήνες.

Όλα τα υδατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με χρήση δις απεσταγμένου νερού (Double Distilled Water, DDW), που αποστάχθηκε με την αυτόματη αποστακτική συσκευή τύπου Aquatron A400D (Bibby Sterilin, Staffordshire, UK).

Η ομογενοποίηση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με ομογενοποιητή Polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland).

Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών μέτρησης της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης, της ισοαμυλικής και αμυλικής αλκοόλης, της μεθανόλης, της 2-προπανόλης, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ακεταλδεϋδης χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός (0,90% w/v NaCl της DEMO ABEE, Βιομηχανία Φαρμάκων).

Από τα μεταθανάτια βιολογικά υλικά που ελήφθησαν κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής, το αίμα συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια αιμοληψίας (BD Vacutainer®, New Jersey, USA), τα ούρα και το ENY σε πλαστικά σωληνάρια κωνικού πυθμένα με βιδωτό πώμα και τέλος, το YY σε σωληνάρια Eppendorf των 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Τα βιολογικά υλικά αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

2.1.2 Ενόργανη διάταξη

Η αέρια χρωματογραφία (GC) πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο τύπου Shimadzu GC 17A (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA) (**Σχήμα 17**). Ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων πτητικών ουσιών πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές στήλες:

- i. Την τριχοειδή στήλη, υψηλής πολικότητας, επικαλυμμένη με πυρίτιο, τύπου SUPELCOWAX^{TM-10}, μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και διαμέτρου των σωματιδίων επικάλυψης 0,25 μm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA). Η

θερμοστάτηση της στήλης έγινε στους 60°C και το θερμοκρασιακό της πρόγραμμα ήταν συνολικής διάρκειας 20 min.

- ii. Την τριχοειδή στήλη, υψηλής πολικότητας, επικαλυμμένη με πυρίτιο, τύπου VOCOL™, μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και διαμέτρου των σωματιδίων επικάλυψης 1,50 μm (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης ήταν συνολικής διάρκειας 18,5 min. Στην αρχή της ανάλυσης, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 55°C και παρέμεινε για 5 min. Έπειτα, η θερμοκρασία αυξήθηκε με ρυθμό 7°C/min έως τους 85°C και τέλος, επανήλθε σταδιακά στους 55°C.

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή ιονισμού φλογός (Flame Ionization Detector, FID). Ο χρωματογράφος περιλάμβανε σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη από την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος τύπου AOC-5000 (Headspace-GC injection system) (Shimadzu Scientific Instruments, Inc. Columbia, MD, USA) (**Σχήμα 17**) που πραγματοποιούσε αυτόματα την επώαση του δείγματος, τη δειγματοληψία κλάσματος της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και την έγχυση (injection) του κλάσματος στη στήλη. Η θερμοστάτηση του τμήματος έγχυσης του δείγματος (injector) και του ανιχνευτή (detector) έγινε στους 105°C και 260°C, αντίστοιχα. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο με ροή 0,7 mL/min. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή η πίεση του αέρα, του υδρογόνου και του αζώτου ήταν 50 kPa, 55 kPa και 75 kPa, αντίστοιχα.

Για την ανάλυση των δειγμάτων στον αέριο χρωματογράφο χρησιμοποιήθηκαν ειδικά γυάλινα φιαλίδια χρωματογράφου των 10 mL (Chromacol LTD, Trumbull, USA), τα οποία πωματίζονταν αεροστεγώς με πώματα που αποτελούνταν από επιφάνεια σιλικόνης και καπάκι αλουμινίου (Chromacol LTD, Trumbull, USA).



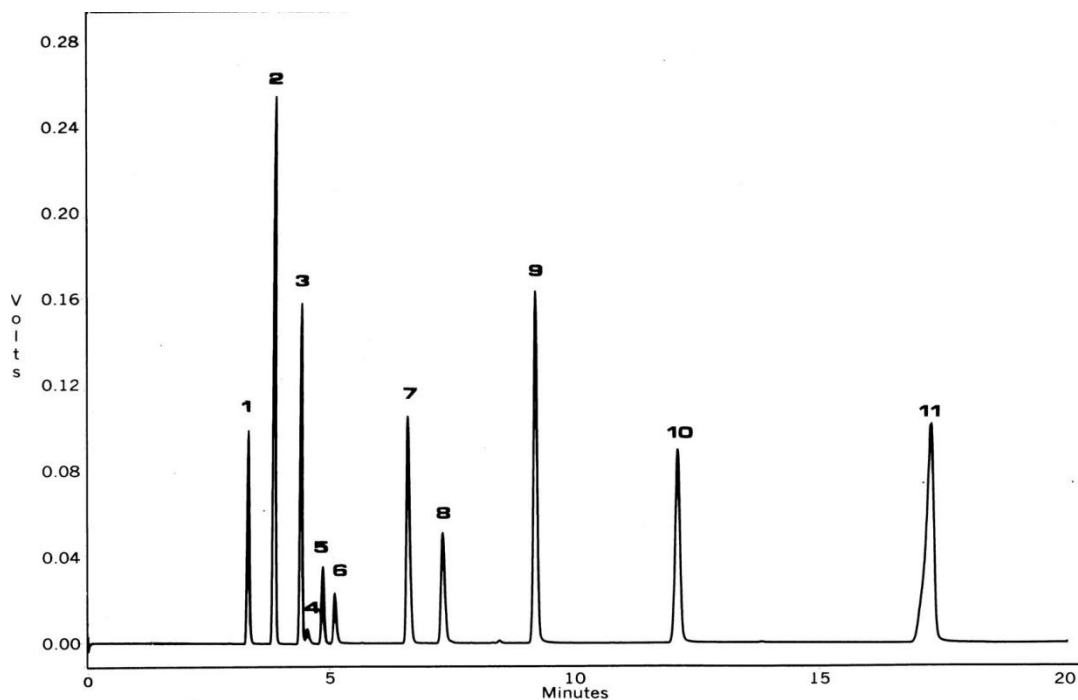
Σχήμα 17: Αέριος χρωματογράφος τύπου Shimadzu GC 17A με σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη τύπου AOC-5000.

2.1.3 Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία

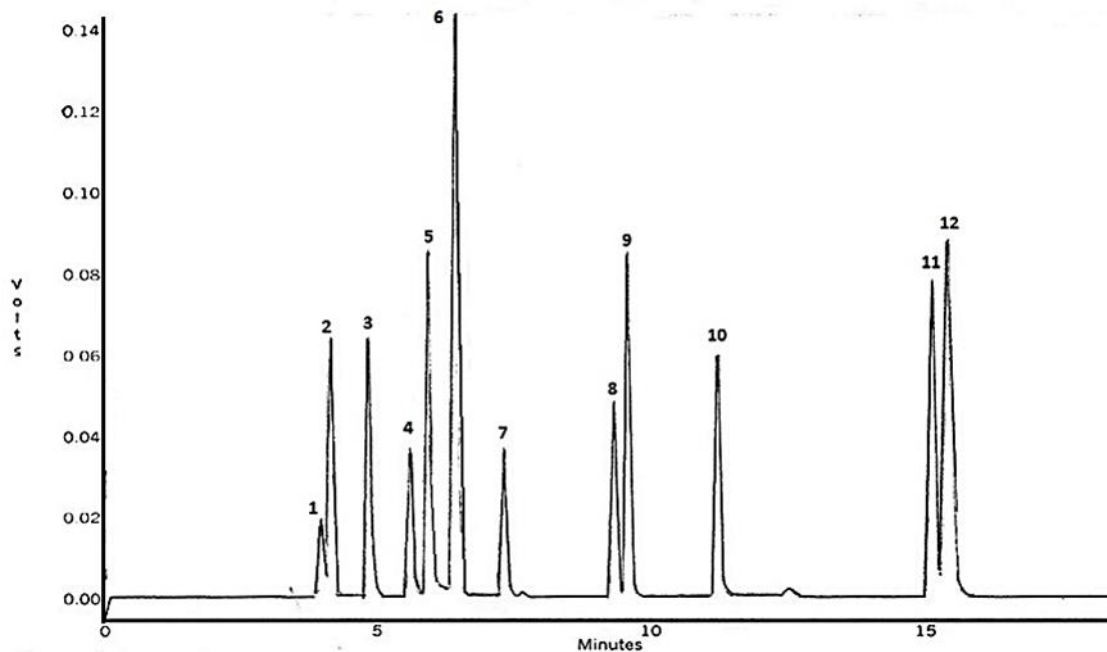
Για την αέρια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό πτητικών ουσιών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: στα φιαλίδια Chromacol (10 mL) προστέθηκαν 0,5 g θειικού αμμωνίου (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) μαζί με 0,5 mL του διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Το θειικό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, προκαλώντας την περαιτέρω εξάτμιση των πτητικών ουσιών στην υπερκείμενη φάση. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια πωματίστηκαν ερμητικά με πώματα σιλικόνης και μεταφέρθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη του χρωματογράφου για ανάλυση. Τα φιαλίδια επώαστηκαν για 7,5 min στον επωαστικό θάλαμο στους 50°C, υπό ανάδευση. Ακολούθησε αυτόματη δειγματοληψία 500 μ L της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και ένεση στη στήλη του χρωματογράφου.

2.1.4 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ουσιών

Κατά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός, η ανίχνευση και ο ποιοτικός προσδιορισμός των παρακάτω πτητικών ουσιών: αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 1-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), ισοβουτανόλη ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH}$), 1-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3-μεθυλο-1-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2-μεθυλο-1-βουτανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$), μεθανόλη (CH_3OH), 2-προπανόλη ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), ακεταλδεΐδη (CH_3CHO), ακετόνη (CH_3COCH_3), οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) και ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Στα **Σχήματα 18** και **19** παρουσιάζονται δύο πρότυπα χρωματογραφήματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες **SUPELCOWAX^{TM-10}** και **VOCOLTM**, αντίστοιχα, όπου εμφανίζονται όλες οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν. Οι ουσίες προσδιορίστηκαν με βάση τους χρόνους έκλουσης και τη χρήση των αντίστοιχων προτύπων ουσιών.



Σχήμα 18: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος αναλυτών, χρησιμοποιώντας τη στήλη **SUPELCOWAX**: (1) ακεταλδεΐδη, 50 mg/dL, (2) ακετόνη, 50 mg/dL, (3) οξικός αιθυλεστέρας, 15 mg/dL, (4) μεθανόλη, 50 mg/dL, (5) 2-προπανόλη, 25 mg/dL, (6) αιθανόλη, 50 mg/dL, (7) ακετονιτρίλιο (I.S.), 100 mg/dL, (8) 1-προπανόλη, 50 mg/dL, (9) ισοβουτανόλη, 50 mg/dL, (10) 1-βουτανόλη, 50 mg/dL, (11) 3-μεθυλο-1-βουτανόλη και/ή 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, 50 mg/dL.



Σχήμα 19: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος αναλυτών, χρησιμοποιώντας τη στήλη VOCOL: (1) μεθανόλη, 50 mg/dL, (2) ακεταλδεΐδη, 50 mg/dL, (3) αιθανόλη, 50 mg/dL, (4) 2-προπανόλη, 25 mg/dL, (5) ακετόνη, 50 mg/dL, (6) ακετονιτρίλιο (I.S.), 100 mg/dL, (7) 1-προπανόλη, 50 mg/dL, (8) οξικός αιθυλεστέρας, 50 mg/dL, (9) ισοβουτανόλη, 50 mg/dL, (10) 1-βουτανόλη, 50 mg/dL, (11) 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 50 mg/dL, (12) 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, 50 mg/dL.

2.1.5 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας

Με σκοπό την επαλήθευση της καταλληλότητας και της απόδοσης της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό πτητικών ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε επικύρωση αυτής. Τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν:

A. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η εκλεκτικότητα χαρακτηρίζει τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου για την ανάλυση ενός συστατικού παρουσία άλλων. Μια μέθοδος είναι πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Χατζηγιάννου και Κουμπάρης, 2005). Η εκλεκτικότητα επιτεύχθηκε αναλύοντας έξι διαφορετικά τυφλά (blank) δείγματα και αξιολογήθηκε η επίδραση του υποστρώματος στο αναλυτικό σήμα.

B. Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Η ανιχνευσιμότητα υποδηλώνει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει/ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ). Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, ενώ ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια και πιστότητα. Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα (θόρυβο) του υποστρώματος. Τα LODs και LOQs στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 ($S/N=3$) και 10 ($S/N=10$), αντίστοιχα (Κουμπάρης, 2015).

Γ. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα εξετάστηκε σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (working range) της αναλυτικής μεθόδου για κάθε πτητική ουσία με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα (εμβαδό χρωματογραφικής κορυφής) ως προς τη συγκέντρωση του κάθε αναλύτη. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σε 6-8 επίπεδα συγκέντρωσης με τρεις επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο. Η αξιολόγηση έγινε με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων), υπολογίζοντας για κάθε αναλύτη την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης και τον συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, R^2) (Κουμπάρης, 2015).

Δ. Ακρίβεια (Accuracy)-Πιστότητα (Precision)

Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, bias) μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της αληθινής τιμής (μ). Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται από τυχαία (random errors) ή/και συστηματικά σφάλματα (bias) (Κουμπάρης, 2015).

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου και μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των μετρήσεων όταν η ανάλυση επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές (Κουμπάρης, 2015).

Η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα (within a day/intra-day precision) και μεταξύ ημερών αναπαραγωγιμότητα (between days/inter-day precision) αποτελούν μέτρα πιστότητας που εκφράζονται ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation - RDS%).

Η ακρίβεια και η πιστότητα της μεθόδου αξιολογήθηκαν αναλύοντας τρία δείγματα ελέγχου, ένα στη χαμηλότερη συγκέντρωση, ένα στην υψηλότερη κι ένα εντός του εύρος των συγκεντρώσεων κάθε αναλυόμενης ουσίας.

2.2 Μικροβιακές καλλιέργειες

2.2.1 Μικροβιακά στελέχη

Σε αυτή την ερευνητική εργασία επιλέχθηκαν και εξετάστηκαν πρότυπα στελέχη από τον μη κερδοσκοπικό οργανισμό American Type Culture Collection (ATCC): τρία βακτήρια (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus faecalis*) και ένας μύκητας (*Candida albicans*) για την μελέτη παραγωγής αιθανόλης, ανώτερων αλκοολών και άλλων πτητικών ουσιών.

***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο, μέλος της οικογένειας των εντεροβακτηριδίων. Έχει ραβδοειδές σχήμα και μέγεθος 2 μm επί 0.5 μm. Χαρακτηρίζεται από βλενώδη ανάπτυξη των αποικιών με τάση να συνενώνονται μετά από παρατεταμένη επώαση, από παχύ πολυσακχαριδικό έλυτρο κι από έλλειψη κινητικότητας. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα, του δέρματος και του στόματος. Ως παθογόνο μικρόβιο του αναπνευστικού, συναντάται συνήθως ως αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του αναπνευστικού και των ουροφόρων οδών. Ευθύνεται για μικρό ποσοστό της βακτηριακής πνευμονίας, προκαλώντας εκτεταμένη αιμορραγική νεκρωτική πύκνωση του πνεύμονα, η οποία, εάν δε θεραπευτεί, παρουσιάζει υψηλή θνησιμότητα (Ryan & Ray, 2004; Brooks *et al.*, 2013).

Η *K. pneumoniae* μεταβολίζει υδατάνθρακες, κυρίως λακτόζη, για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και διάφορων άλλων τελικών προϊόντων. Ένα μεταβολικό προϊόν της είναι η 1,3-προπανοδιόλη, η οποία δημιουργείται με αναερόβια ζύμωση (ζύμωση δύο σταδίων από γλυκόζη σε γλυκερόλη σε 1,3-προπανοδιόλη) ή ήπια αερόβια ζύμωση. Η δέσμευση του αζώτου είναι μοναδικό χαρακτηριστικό της. Απουσία οξυγόνου μπορεί να προσλάβει το άζωτο της ατμόσφαιρας και να το ανάγει σε αμμωνία και αμινοξέα (Brooks *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2002).

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Ο *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος) είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, θετικό κατά Gram βακτήριο, που σημαίνει ότι το κυτταρικό του τοίχωμα αποτελείται από ένα πολύ παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Σχηματίζει σφαιρικές αποικίες, μεγέθους 0,5 έως 1 μm, σε συστάδες (όπως ένα τσαμπί από σταφύλι) κίτρινου χρώματος, στο οποίο οφείλει το όνομά του. Χαρακτηρίζεται από έλλειψη κινητικότητας και δεν παράγει σπόρους. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου. Επίσης, βρίσκεται συνήθως στον αέρα και το περιβάλλον. Σε παθογόνες καταστάσεις μπορεί να προκαλέσει διαπύηση, σχηματισμό αποστημάτων, διάφορες πυογόνες φλεγμονές, ακόμη και θανατηφόρα σηψαιμία (Brooks et al., 2013; Ryan & Ray, 2004).

Ο *S. aureus* μπορεί να προσλάβει μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών όπως γλυκόζη, μααννόζη, μαννιτόλη, γλυκοζαμίνη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη, σακχαρόζη, λακτόζη, γαλακτόζη και βητα-γλυκοζίτες. Οι κεντρικοί οδοί του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι η οδός Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) και ο κύκλος της φωσφορικής πεντόζης. Το γαλακτικό οξύ είναι το κύριο τελικό προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης και το οξικό οξύ και το CO₂ είναι τα προϊόντα των συνθηκών της αερόβιας ανάπτυξης (Brooks et al., 2013; Ryan & Ray, 2004).

***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

Ο *Enterococcus faecalis* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, θετικό κατά Gram βακτήριο της οικογένειας των εντερόκοκκων. Υπάρχουν τρία συστατικά που συνθέτουν το κυτταρικό του τοίχωμα. Το 40% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από έναν πολυσακχαρίτη που περιέχει ραμνόζη και ένα τείχοϊκό οξύ που περιέχει ριβιτόλη. Είναι δυνητικά αναερόβιος μικροοργανισμός και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας. Βρίσκεται, επίσης, στο έδαφος, τα φυτά και το νερό. Ο *E. faecalis* προκαλεί την πλειονότητα των ανθρώπινων εντεροκοκκικών λοιμώξεων. Αυτές οι λοιμώξεις μπορεί να είναι τοπικές ή συστηματικές και περιλαμβάνουν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και της κοιλιάς, λοιμώξεις τραυμάτων, βακτηριαιμία και ενδοκαρδίτιδα (Ryan & Ray, 2004; Tendolkar, Baghdayan & Shankar, 2003).

Ο *E. faecalis* μπορεί να καταβολίσει ένα ευρύ φάσμα πηγών ενέργειας, από υδατάνθρακες, γλυκερόλη, γαλακτικό, μηλικό, κιτρικό, διαμινοξέα και πολλά α-κετοξέα. Για το λόγο αυτό μπορεί να ζήσει σε διαφορετικά περιβάλλοντα, ειδικά στο έντερο όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι περιορισμένα. Στο έντερο, ο *E. faecalis* αντλεί το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς του από τη ζύμωση των μη απορροφημένων σακχάρων. Χρησιμοποιεί ένα σύστημα φωσφοενολοπυροσταφυλικής φωσφοτρανσφεράσης για να ανιχνεύει τους υδατάνθρακες έξω από το κύτταρο και συνδυάζει την πρόσληψη υδατανθράκων με φωσφορυλίωση. Οι υδατάνθρακες που μεταβολίζονται από τον *E. faecalis* περιλαμβάνουν d-γλυκόζη, d-φρουκτόζη, λακτόζη και μαλτόζη. Μπορεί, επίσης, να μεταβολίσει τη γλυκερόλη υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Ramsey et al., 2014; Stuart et al., 2006).

***Candida albicans* ATCC 10231**

Η *Candida albicans* είναι ένας δυνητικά αναερόβιος θετικός κατά Gram, διπλοειδής, πολυμορφικός μύκητας, που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί τόσο με μονοκυτταρική μορφή (ζυμομύκητας) όσο και με πολυκυτταρική μορφή (νηματοειδή κύτταρα). Στη μορφή ζυμομύκητα, που απαντάται συχνότερα, τα κύτταρά της είναι στρογγυλά ή ωοειδή μεγέθους 4-6 μm. Καθώς αποκτά την πολυκυτταρική μορφή της δημιουργεί ένα βιοφίλμ, το οποίο αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, αλλά περιέχει, επίσης, πολυνουκλεοτίδια, πολυπεπτίδια και φιμπρινογίνη. Η μορφή που παίρνει εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως τις αλλαγές της θερμοκρασίας και του pH. Αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, των βλεννογόνων και του γαστρεντερικού σωλήνα. Η καντιντίαση είναι η πιο διαδεδομένη, συστηματική μυκητίαση κι ένας από τους παράγοντες που την προκαλεί είναι η *C. albicans*. Εμφανίζεται σε εντοπισμένες (ως ερύθημα σε δερματικές πτυχές ή σε επιφάνειες του βλεννογόνου) και διάχυτες μορφές (διάχυτη πνευμονία, προσβολή του ουροποιητικού συστήματος) (Brooks et al., 2013; Ryan & Ray, 2004).

Η *C. albicans* μεταβολίζει κατά κύριο λόγο υδατάνθρακες, κυρίως γλυκόζη, αλλά και γαλακτόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη με σκοπό να επιτελέσει διάφορες λειτουργίες της όπως η πρόσφυση, η αντίσταση στο οξειδωτικό στρες, ο σχηματισμός βιοφίλμ, η μορφογένεση, η εισβολή και η ανοχή στα αντιμυκητιακά φάρμακα (Han et al., 2011; Van Ende et al., 2019).

2.2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αιματούχο άγαρ Columbia Blood Agar (CBA, PA-254005.06, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany), ο ζωμός Brain Heart Infusion broth (BHI, 4012302, Biolife Italiana S.r.l., Milan, Italy) και το άγαρ Plate Count Agar (PCA, VM291763 122, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) για τα βακτήρια, ο ζωμός Sabouraud Dextrose Broth (SDB, S3306, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) και το άγαρ Sabouraud Dextrose Agar (SDA, 7150, Neogen, Lansing, MI, USA) για τον μύκητα.

Αιματούχο άγαρ (CBA)

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα CBA περιεχόταν σε έτοιμα προς χρήση τρυβλία και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Συστατικά του CBA	Σύσταση (g/L)
Pancreatic Digest of Casein	12,0
Peptic Digest of Animal Tissue	5,0
Yeast Extract	3,0
Beef Extract	3,0
Corn Starch	1,0
Sodium Chloride	5,0
Agar	13,5
Sheep Blood, Defibrinated	5%

Η τιμή pH του στερεού υποστρώματος ήταν $7,3 \pm 0,2$.

Brain Heart Infusion Broth (BHI)

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Συστατικά του BHI	Σύσταση (g/L)
Dehydrated brain infusion	12,5
Dehydrated heart infusion	5,0
Enzymatic digest of animal tissues	10,0
Glucose	2,0
Sodium Chloride	5,0
Disodium Hydrogen Phosphate	2,5

Η σύσταση του καλλιεργητικού υλικού σε ολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκε 20,9 g/L με τη μέθοδο Kjeldahl, ενώ η σύσταση σε ολικά λιπίδια ήταν μικρότερη από 0,04 g/L.

Για την παρασκευή του ζωμού αναμίχθηκαν 37 g έτοιμης σκόνης BHI σε 1 L απιονισμένου νερού υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121°C για 15 min. Η τιμή pH του θρεπτικού υλικού ήταν $7,4 \pm 0,2$ στους 20-25°C.

Plate Count Agar (PCA)

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PCA είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Συστατικά του PCA	Σύσταση (g/L)
Casein Peptone	5,0
Yeast Extract	2,5
Glucose	1,0
Agar	9,0-18,0

Για την παρασκευή του υποστρώματος αναμίχθηκαν 22,5 g έτοιμης σκόνης PCA σε 1 L απιονισμένου νερού υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min, παραμονή σε υδατόλουτρο μέχρι η

θερμοκρασία του να πέσει περίπου στους 45-50°C και τέλος, διανομή σε τρυβλία petri διαμέτρου 10 cm. Η τιμή pH του θρεπτικού υποστρώματος κυμαινόταν μεταξύ 6,8-7,2 στους 25°C.

Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SDB είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Συστατικά του SDB	Σύσταση (g/L)
Mycological Peptone	10,0
Dextrose	20,0

Η σύσταση του καλλιεργητικού υλικού σε ολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκε 6,6 g/L με τη μέθοδο Kjeldahl, ενώ η σύσταση σε ολικά λιπίδια ήταν μικρότερη από 0,03 g/L.

Για την παρασκευή του υποστρώματος αναμίχθηκαν 30 g έτοιμης σκόνης SDB σε 1 L απιονισμένου νερού υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Η τιμή pH του θρεπτικού υλικού στους 25°C ήταν $5,6 \pm 0,2$.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SDA είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Συστατικά του SDA	Σύσταση (g/L)
Peptic Digest of Animal Tissue	5,0
Pancreatic Digest of Casein	5,0
Dextrose	40,0
Agar	15,0

Για την παρασκευή στερεού υποστρώματος SDA 65 g έτοιμης σκόνης αναμίχθηκαν υπό ανάδευση με 1 L απιονισμένου νερού έως την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Ακολούθησε υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min, παραμονή σε υδατόλουτρο

μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει περίπου στους 45-50°C και τέλος, διανομή σε τρυβλία petri διαμέτρου 10 cm. Η τελική τιμή pH του υποστρώματος στους 25°C ήταν $5,6 \pm 0,2$.

2.2.3 Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος

Ο μύκητας και τα τρία βακτηριακά στελέχη φυλάσσονταν στους -80°C σε φιαλίδια Microbank™ (ProLab Diagnostics, Canada) που περιέχουν ένα ειδικά διαμορφωμένο κρυοσυντηρητικό και πορώδη γυάλινα σφαιρίδια, στην επιφάνεια των οποίων προσκολλώνται οι μικροοργανισμοί. Το σύστημα Microbank™ έχει σχεδιαστεί με σκοπό τη μακροχρόνια αποθήκευση και ανάκτηση βακτηριακών και μυκητιακών εναιωρημάτων.

2.2.3.1 Παρασκευή των βακτηριακών εναιωρημάτων

Από κάθε βακτηριακό στέλεχος μεταφέρθηκαν με βαμβakoφόρο στυλεό, υπό άσηπτες συνθήκες, 3-5 σφαιρίδια σε έτοιμα προς χρήση τρυβλία με αιματούχο άγαρ (Columbia Blood agar) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) και επώστηκαν στους 37°C για 24-48 ώρες. Με μεταφορά 5-6 αποικιών καθαρών καλλιεργημάτων από κάθε βακτηριακό στέλεχος σε σωληνάρια με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό παρασκευάστηκαν εναιωρήματα θολερότητας ίσης με το πρότυπο Mc Farland 0,5 (Vitek Densichek, bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) που αντιπροσωπεύει περίπου 1×10^8 cfu/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; Isenberg, 2004). Η οπτική πυκνότητα του εν λόγω εναιωρήματος αντιστοιχεί σε 0,605 σε μήκος κύματος 620 nm (Isenberg, 2004) χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Model 6305, Jenway, England).

2.2.3.2 Παρασκευή του μυκητιακού εναιωρήματος

Από το στέλεχος της *C. albicans* μεταφέρθηκαν με βαμβakoφόρο στυλεό, υπό άσηπτες συνθήκες, 3-5 σφαιρίδια σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Sabouraud Dextrose agar (7150, Neogen, Lansing, MI, USA), το οποίο επώστηκε στους 37°C για 24-48 ώρες. Ακολούθως, με μεταφορά 5-6 αποικιών καθαρού καλλιεργήματος σε σωληνάριο

με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό παρασκευάστηκε εναιώρημα θολερότητας ίσης με το πρότυπο Mc Farland 2 (Vitek Densichek, bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) που αντιπροσωπεύει περίπου 1×10^8 cfu/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; Isenberg, 2004). Η οπτική πυκνότητα του εν λόγω εναιωρήματος αντιστοιχεί σε 0,605 σε μήκος κύματος 620 nm (Isenberg, 2004) χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Model 6305, Jenway, England).

2.2.4 Ενοφθαλμισμός εναιωρημάτων

Καλλιέργειες *Klebsiella pneumoniae*

Σε 142 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου (Aptaca, Canelli, Italy), που περιείχαν 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI, ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 μ L από το εναιώρημα της *K. pneumoniae* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Δύο σωληνάρια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 70 σωληνάρια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου (Chemco, Italy), τα σωληνάρια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο (anaerobic jar, GasPak System) προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Για να ελεγχθούν τα επίπεδα του οξυγόνου εντός του δοχείου, τοποθετήθηκε ένα αναμμένο κερί, ώστε όταν η φλόγα σβήσει να έχει εξασφαλιστεί αναερόβιο περιβάλλον. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 35 ημέρες. Παράλληλα, τα υπόλοιπα 70 σωληνάρια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 5 ημέρες. Μετά το πέρας των 5 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 35^η ημέρα. Η μετάβαση από αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες επιλέχθηκε για να προσεγγίσει τις συνήθεις συνθήκες μετά θάνατον κατά τις οποίες το οξυγόνο του αίματος και των ιστών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου μέχρι την εξάντλησή του. Η χρονική διάρκεια για τη μετάβαση από τις αερόβιες στις αναερόβιες συνθήκες επώασης επιλέχθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη μικροβιακή ανάπτυξη.

Σε καθημερινή βάση ανοίγονταν τέσσερα σωληνάρια (δύο από την αερόβια/αναερόβια και δύο από την αυστηρά αναερόβια επώαση), γινόταν δειγματοληψία

κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίζονταν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης προκειμένου να κατασκευαστούν τα μαθηματικά μοντέλα. Επίσης, καταγράφηκαν οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της 2-προπανόλης και της μεθανόλης.

Επιπλέον, σε 20 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 10 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες και τα υπόλοιπα 10 υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C, ως θετικά δείγματα ελέγχου (θετικά controls). Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 2 ημέρες. Μετά από 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης, της μεθυλο-βουτανόλης, της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της 2-προπανόλης και της μεθανόλης.

Επίσης, σε 16 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 8 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα 8 υπό αναερόβιες συνθήκες στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (αρνητικά controls) για χρονικό διάστημα 32 ημερών. Την ημέρα 8, 16, 24 και 32, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης, της μεθυλο-βουτανόλης, της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της 2-προπανόλης και της μεθανόλης.

Καλλιέργειες *Klebsiella pneumoniae* με επιπλέον προσθήκη γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό

Σε δύο γυάλινα μπουκάλια που περιείχαν μη αποστειρωμένο υγρό καλλιεργητικό υλικό BHI, με συγκέντρωση γλυκόζης 2 g/L, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα γλυκόζης

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 5 g/L και 10 g/L, αντίστοιχα. Τα δύο νέα θρεπτικά υλικά αναδεύτηκαν μέχρι διάλυσης της γλυκόζης και αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο.

Σε 102 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου των 10 mL, προστέθηκε όγκος 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στο καθένα και σε άλλα 102 σωληνάρια προστέθηκε όγκος 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στο καθένα. Σε κάθε σωληνάριο ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 μ L από το εναιώρημα της *K. pneumoniae* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Δύο σωληνάρια από κάθε καλλιέργεια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 50 σωληνάρια από κάθε καλλιέργεια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου, τα σωληνάρια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 25 ημέρες. Τα υπόλοιπα 50 σωληνάρια από κάθε υγρή καλλιέργεια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 5 ημέρες. Μετά το πέρας των 5 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 25^η ημέρα.

Σε καθημερινή βάση ανοίγονταν 8 σωληνάρια (δύο από κάθε διαφορετική καλλιέργεια και συνθήκη επώασης), γινόταν δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπωματίζονταν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών για την κατασκευή των μαθηματικών μοντέλων, καθώς και οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών.

Επιπλέον, σε 12 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε καλλιεργητικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L και σε άλλα 12 σωληνάρια υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L. Τα 6 σωληνάρια από κάθε καλλιέργεια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα 6 υπό αναερόβιες συνθήκες στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (αρνητικά controls) για χρονικό διάστημα 8 ημερών. Την ημέρα 2, 4 και 8, δύο σωληνάρια από κάθε ξεχωριστή καλλιέργεια και συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια

χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης και των υπόλοιπων πτητικών.

Καλλιέργειες *Staphylococcus aureus*

Σε 94 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου των 10 mL, που περιείχαν 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI, ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 μ L από το εναιώρημα του *S. aureus* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Δύο σωληνάρια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 46 σωληνάρια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου, τα σωληνάρια ποματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 23 ημέρες. Παράλληλα, τα υπόλοιπα 46 σωληνάρια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 5 ημέρες. Μετά το πέρας των 5 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 23^η ημέρα. Σε καθημερινή βάση ανοίγονταν 4 σωληνάρια (2 από την αερόβια/αναερόβια και 2 από την αυστηρά αναερόβια επώαση), γινόταν δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίζονταν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών προκειμένου να κατασκευαστούν τα μαθηματικά μοντέλα, καθώς και οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών.

Επιπλέον, σε 16 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες του *S. aureus* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 8 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες και τα υπόλοιπα 8 υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C, ως θετικά δείγματα ελέγχου (θετικά controls). Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 2 ημέρες. Μετά από 6, 12, 24 και 48 ώρες, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των άλλων πτητικών ενώσεων.

Επίσης, σε 12 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες του *S. aureus* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 6 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα 6 υπό αναερόβιες συνθήκες στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (αρνητικά controls) για χρονικό διάστημα 23 ημερών. Την ημέρα 8, 16 και 23, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των υπόλοιπων πτητικών ουσιών.

Καλλιέργειες *Enterococcus faecalis*

Σε 122 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου (Aptaca, Canelli, Italy), που περιείχαν 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI, ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 µL από το εναιώρημα του *E. faecalis* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Δύο σωληνάρια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 60 σωληνάρια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου, τα σωληνάρια ποματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 30 ημέρες. Παράλληλα, τα υπόλοιπα 60 σωληνάρια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 5 ημέρες. Μετά το πέρας των 5 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 30^η ημέρα.

Σε καθημερινή βάση ανοίγονταν 4 σωληνάρια (δύο από την αερόβια/αναερόβια και δύο από την αυστηρά αναερόβια επώαση), γινόταν δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίζονταν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών προκειμένου να κατασκευαστούν τα μαθηματικά μοντέλα. Επίσης, καταγράφηκαν οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών ενώσεων.

Επιπλέον, σε 20 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες του *E. faecalis* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 10 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες και

τα υπόλοιπα 10 υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C, ως θετικά δείγματα ελέγχου (θετικά controls). Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 2 ημέρες. Μετά από 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των άλλων πτητικών ουσιών.

Επίσης, σε 16 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες του *E. faecalis* σε καλλιεργητικό υλικό BHI. Τα 8 σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα 8 υπό αναερόβιες συνθήκες στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (αρνητικά controls) για χρονικό διάστημα 30 ημερών. Την ημέρα 8, 16, 24 και 30, δύο σωληνάρια από κάθε συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των υπόλοιπων πτητικών ενώσεων.

Καλλιέργειες *Candida albicans*

Σε 86 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου, που περιείχαν 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος SDB, ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 μ L από το εναιώρημα της *C. albicans* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Δύο σωληνάρια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 42 σωληνάρια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου, τα σωληνάρια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 21 ημέρες. Τα υπόλοιπα 42 σωληνάρια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 4 ημέρες. Μετά το πέρας των 4 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 21^η ημέρα. Παράλληλα, σε 86 αποστειρωμένα σωληνάρια πολυστυρενίου, που περιείχαν 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος BHI, ενοφθαλμίστηκε υπό άσηπτες συνθήκες όγκος 50 μ L από το εναιώρημα της *C. albicans* επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL.

Το pH του θρεπτικού υλικού BHI, πριν αποστειρωθεί, ρυθμίστηκε στην τιμή 5,6 με τη σταδιακή προσθήκη HCl 1 M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) υπό ανάδευση, τιμή ίση με εκείνη του SDB. Δύο σωληνάρια αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους 4°C μέχρις ότου αναλυθούν την ίδια ημέρα (Ημέρα 0). Σε 42 σωληνάρια προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου, τα σωληνάρια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο δοχείο προκειμένου να επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια επώαση των ενοφθαλμισμένων σωληναρίων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C για 21 ημέρες. Τα υπόλοιπα 42 σωληνάρια επώαστηκαν αερόβια στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 4 ημέρες. Μετά το πέρας των 4 ημερών, σε κάθε ενοφθαλμισμένο σωληνάριο προστέθηκε όγκος περίπου 1 mL αποστειρωμένου παραφινέλαιου και η επώαση συνεχίστηκε αναερόβια στο ειδικό δοχείο έως την 21^η ημέρα. Σε καθημερινή βάση ανοίγονταν 8 σωληνάρια (δύο από κάθε διαφορετική καλλιέργεια και συνθήκη επώασης), γινόταν δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπωματίζονταν. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών προκειμένου να κατασκευαστούν τα μαθηματικά μοντέλα. Επίσης, καταγράφηκαν οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών.

Επιπλέον, σε 32 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* σε καλλιεργητικό υλικό SDB και σε άλλα 32 υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI. Τα μισά σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες και τα υπόλοιπα μισά υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C, ως θετικά δείγματα ελέγχου (θετικά controls). Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 5 ημέρες. Μετά από 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες, δύο σωληνάρια από κάθε διαφορετική καλλιέργεια και συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναπωματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των υπόλοιπων πτητικών ενώσεων.

Επίσης, σε 12 αποστειρωμένα σωληνάρια ετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* σε καλλιεργητικό υλικό SDB και σε άλλα 12 υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI. Τα μισά σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα μισά υπό αναερόβιες συνθήκες στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (αρνητικά controls) για χρονικό διάστημα 21 ημερών. Την ημέρα 7, 17 και 21, δύο σωληνάρια από κάθε ξεχωριστή καλλιέργεια και συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε

δειγματοληψία κλάσματος εναιωρήματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των άλλων πτητικών ουσιών.

2.2.5 Βακτηριακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα

Ολικό αίμα από υγιείς εθελοντές αιμοδότες όγκου 300-400 mL παραλήφθηκε από το Τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο γυάλινο μπουκάλι και αποθηκεύτηκε στους 4°C ώσπου να χρησιμοποιηθεί. Για να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος, το μπουκάλι με το ολικό αίμα τοποθετήθηκε σε θερμαντικό μέσο και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 50°C. Μετά από περίπου 1 ½ ώρα παρατηρήθηκε καθίζηση των πρωτεϊνών του πλάσματος (Vazquez & Larson, 2013). Το pH του μετουσιωμένου αίματος ήταν $7,2 \pm 0,2$, συγκρίσιμο με την τιμή $7,4 \pm 0,2$ του αρχικού φυσιολογικού αίματος.

Ακολούθως, σε 90 γυάλινα αποστειρωμένα σωληνάρια των 10 mL μεταφέρθηκε όγκος 2 mL μετουσιωμένου αίματος στο καθένα. Σε 30 σωληνάρια ενοφθαλμίστηκε όγκος 20 μ L εναιωρήματος *K. pneumoniae* ανά σωληνάριο, σε άλλα 30 ενοφθαλμίστηκε όγκος 20 μ L εναιωρήματος *S. aureus* και στα υπόλοιπα 30 σωληνάρια ενοφθαλμίστηκε όγκος 20 μ L ανά σωληνάριο από το εναιώρημα του *E. faecalis* με σκοπό να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Τα μισά σωληνάρια επώαστηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και τα υπόλοιπα μισά υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 15 ημέρες. Τις ημέρες 0, 1, 2, 3, 5, 7, 11 και 15, δύο σωληνάρια από κάθε ξεχωριστή καλλιέργεια και συνθήκη επώασης ανοίχτηκαν, έγινε δειγματοληψία κλάσματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και στη συνέχεια επαναποματίστηκαν. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των άλλων πτητικών ουσιών.

2.2.6 Μυκητιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα με προσθήκη δεξτρόζης 5% w/v ή αυξανόμενων συγκεντρώσεων γλυκόζης

Ολικό αίμα από υγιείς εθελοντές αιμοδότες όγκου 300-400 mL παραλήφθηκε από το Τμήμα Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο γυάλινο μπουκάλι και αποθηκεύτηκε στους 4°C ώσπου να χρησιμοποιηθεί. Ακολούθησε η μετουσίωση των πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.5. Εν συνεχεία, το μετουσιωμένο ανθρώπινο αίμα χωρίστηκε ισόποσα και μεταφέρθηκε σε δύο αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια. Το pH του μετρήθηκε $7,2 \pm 0,2$, συγκρίσιμο με την τιμή $7,4 \pm 0,2$ του αρχικού φυσιολογικού αίματος. Η μισή ποσότητα του μετουσιωμένου αίματος οξινίστηκε με προσθήκη HCl 5 M, έως ότου η τιμή του pH γίνει $5,5 \pm 0,2$ (συγκρίσιμη με εκείνη στις καλλιέργειες της *C. albicans* στους 25°C).

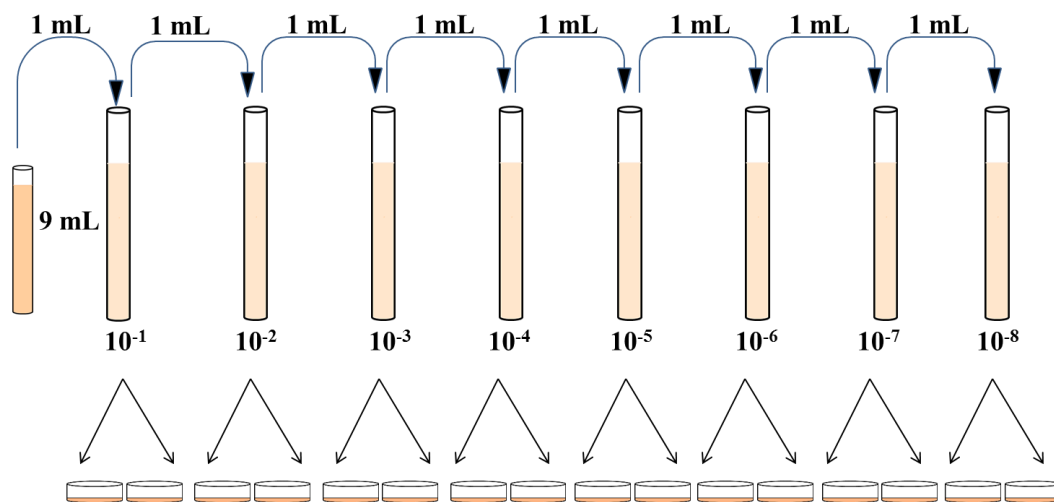
Σε πέντε σειρές δειγμάτων με 10 σωληνάρια η κάθε μία, που περιείχαν 2 mL οξινισμένου μετουσιωμένου αίματος και σε άλλες πέντε σειρές δειγμάτων με 10 σωληνάρια η κάθε μία, που περιείχαν 2 mL μη οξινισμένου (ουδέτερου) μετουσιωμένου αίματος ενοφθαλμίστηκε κατάλληλος όγκος (0, 10, 30, 70 και 110 μ L, αντίστοιχα σε κάθε σειρά οξινισμένου ή ουδέτερου αίματος) ενός αποστειρωμένου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 200 g/L, έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση προστιθέμενης γλυκόζης 0, 1, 3, 7 και 11 g/L, αντίστοιχα. Παράλληλα, δέκα σωληνάρια περιείχαν ποσότητα 1 mL οξινισμένου μετουσιωμένου ανθρώπινου αίματος το καθένα, η οποία αραιώθηκε (αραιώση 5:1 v/v) με αποστειρωμένο διάλυμα δεξτρόζης 5% w/v (pyrogen free solution for intravenous infusion, DEMO Ltd., Greece). Σε κάθε σωληνάριο ενοφθαλμίστηκε όγκος 20 μ L εναιωρήματος *C. albicans* με σκοπό να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10^6 cfu/mL. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 25°C υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες. Τις ημέρες 0, 2, 4, 5 και 7, δύο σωληνάρια από κάθε ξεχωριστή καλλιέργεια απομακρύνθηκαν από το σύστημα επώασης κι έγινε δειγματοληψία κλάσματος 0,5 mL για αέρια χρωματογραφική ανάλυση. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και των υπόλοιπων πτητικών ενώσεων.

2.2.7 Μέτρηση αριθμού μικροβιακών αποικιών

Η διαδικασία μέτρησης του αριθμού των μικροβιακών αποικιών, για κάθε μικροβιακή καλλιέργεια και συνθήκη επώασης, χωριστά, πραγματοποιούνταν ανά 3-4

ημέρες έως το τέλος της επωαστικής περιόδου και είχε ως σκοπό την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης για κάθε μικροοργανισμό στους 25°C.

Για κάθε δείγμα, που απομακρυνόταν από το σύστημα επώασης με σκοπό να μετρηθεί ο αριθμός των αποικιών του και κατόπιν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των πτητικών που παρήχθησαν, διεξάγονταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, ως εξής: Σε 8 αποστειρωμένα γυάλινα σωληνάρια φέρονταν 9 mL ισοτονικού διαλύματος αραιώσης Maximum Recovery Diluent (MRD, VM098735 937, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Στο πρώτο σωληνάριο προστέθηκε όγκος 1 mL από το προς μέτρηση δείγμα, επιτυγχάνοντας αραιώση 1:10. Το εναιώρημα αναδεύτηκε ήπια σε ομογενοποιητή (vortex) και στη συνέχεια όγκος 1 mL από αυτό προστέθηκε στο δεύτερο σωληνάριο επιτυγχάνοντας αραιώση 1:100. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε έως ότου επιτευχθεί αραιώση του δείγματος 1:10⁸ (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Σχηματική απεικόνιση των υποδεκαπλάσιων αραιώσεων των μικροβιακών εναιωρημάτων και μεταφορά ορισμένης ποσότητας σε τρυβλία με τη μέθοδο ενσωμάτωσης ή τη μέθοδο επίστρωσης για τη μέτρηση των μικροβιακών αποικιών.

2.2.7.1 Μέτρηση αριθμού βακτηριακών αποικιών

Η μέτρηση του αριθμού των αποικιών στις βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ενσωμάτωσης (pour plate method) (Masaphy, 2013). Όγκος 1 mL από κάθε αραιώση μεταφέρθηκε σε δύο τρυβλία petri. Στη συνέχεια σε κάθε τρυβλίο διανεμήθηκε ορισμένη ποσότητα (10-15 mL) ρευστοποιημένου άγαρ PCA στους 45°C, τα τρυβλία ανακινήθηκαν ελαφρώς για να αναμιχθούν ομοιόμορφα το εναιώρημα με

το άγαρ και αφέθηκαν να πήξουν. Ακολούθως, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάστροφα στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για περίπου 24 ώρες.

Για τη μέτρηση των αποικιών επιλέχθηκαν τρυβλία με 30-300 αποικίες. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποικιών από κάθε ζεύγος τρυβλίων, ο οποίος πολλαπλασιάστηκε με τον παράγοντα αραιώσης και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε cfu/mL.

2.2.7.2 Μέτρηση αριθμού μυκητιακών αποικιών

Η μέτρηση του αριθμού των αποικιών στις μυκητιακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επίστρωσης (spread plate method) (Masaphy, 2013). Ανά δύο προεπιστρωμένα με SDA τρυβλία petri προστέθηκε όγκος 100 μ L από κάθε αραιώση. Η ποσότητα του εναιωρήματος απλώθηκε προς όλες τις πλευρές του τρυβλίου με αποστειρωμένο κρίκο μιας χρήσεως και αφέθηκε για λίγα λεπτά να απορροφηθεί. Στη συνέχεια, τα τρυβλία αναστράφηκαν και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 24-48 ώρες.

Για τη μέτρηση των αποικιών επιλέχθηκαν τρυβλία με 30-300 αποικίες. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποικιών από κάθε ζεύγος τρυβλίων, ο οποίος πολλαπλασιάστηκε με τον παράγοντα αραιώσης και τον αριθμό 10 για να εκφραστεί το αποτέλεσμα σε cfu/mL.

2.3 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis) εντοπίζει την σχέση μεταξύ μίας μεταβλητής συνεχών αριθμητικών τιμών (εξαρτημένη μεταβλητή) και μίας ή περισσότερων άλλων μεταβλητών (ανεξάρτητες μεταβλητές) οποιουδήποτε τύπου δεδομένων. Η ανάλυση αποσκοπεί στην υπόθεση ότι οι τιμές της εξαρτημένης μεταβλητής επηρεάζονται από τον συνδυασμό κάποιων ανεξάρτητων μεταβλητών προς την παραγωγή κάποιου στατιστικού μοντέλου παρατήρησης πειραματικών δεδομένων.

Στην παρούσα εργασία, τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο της βηματικής γραμμικής παλινδρόμησης (stepwise linear regression). Η μέθοδος ανιχνεύει κατά σειρά όλες τις ανεξάρτητες μεταβλητές (συγκέντρωση πτητικών) για τον προσδιορισμό εκείνης της μεταβλητής με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης με την εξαρτημένη μεταβλητή (συγκέντρωση αιθανόλης). Ακολουθεί η προοδευτική προσθήκη μεταβλητών (forward addition) όπου πάλι με βάση το ίδιο κριτήριο καταρτίζεται το υποσύνολο των ανεξάρτητων μεταβλητών που περιλαμβάνονται στο τελικό γραμμικό μοντέλο έχοντας επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$. Με σκοπό τον καθορισμό του τελικού μοντέλου έγινε έλεγχος πολυσυγγραμμικότητας (multicollinearity). Κατά την πολυσυγγραμμικότητα, υπάρχει συσχέτιση (correlation) μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών με αποτέλεσμα οι τιμές των εκτιμώμενων συντελεστών (coefficients) να παρουσιάζουν αυξημένη διακύμανση. Ο έλεγχος πολυσυγγραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του Εκτιμητή Διόγκωσης της Διακύμανσης (Variance Inflation Factor – VIF) και επιλέχθηκε ως άνω όριο το 5. Η αξιολόγηση του τελικού μοντέλου, έγινε με υπολογισμό του συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination) R^2 (R-squared) και το Μέσο Τετραγωνικό Σφάλμα (Root Mean Squared Error – RMSE) που δίνεται από την τετραγωνική ρίζα του μέσου όρου του τετραγώνου των καταλοίπων

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

όπου y και \hat{y} είναι οι πραγματικές τιμές της εξαρτημένης μεταβλητής και οι θεωρητικές τιμές, αντιστοίχως.

2.4 Εφαρμογή των μαθηματικών μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών

Τα μαθηματικά μοντέλα που κατασκευάστηκαν ελέγχθηκαν για την εφαρμοσιμότητά τους σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε συλλογή βιολογικών υλικών από πτώματα που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια σηπτικών εξεργασιών (πρώιμη ή προχωρημένη σήψη) ή από πτώματα χωρίς εμφανή σηπτικά φαινόμενα, κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επίσης, εστάλησαν στο εργαστήριό μας βιολογικά υλικά από έξι περιστατικά κατά τη διενέργεια νεκροψίας-νεκροτομής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τα οποία συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας.

Συνοπτικά, τα βιολογικά υλικά της μελέτης αποτέλεσαν:

- 128 δείγματα ολικού αίματος. Η πλειοψηφία των δειγμάτων αυτών συλλέχθηκαν από τη μηριαία φλέβα, με παρακέντηση με μεγάλη βελόνα. Άλλα σημεία λήψης ολικού αίματος αποτέλεσαν η κεντρική φλέβα, η δεξιά και αριστερή κοιλία, το άνω άκρο, η κρανιακή και η θωρακική κοιλότητα
- 4 δείγματα υαλοειδούς υγρού του οφθαλμού
- 4 δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από την ουροδόχο κύστη με παρακέντηση της περιοχής πάνω από την ηβική σύμφυση
- 2 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού
- 1 δείγμα γαστρικού περιεχομένου, και
- 1 δείγμα ήπατος

Στις περιπτώσεις που το ιξώδες του υαλοειδούς υγρού ήταν αρκετά μεγάλο, ώστε να δυσχεραίνει τη δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 με δις απεσταγμένο νερό (250 μL υαλοειδές υγρό-250 μL νερό). Για την ανάλυση του ήπατος χρησιμοποιήθηκαν 7,01 g του ιστού τα οποία ομογενοποιήθηκαν με 19 mL PBS- NaN_3 για την επίτευξη τελικής πυκνότητας ομογενοποιημένου 1,00 g/mL. Τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν χωρίς να υποστούν καμία προηγούμενη επεξεργασία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάλυση πτητικών με αέρια χρωματογραφία

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ουσιών στις μικροβιακές καλλιέργειες και στα βιολογικά υλικά ήταν η αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης (Headspace-GC), η οποία αποτελεί τροποποίηση προηγούμενης μεθόδου για την ανάλυση της αιθανόλης και των άλλων πτητικών ουσιών (Boumba et al., 2012a).

Για τον διαχωρισμό των πτητικών ουσιών επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές στήλες, η SUPELCOWAX^{TM-10} και η VOCOLTM, που επέτρεπαν την έκλυση και τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων με βάση την πολικότητα και τα μοριακά βάρη. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η στήλη SUPELCOWAX^{TM-10} για τον διαχωρισμό των ουσιών: αιθανόλη, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη, μεθυλο-βουτανόλη (ισοαμυλική και/ή αμυλική αλκοόλη), μεθανόλη, 2-προπανόλη, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας και ακετονιτρίλιο (I.S.). Στο **Σχήμα 18** (υποενότητα 2.1.4), παρουσιάζεται ένα πρότυπο χρωματογράφημα όπου εμφανίζονται όλες οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν. Η αλλαγή στη στήλη VOCOLTM πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον διαχωρισμό της μεθυλο-βουτανόλης σε δύο ξεχωριστές κορυφές, την 3-μεθυλο-1-βουτανόλη και τη 2-μεθυλο-1-βουτανόλη. Παρόλο που με τη νέα στήλη οι δύο αυτές κορυφές προσδιορίστηκαν η κάθε μία χωριστά, υπολογίστηκαν ως άθροισμα των δύο ισομερών και αναφέρθηκαν ως μεθυλο-βουτανόλη για να υπάρχει συνέπεια με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες. Στο **Σχήμα 19** (υποενότητα 2.1.4) παρουσιάζεται ένα πρότυπο χρωματογράφημα όπου εμφανίζονται οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν, καθώς και ο διαχωρισμός της 3-μεθυλο-1-βουτανόλης από την 2-μεθυλο-1-βουτανόλη από τη νέα στήλη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο ως εσωτερικό πρότυπο. Η επιλογή του ακετονιτρίλιου ως εσωτερικού προτύπου έγινε με βάση τα παρακάτω κριτήρια: (α) δεν αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον ανθρώπινο οργανισμό και (β) δεν αποτελεί οργανικό προϊόν αποσύνθεσης μεταθανάτια (Boumba et al., 2008; O'Neal & Poklis, 1996).

Στα αναλυθέντα δείγματα επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός αφενός της αιθανόλης και αφετέρου των υπόλοιπων πτητικών ουσιών για τους παρακάτω λόγους:

- Η 1-προπανόλη, η ισοβουτανόλη, η 1-βουτανόλη, η ισοαμυλική και η d-αμυλική αλκοόλη θεωρούνται προϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη σήψη των πτωμάτων και η ανίχνευσή τους στα βιολογικά υλικά έχει θεωρηθεί ενδεικτική της ύπαρξης σηπτικών εξεργασιών και της μεταθανάτιας παραγωγής της αιθανόλης. Στην παρούσα εργασία αυτοί οι τοξικολογικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη εύχρηστων μαθηματικών εξισώσεων (μοντέλων) ποσοτικής εκτίμησης της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης (Boumba, 2022; Corry, 1978; Kugelberg & Jones, 2007; Lewis et al., 2004; Moriya & Hashimoto, 2004; Ziavrou et al., 2005).
- Η ακεταλδεΐδη αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της αιθανόλης συνεπώς, η μεταβολή της συγκέντρωσής της είναι πιθανό να σχετίζεται με τα επίπεδα της αιθανόλης στα βιολογικά υλικά (Boumba et al., 2008; Lin et al., 2020; Ziavrou et al., 2005).
- Η ακετόνη αποτελεί φυσιολογικό μεταβολικό προϊόν στον ανθρώπινο οργανισμό (ανήκει στα κετονοσώματα) (Boumba et al., 2008; Kalapos, 2003; Ziavrou et al., 2005).
- Η 2-προπανόλη ανιχνεύεται στα βιολογικά υλικά τόσο ζώντων ατόμων όσο και πτωμάτων (Boumba et al., 2008; Lin et al., 2020; Ziavrou et al., 2005).
- Η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας ανιχνεύονται ταυτόχρονα με την αιθανόλη στα βιολογικά υλικά τόσο ζωντανών οργανισμών όσο και περιστατικών νεκροτομικού ενδιαφέροντος (Boumba et al., 2008; Kugelberg & Jones, 2007; Lin et al., 2020; Ziavrou et al., 2005).

Τα LODs και LOQs για κάθε πτητική ένωση, τα εύρη των συγκεντρώσεων, καθώς και οι τιμές του συντελεστή, R^2 , προσδιορίστηκαν για κάθε στήλη του αέριου χρωματογράφου, SUPELCOWAX^{TM-10} και VOCOLTM, και παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4, αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs), εύρη συγκεντρώσεων και R^2 για κάθε αναλύτη. Η στήλη του χρωματογράφου ήταν η SUPELCOWAX^{TM-10}.

Πτητική ουσία	LOD (mg/dL)	LOQ (mg/dL)	Εύρη συγκεντρώσεων (mg/dL)	R^2
Αιθανόλη (g/L)	0,10 (0,001)	0,50 (0,005)	0,50-400 (0,005-4,0)	0,999
1-Προπανόλη	0,02	0,05	0,05-25,0	0,999
Ισοβουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,20	0,999
1-Βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,20	0,999
3-Μεθυλο-1-βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,40	0,999
2-Μεθυλο-1-βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,40	0,999
Ακεταλδεΐδη	0,025	0,05	0,05-200	0,999
Οξικός αιθυλεστέρας	0,005	0,01	0,01-0,80	0,994
Ακετόνη	0,01	0,05	0,05-200	0,999
2-Προπανόλη	0,02	0,05	0,05-200	0,999
Μεθανόλη	0,10	0,20	0,20-200	0,999

Πίνακας 4: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LODs και LOQs), εύρη συγκεντρώσεων και R^2 για κάθε αναλύτη. Η στήλη του χρωματογράφου ήταν η VOCOLTM.

Πτητική ουσία	LOD (mg/dL)	LOQ (mg/dL)	Εύρη συγκεντρώσεων (mg/dL)	R^2
Αιθανόλη (g/L)	0,10 (0,001)	0,50 (0,005)	0,50-400 (0,005-4,0)	0,999
1-Προπανόλη	0,01	0,05	0,05-25,0	0,999
Ισοβουτανόλη	0,005	0,01	0,01-20,0	0,999
1-Βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-25,0	0,999
3-Μεθυλο-1-βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,80	0,999
2-Μεθυλο-1-βουτανόλη	0,005	0,01	0,01-0,80	0,999
Ακεταλδεΐδη	0,05	0,1	0,10-50,0	0,999
Οξικός αιθυλεστέρας	0,05	0,1	0,10-20,0	0,994
Ακετόνη	0,01	0,05	0,05-50,0	0,999
2-Προπανόλη	0,02	0,05	0,05-50,0	0,999
Μεθανόλη	0,10	0,20	0,20-50,0	0,999

3.2 Καμπύλες ανάπτυξης μικροοργανισμών υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης

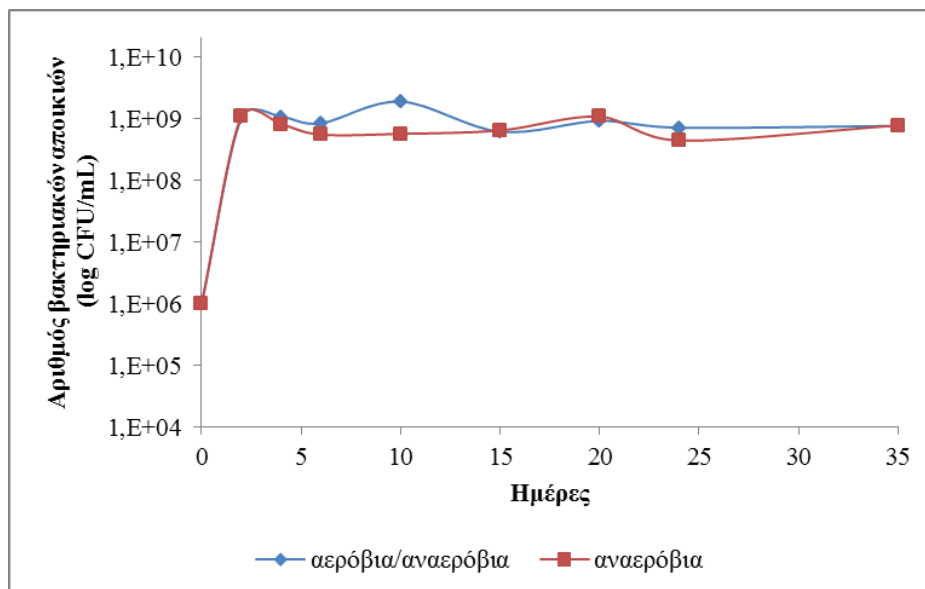
3.2.1. Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*

3.2.1.1 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI

Αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C για 35 ημέρες. Στο **Σχήμα 21** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση. Τις πρώτες 5 ημέρες η *K. pneumoniae* επώαστηκε υπό αερόβιες συνθήκες και ο αριθμός των αποικιών της έφτασε περίπου το $1,0 \times 10^9$ cfu/mL. Από την 6^η έως την 35^η ημέρα η επώασή της συνεχίστηκε αναερόβια. Από την 6^η έως τη 10^η ημέρα ο αριθμός των αποικιών αυξήθηκε έως περίπου τα $2,0 \times 10^9$ cfu/mL, ενώ από τη 10^η έως τη 15^η ημέρα ελαττώθηκε ξανά έως περίπου τα $1,0 \times 10^9$ cfu/mL και παρέμεινε σταθερός ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.

Κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου αυξήθηκε ως τη 2^η ημέρα επώασης φτάνοντας περίπου το $1,0 \times 10^9$ cfu/mL. Από τη 2^η ως την 4^η ημέρα μειώθηκε λίγο ως τα $0,8 \times 10^9$ cfu/mL και παρέμεινε σχεδόν σταθερός μέχρι τη 15^η ημέρα επώασης. Την 20^η ημέρα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του αριθμού των αποικιών στο $1,0 \times 10^9$ cfu/mL, ενώ μέχρι την 24^η ημέρα μειώθηκε ξανά έως περίπου τα $0,4 \times 10^9$ cfu/mL και παρέμεινε σχεδόν σταθερός μέχρι το τέλος της επωαστικής περιόδου.

Ο αριθμός των αποικιών της *K. pneumoniae* παρέμεινε πρακτικά σταθερός και στις δύο συνθήκες επώασης καθ' όλη τη διάρκεια των 35 ημερών, με εξαίρεση το διάστημα από την 5^η έως τη 15^η ημέρα επώασης όπου ο αριθμός των αποικιών κατά τις μικτές συνθήκες επώασης ήταν λίγο μεγαλύτερος σε σύγκριση με εκείνον κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση.



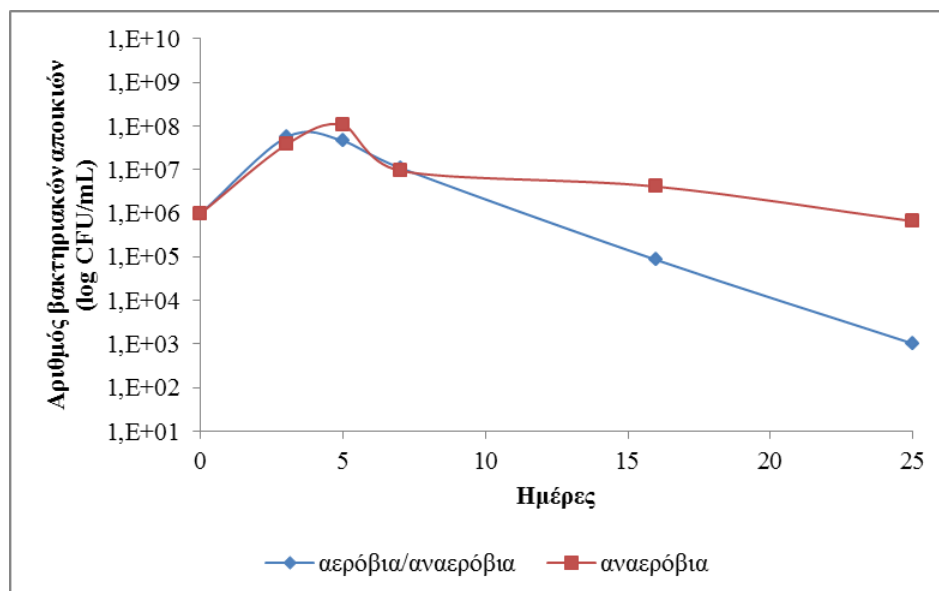
Σχήμα 21: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 35 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

3.2.1.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L

Υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης, σε καλλιεργητικό υλικό BHI με επιπλέον προσθήκη γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 5 g/L, στους 25°C για 25 ημέρες. Στο **Σχήμα 22** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση. Κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση, ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου αυξήθηκε ως την 3^η ημέρα περίπου στα $0,5 \times 10^8$ cfu/mL και παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος ως την 5^η ημέρα επώασης. Μετά την 5^η ημέρα, όπου εφαρμόστηκαν αναερόβιες συνθήκες επώασης, ο αριθμός των αποικιών άρχισε να μειώνεται με γρήγορο ρυθμό μέχρι την 25^η ημέρα, πλησιάζοντας τη φάση θανάτου.

Κατά την αναερόβια επώαση, ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών αυξήθηκε έως την 5^η ημέρα φτάνοντας το $1,0 \times 10^8$ cfu/mL. Ακολούθησε μία σημαντική μείωση του αριθμού των αποικιών την 7^η ημέρα επώασης περίπου στο $1,0 \times 10^7$ cfu/mL, η οποία συνεχίστηκε με πολύ αργό ρυθμό ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.

Μεταξύ των δύο συνθηκών επώασης παρατηρείται σημαντική διαφορά στον αριθμό των αποικιών της *K. pneumoniae* από την 7^η έως την 25^η ημέρα επώασης. Κατά τις μικτές συνθήκες ο πληθυσμός των αποικιών μειώθηκε ραγδαία φτάνοντας περίπου στις 1000 αποικίες, ενώ κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση ο αριθμός των αποικιών μειώθηκε με πιο αργό ρυθμό φτάνοντας περίπου το $1,0 \times 10^6$ cfu/mL στο τέλος της επώασης.

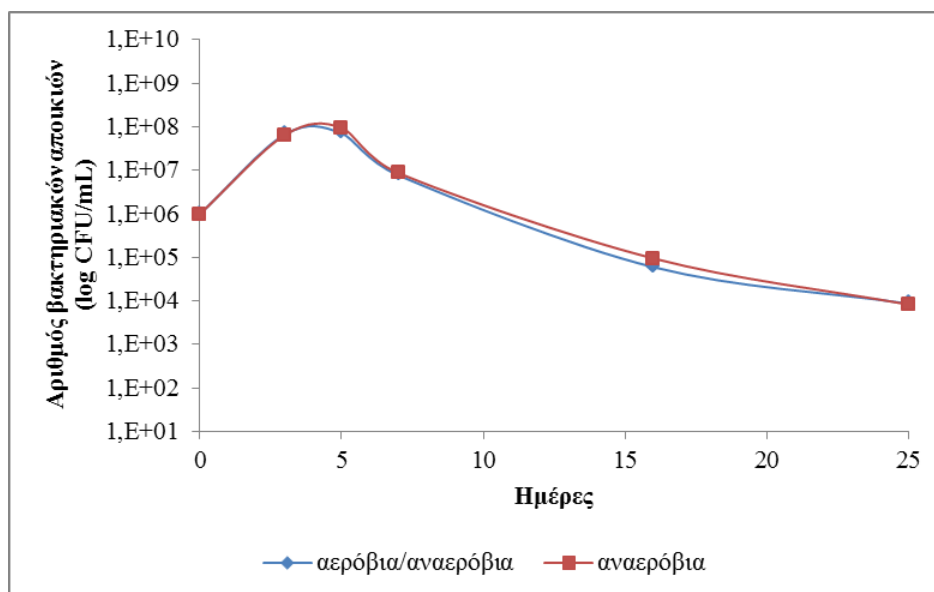


Σχήμα 22: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 25 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

3.2.1.3 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L

Υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης, σε καλλιεργητικό υλικό BHI με επιπλέον προσθήκη γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 10 g/L, στους 25°C για 25 ημέρες. Στο **Σχήμα 23** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση. Όπως παρατηρούμε, η ανάπτυξη του βακτηρίου ακολουθεί την ίδια πορεία καθ' όλη τη διάρκεια των 25 ημερών και στις δύο συνθήκες επώασης. Από την αρχή της επώασης έως την 5^η ημέρα η *K. pneumoniae* βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης φτάνοντας περίπου το

$1,0 \times 10^8$ cfu/mL, ενώ στη συνέχεια ο πληθυσμός άρχισε σταδιακά να μειώνεται φτάνοντας στο τέλος της επώασης τις 10000 αποικίες.



Σχήμα 23: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 25 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

Συγκρίνοντας την ανάπτυξη της *K. pneumoniae* στις υγρές καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό παρατηρούμε ότι η προσθήκη επιπλέον γλυκόζης λειτούργησε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου:

- Ο μέγιστος αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες με προσθήκη επιπλέον γλυκόζης ήταν 10 φορές μικρότερος σε σύγκριση με τις καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη στο θρεπτικό υλικό.
- Ο αριθμός των αποικιών στις υγρές καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη παρέμεινε σχετικά σταθερός μετά από τη 15^η ημέρα επώασης ως το τέλος, ενώ στις καλλιέργειες με τις αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης ο αριθμός των αποικιών μειωνόταν συνεχώς μετά την 5^η ημέρα μέχρι το τέλος της επώασης.

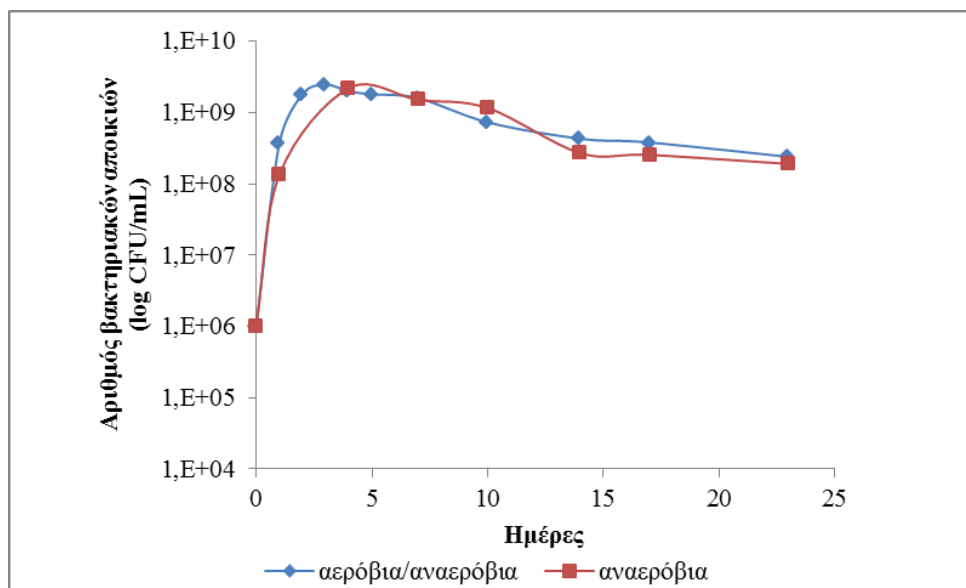
3.2.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram βακτηρίου *Staphylococcus aureus* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες

συνθήκες επώασης, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C για 23 ημέρες. Στο **Σχήμα 24** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση. Κατά τη μικτή επώαση, τις πρώτες 3 ημέρες το βακτήριο βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης υπό αερόβιες συνθήκες φτάνοντας περίπου τα $2,5 \times 10^9$ cfu/mL, ενώ τις επόμενες δύο ημέρες αερόβιας επώασης οι αποικίες μειώθηκαν ελάχιστα περίπου στα $2,0 \times 10^9$ cfu/mL. Την 5^η ημέρα εφαρμόστηκαν αναερόβιες συνθήκες επώασης και ο πληθυσμός των βακτηριακών αποικιών παρέμεινε σταθερός μέχρι την 7^η ημέρα, ενώ ακολούθως άρχισε να μειώνεται με αργό ρυθμό ως το τέλος της επώασης.

Κατά την αυστηρά αναερόβια επώασή του, ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε εκθετικά μέχρι την 4^η ημέρα επώασης φτάνοντας περίπου τα $2,2 \times 10^9$ cfu/mL. Έπειτα, έως τη 10^η ημέρα ο πληθυσμός ελαττώθηκε ελάχιστα στα $1,2 \times 10^9$ cfu/mL, ενώ ως τη 14^η ημέρα η μείωση ήταν μεγαλύτερη φτάνοντας περίπου τα $0,3 \times 10^9$ cfu/mL. Στη συνέχεια, μέχρι το τέλος της επώασης ο αριθμός των αποικιών παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος.

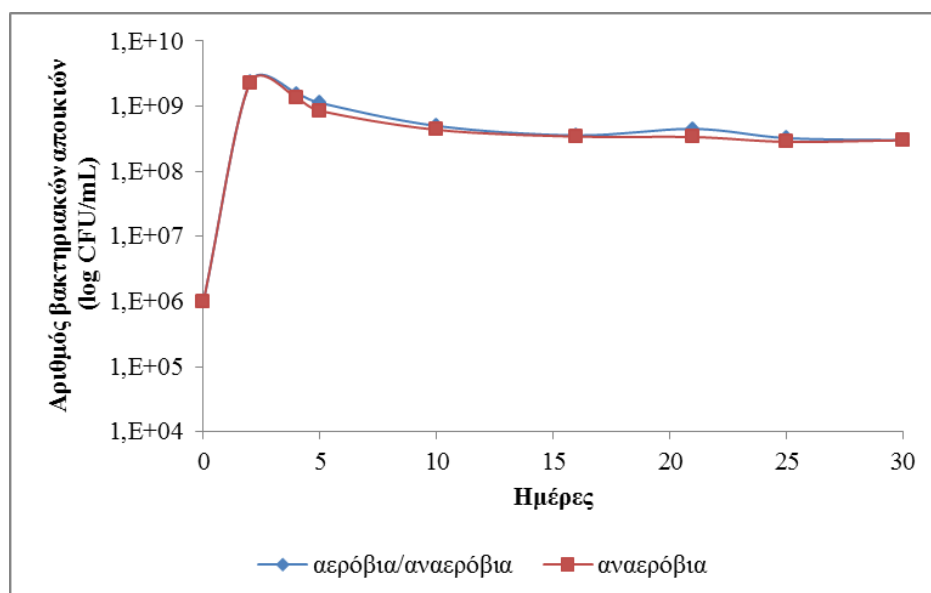
Μεταξύ των δύο συνθηκών επώασης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον αριθμό των αποικιών του *S. aureus* στο διάστημα των 23 ημερών.



Σχήμα 24: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώασή του για 23 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

3.2.3 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Enterococcus faecalis*

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram βακτηρίου *Enterococcus faecalis* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C για 30 ημέρες. Στο **Σχήμα 25** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση. Παρατηρούμε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου ήταν σχεδόν ίδιος τόσο υπό μικτή όσο και υπό αναερόβια επώαση. Ο αριθμός των αποικιών αυξήθηκε ως τη 2^η ημέρα επώασης φτάνοντας τη μέγιστη τιμή του περίπου στα $2,3 \times 10^9$ cfu/mL. Από τη 2^η έως τη 10^η ημέρα, ο αριθμός μειώθηκε σταδιακά περίπου στα $0,5 \times 10^9$ cfu/mL και μέχρι το τέλος της επωαστικής περιόδου παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος.

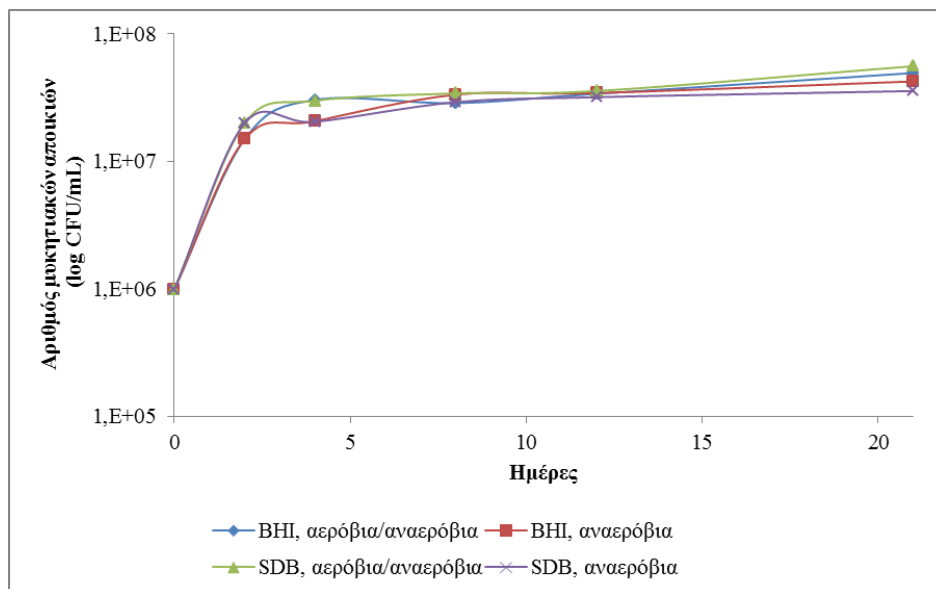


Σχήμα 25: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* σε καλλιεργητικό υλικό BHI που απεικονίζουν τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώασή του για 30 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

3.2.4 Καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα *Candida albicans*

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram μύκητα *Candida albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης, στα καλλιεργητικά υλικά BHI και SDB, ξεχωριστά, στους 25°C για 21 ημέρες. Στο **Σχήμα 26** απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου: με μπλε χρώμα η

αερόβια/αναερόβια και με κόκκινο χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση σε θρεπτικό υλικό BHI, με πράσινο χρώμα η αερόβια/αναερόβια και με μωβ χρώμα η αυστηρά αναερόβια επώαση σε θρεπτικό υλικό SDB. Η κυριότερη διαφορά μεταξύ των δύο καλλιεργητικών υλικών έγκειται στη συγκέντρωση γλυκόζης, η οποία στο SDB είναι δεκαπλάσια από την αντίστοιχη στο BHI. Παρατηρούμε ότι η πορεία ανάπτυξης του μύκητα ήταν παρόμοια και στις τέσσερις διαφορετικές καλλιέργειες, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό και τις συνθήκες επώασης. Ο αριθμός των μυκητιακών αποικιών αυξήθηκε έως την 4^η ημέρα επώασης φτάνοντας περίπου τα $3,0 \times 10^7$ cfu/mL στις καλλιέργειες υπό αερόβια επώαση σε BHI και SDB και περίπου τα $2,0 \times 10^7$ cfu/mL στις καλλιέργειες υπό αναερόβια επώαση σε BHI και SDB. Την 4^η ημέρα εφαρμόστηκαν αναερόβιες συνθήκες επώασης στις δύο καλλιέργειες που προορίζονταν για μικτή επώαση. Μέχρι την 8^η ημέρα επώασης όλες οι καλλιέργειες είχαν σχεδόν τον ίδιο αριθμό αποικιών, περίπου $3,1 \times 10^7$ cfu/mL, ο οποίος παρέμεινε σχετικά σταθερός έως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 26: Καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα *Candida albicans* στα καλλιεργητικά υλικά BHI και SDB που απεικονίζουν τον αριθμό των μυκητιακών αποικιών κατά την αερόβια/αναερόβια και αναερόβια επώασή του για 21 ημέρες στους 25°C. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τεσσάρων μετρήσεων.

Στις καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα και των βακτηρίων παρατηρήθηκαν οι εξής διαφορές:

- Ο μέγιστος αριθμός αποικιών που μετρήθηκε στις καλλιέργειες της *C. albicans* ήταν αρκετά μικρότερος από τον αντίστοιχο αριθμό στις βακτηριακές καλλιέργειες.
- Η προσθήκη επιπλέον γλυκόζης στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του πληθυσμού των αποικιών της. Ωστόσο στις καλλιέργειες της *C. albicans* δεν παρατηρήθηκαν ανάλογες διαφορές μεταξύ των καλλιεργειών με τα δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά.

3.3 Προσδιορισμός πτητικών σε μικροβιακές καλλιέργειες με αέρια χρωματογραφία

3.3.1. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI

3.3.1.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C, για 35 ημέρες. Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 6** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,46 ± 0,01	1,38 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,11 ± 0,01
2	0,55 ± 0,00	1,58 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,00
3	0,51 ± 0,02	1,56 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02
4	0,52 ± 0,01	1,94 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,34 ± 0,07
5	0,56 ± 0,02	2,10 ± 0,07	0,04 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,35 ± 0,02
6	0,59 ± 0,01	2,41 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,43 ± 0,00
7	0,51 ± 0,15	2,18 ± 0,51	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,66 ± 0,08
8	0,50 ± 0,10	2,16 ± 0,32	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,51 ± 0,01

9	0,59 ± 0,00	2,49 ± 0,08	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,64 ± 0,02
10	0,55 ± 0,03	2,46 ± 0,06	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,70 ± 0,04
11	0,53 ± 0,04	2,53 ± 0,13	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,67 ± 0,08
12	0,57 ± 0,01	2,49 ± 0,05	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,57 ± 0,00
13	0,50 ± 0,08	2,34 ± 0,13	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,03	0,69 ± 0,07
14	0,58 ± 0,02	2,49 ± 0,14	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,02
15	0,57 ± 0,02	2,56 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,71 ± 0,13
16	0,57 ± 0,00	2,51 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,74 ± 0,01
17	0,45 ± 0,09	2,21 ± 0,19	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,76 ± 0,08
18	0,59 ± 0,02	2,68 ± 0,07	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,66 ± 0,02
19	0,49 ± 0,08	2,56 ± 0,12	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,76 ± 0,10
20	0,48 ± 0,06	2,59 ± 0,12	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,00	1,04 ± 0,04
21	0,37 ± 0,04	2,21 ± 0,45	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,82 ± 0,25
22	0,45 ± 0,11	2,36 ± 0,42	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,72 ± 0,05
23	0,46 ± 0,06	2,53 ± 0,09	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,95 ± 0,11
24	0,56 ± 0,01	2,74 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,78 ± 0,03
25	0,51 ± 0,00	2,63 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01	1,01 ± 0,15
26	0,56 ± 0,01	2,82 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,81 ± 0,07
27	0,52 ± 0,02	2,53 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,91 ± 0,07
28	0,43 ± 0,06	2,30 ± 0,24	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,92 ± 0,01
29	0,53 ± 0,01	2,62 ± 0,07	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,70 ± 0,03
30	0,47 ± 0,01	2,34 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,92 ± 0,03
31	0,42 ± 0,08	2,27 ± 0,30	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,98 ± 0,13
32	0,49 ± 0,01	2,48 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,86 ± 0,09
33	0,41 ± 0,11	2,29 ± 0,34	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,02	1,02 ± 0,10
34	0,51 ± 0,04	2,62 ± 0,11	0,10 ± 0,00	0,03 ± 0,00	1,05 ± 0,01
35	0,41 ± 0,12	2,28 ± 0,58	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,98 ± 0,09

Η *K. pneumoniae* παράγαγε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης καθ' όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου, που κυμάνθηκαν από $0,37 \pm 0,04$ g/L την 21^η ημέρα έως $0,59 \pm 0,02$ g/L τη 18^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης, $1,38 \pm 0,03$ mg/dL και η υψηλότερη την 26^η ημέρα, $2,82 \pm 0,02$ mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλο-βουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από $0,11 \pm 0,01$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $1,05 \pm 0,01$ mg/dL την 34^η ημέρα επώασης. Η υψηλότερη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης μετρήθηκε τη 2^η ημέρα επώασης με τιμή $0,20 \pm 0,01$ mg/dL. Στη συνέχεια, παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αρχίζουν να μειώνονται κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου με τη χαμηλότερη συγκέντρωση να καταλήγει σε $0,03$ mg/dL την 30^η-35^η ημέρα. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από $0,02 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,10 \pm 0,00$ mg/dL την προτελευταία ημέρα επώασης.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τοπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	$0,07 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
1	$0,24 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,00$
2	$0,64 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,00$
3	$0,27 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,66 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,00$
4	$0,59 \pm 0,19$	$0,14 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,00$	$0,66 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,00$
5	$0,60 \pm 0,11$	$0,11 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,73 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,06$
6	$0,31 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$1,27 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,05$
7	$0,28 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	$1,25 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$
8	$0,35 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,01$	$1,22 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$
9	$0,35 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,00$	$1,67 \pm 0,28$	$0,20 \pm 0,01$

10	0,34 ± 0,00	0,21 ± 0,06	0,01 ± 0,00	1,95 ± 0,00	0,17 ± 0,00
11	0,40 ± 0,17	0,19 ± 0,05	0,01 ± 0,00	1,38 ± 0,00	0,12 ± 0,00
12	0,23 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,37 ± 0,01	0,14 ± 0,01
13	0,38 ± 0,13	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,39 ± 0,00	0,22 ± 0,00
14	0,27 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,47 ± 0,06	0,15 ± 0,01
15	0,33 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,47 ± 0,00	0,17 ± 0,03
16	0,27 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,71 ± 0,09	0,14 ± 0,02
17	0,27 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,66 ± 0,00	0,13 ± 0,00
18	0,38 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,01 ± 0,00	1,59 ± 0,18	0,16 ± 0,01
19	0,30 ± 0,00	0,27 ± 0,11	0,01 ± 0,00	1,80 ± 0,00	0,17 ± 0,00
20	0,42 ± 0,00	0,29 ± 0,10	0,02 ± 0,00	1,97 ± 0,00	0,24 ± 0,00
21	0,41 ± 0,05	0,31 ± 0,00	0,02 ± 0,00	2,24 ± 0,00	0,24 ± 0,00
22	0,36 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,18 ± 0,00	0,21 ± 0,00
23	0,50 ± 0,00	0,24 ± 0,05	0,01 ± 0,00	2,37 ± 0,00	0,27 ± 0,00
24	0,43 ± 0,02	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,04 ± 0,02	0,18 ± 0,01
25	0,33 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,02 ± 0,00	1,88 ± 0,29	0,20 ± 0,03
26	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,02 ± 0,00	1,64 ± 0,06	0,18 ± 0,01
27	0,38 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,53 ± 0,04	0,16 ± 0,00
28	0,24 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,57 ± 0,09	0,17 ± 0,01
29	0,24 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,65 ± 0,27	0,14 ± 0,01
30	0,30 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,81 ± 0,06	0,15 ± 0,03
31	0,24 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,11 ± 0,00	0,12 ± 0,00
32	0,32 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,89 ± 0,24	0,16 ± 0,02
33	0,36 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,02 ± 0,00	2,23 ± 0,00	0,16 ± 0,00
34	0,33 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,01 ± 0,00	2,68 ± 0,01	0,17 ± 0,01
35	0,48 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,02 ± 0,01	2,82 ± 0,00	0,17 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,25 \pm 0,01$ mg/dL την

ημέρα 0 έως $2,82 \pm 0,00$ mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,64 \pm 0,01$ mg/dL τη 2^η ημέρα επώασης. Οι ενώσεις ακετόνη και 2-προπανόλη παράχθηκαν σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,08 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 και την 1^η ημέρα έως $0,31 \pm 0,00$ mg/dL την 21^η ημέρα επώασης και της 2-προπανόλης από $0,08 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,27 \pm 0,00$ mg/dL την 23^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *K. pneumoniae* παράγαγε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0,01-0,02 mg/dL.

Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 8** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλοβουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
1	$0,57 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
2	$0,58 \pm 0,00$	$1,56 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,01$
3	$0,58 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$
4	$0,63 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,00$
5	$0,60 \pm 0,00$	$1,66 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,23 \pm 0,00$
6	$0,61 \pm 0,02$	$1,73 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,23 \pm 0,00$
7	$0,65 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,15$	$0,04 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,03$
8	$0,60 \pm 0,01$	$1,93 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,01$
9	$0,61 \pm 0,02$	$2,03 \pm 0,14$	$0,04 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,01$
10	$0,62 \pm 0,01$	$2,05 \pm 0,18$	$0,04 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
11	$0,62 \pm 0,01$	$2,22 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,02$

12	0,61 ± 0,02	2,16 ± 0,21	0,04 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,35 ± 0,01
13	0,62 ± 0,01	2,34 ± 0,03	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,41 ± 0,01
14	0,63 ± 0,02	2,48 ± 0,08	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,45 ± 0,00
15	0,58 ± 0,00	2,28 ± 0,04	0,04 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,40 ± 0,02
16	0,62 ± 0,00	2,57 ± 0,07	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,57 ± 0,06
17	0,61 ± 0,00	2,48 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,50 ± 0,03
18	0,59 ± 0,01	2,33 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,58 ± 0,03
19	0,57 ± 0,01	2,49 ± 0,08	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,65 ± 0,07
20	0,59 ± 0,02	2,48 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,57 ± 0,03
21	0,62 ± 0,01	2,67 ± 0,11	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,56 ± 0,06
22	0,59 ± 0,00	2,56 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,53 ± 0,02
23	0,57 ± 0,01	2,35 ± 0,16	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,50 ± 0,01
24	0,57 ± 0,00	2,40 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,11 ± 0,03	0,51 ± 0,02
25	0,56 ± 0,02	2,39 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,56 ± 0,05
26	0,66 ± 0,05	3,00 ± 0,11	0,08 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,72 ± 0,01
27	0,59 ± 0,02	2,65 ± 0,17	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,57 ± 0,07
28	0,55 ± 0,00	2,51 ± 0,09	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,01
29	0,54 ± 0,01	2,50 ± 0,15	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,67 ± 0,06
30	0,53 ± 0,03	2,44 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,59 ± 0,07
31	0,55 ± 0,02	2,72 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,74 ± 0,00
32	0,52 ± 0,00	2,55 ± 0,09	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,61 ± 0,02
33	0,56 ± 0,02	2,68 ± 0,09	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,81 ± 0,08
34	0,54 ± 0,01	2,50 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,79 ± 0,00
35	0,55 ± 0,02	2,50 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,73 ± 0,09

Η *K. pneumoniae* παράγαγε εξίσου υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης, που κυμάνθηκαν από $0,52 \pm 0,00$ g/L την 32^η ημέρα έως $0,66 \pm 0,05$ g/L την 26^η ημέρα επώασης. Επίσης, από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της

προσδιορίστηκε την 3^η ημέρα επώασης με τιμή $1,55 \pm 0,03$ mg/dL και η υψηλότερη την 26^η ημέρα με τιμή $3,00 \pm 0,11$ mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλο-βουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από $0,11 \pm 0,01$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,81 \pm 0,08$ mg/dL την 33^η ημέρα επώασης. Η υψηλότερη συγκέντρωση της 1-βουτανόλης μετρήθηκε τη 2^η ημέρα επώασης με τιμή $0,21 \pm 0,01$ mg/dl. Στη συνέχεια, παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αρχίζουν να μειώνονται κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου με τη χαμηλότερη συγκέντρωση φτάνει την τιμή $0,07$ mg/dL τις τελευταίες ημέρες της επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από $0,02 \pm 0,00$ mg/dL τις τρεις πρώτες ημέρες έως $0,08$ mg/dL την 33^η και 34^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

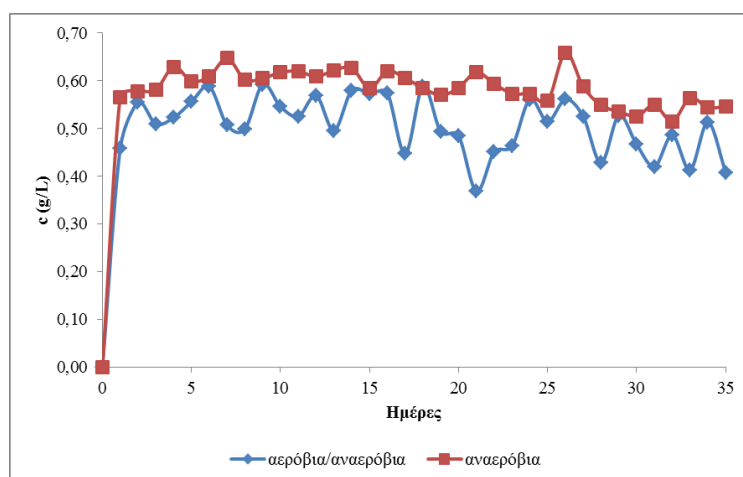
Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.	M.O. \pm S.D.
0	$0,07 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
1	$0,23 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,50 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,00$
2	$0,22 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,44 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,00$
3	$0,20 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02$
4	$0,25 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,56 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,00$
5	$0,22 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,86 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,00$
6	$0,29 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,89 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,04$
7	$0,20 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$1,16 \pm 0,09$	$0,15 \pm 0,02$
8	$0,25 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$1,39 \pm 0,14$	$0,13 \pm 0,02$
9	$0,38 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,12$	$0,01 \pm 0,00$	$1,46 \pm 0,39$	$0,27 \pm 0,08$
10	$0,37 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,00$	$1,42 \pm 0,37$	$0,21 \pm 0,05$
11	$0,34 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,00$	$1,61 \pm 0,25$	$0,18 \pm 0,02$
12	$0,30 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,00$	$1,46 \pm 0,44$	$0,20 \pm 0,06$
13	$0,29 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$1,13 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,00$

14	0,26 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,36 ± 0,04	0,20 ± 0,01
15	0,48 ± 0,00	0,21 ± 0,06	0,01 ± 0,00	1,92 ± 0,01	0,16 ± 0,01
16	0,26 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,88 ± 0,07	0,16 ± 0,01
17	0,45 ± 0,00	0,35 ± 0,06	0,01 ± 0,00	1,90 ± 0,24	0,16 ± 0,02
18	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,09	0,01 ± 0,00	1,88 ± 0,11	0,20 ± 0,01
19	0,30 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	2,00 ± 0,06	0,17 ± 0,01
20	0,71 ± 0,03	0,55 ± 0,05	0,02 ± 0,00	2,30 ± 0,17	0,16 ± 0,00
21	0,56 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,90 ± 0,06	0,20 ± 0,01
22	0,52 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,02 ± 0,01	2,03 ± 0,04	0,24 ± 0,02
23	0,85 ± 0,02	0,37 ± 0,12	0,02 ± 0,00	2,24 ± 0,11	0,21 ± 0,01
24	0,93 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,03 ± 0,01	1,96 ± 0,11	0,20 ± 0,00
25	0,82 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,76 ± 0,22	0,15 ± 0,02
26	0,34 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,02 ± 0,00	2,04 ± 0,27	0,16 ± 0,03
27	0,50 ± 0,16	0,20 ± 0,02	0,02 ± 0,00	1,65 ± 0,05	0,18 ± 0,01
28	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,91 ± 0,13	0,10 ± 0,01
29	0,37 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,02 ± 0,00	2,10 ± 0,09	0,13 ± 0,01
30	0,41 ± 0,18	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,01	1,92 ± 0,05	0,16 ± 0,04
31	0,27 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,00	2,20 ± 0,11	0,16 ± 0,02
32	0,77 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,02 ± 0,01	2,21 ± 0,07	0,24 ± 0,01
33	0,41 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,46 ± 0,08	0,16 ± 0,01
34	0,34 ± 0,04	0,19 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,33 ± 0,13	0,15 ± 0,00
35	0,70 ± 0,13	0,24 ± 0,00	0,03 ± 0,00	2,11 ± 0,10	0,23 ± 0,01

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά την αναερόβια επώαση ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,25 \pm 0,01$ mg/dL την ημέρα 0 έως $2,46 \pm 0,08$ mg/dL την 33^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,93 \pm 0,00$ mg/dL την 24^η ημέρα επώασης. Επίσης, τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,08 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,55 \pm 0,05$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης. Η χαμηλότερη συγκέντρωση της 2-προπανόλης ήταν $0,07 \pm 0,02$ mg/dL

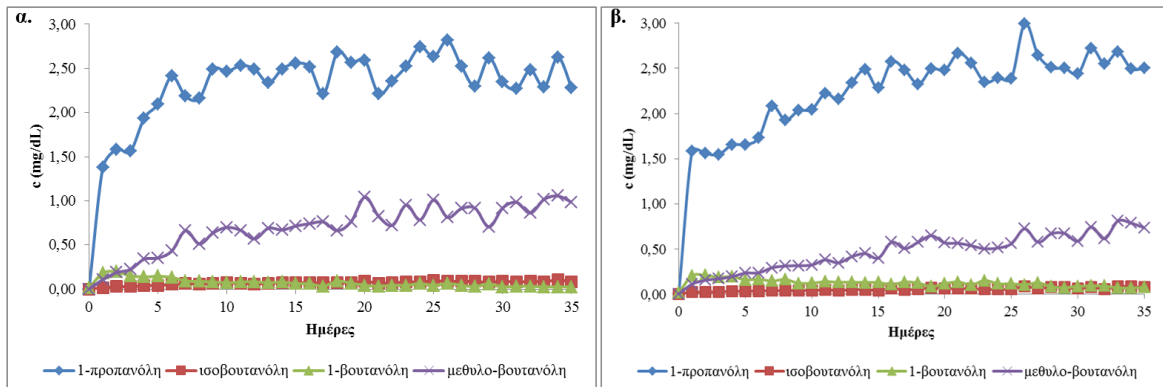
την 3^η ημέρα και η υψηλότερη $0,28 \pm 0,00$ mg/dL την 13^η ημέρα επώασης. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,01-0,03 mg/dL.

Τόσο κατά τις μικτές όσο και κατά τις αναερόβιες συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ήταν συγκρίσιμες (**Σχήμα 27**). Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη από την 1^η ημέρα επώασης, η οποία αυξήθηκε ως τη 2^η και τα επίπεδά της παρέμειναν σχετικά σταθερά καθ'όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.



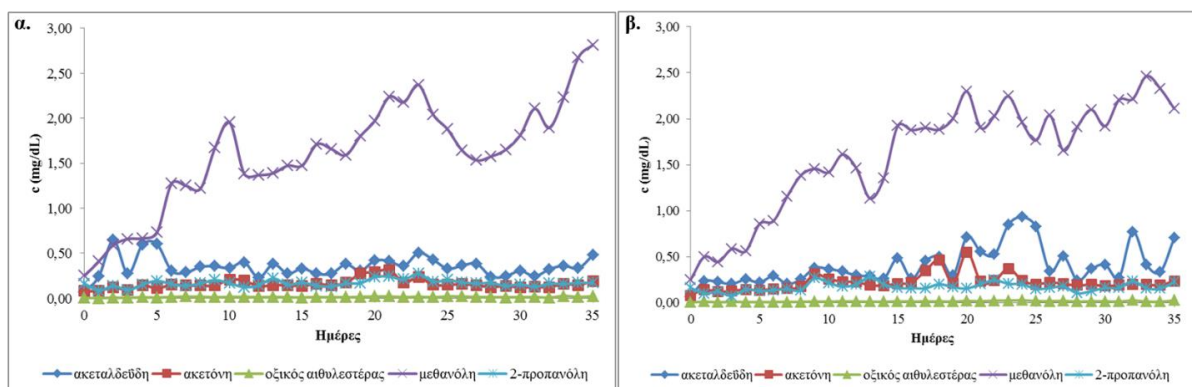
Σχήμα 27: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις ανώτερες αλκοόλες (**Σχήμα 28**) η 1-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθυλο-βουτανόλη, την 1-βουτανόλη και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η 1-προπανόλη αυξήθηκε ραγδαίως τις δύο πρώτες μέρες της επώασης και στη συνέχεια συνέχισε να αυξάνεται με πιο αργό ρυθμό. Η μεθυλο-βουτανόλη αυξανόταν με σταθερό ρυθμό, ενώ η ισοβουτανόλη είχε ένα σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια της επώασης. Αντιθέτως, τα επίπεδα της 1-βουτανόλης μειώνονταν αργά μετά από την αρχική τους αύξηση τις δύο πρώτες μέρες της επώασης.



Σχήμα 28: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 29**), η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη, τη 2-προπανόλη και τον οξικό αιθυλεστέρα, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Η μεθανόλη αυξήθηκε ραγδαίως μέχρι περίπου τη 10^η ημέρα επώασης και στη συνέχεια με πιο αργό ρυθμό μέχρι το τέλος της επώασης. Κατά τη μικτή επώαση, η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε σημαντικά μέχρι τη 2^η ημέρα, μειώθηκε την 3^η ημέρα και παρέμεινε σταθερή ως το τέλος. Κατά την αναερόβια επώαση, η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε με σταθερό ρυθμό έως την 24^η ημέρα κι έπειτα μειώθηκε με επίσης σταθερό ρυθμό. Η ακετόνη αυξήθηκε αργά έως περίπου την 20^η ημέρα και στη συνέχεια άρχισε να μειώνεται και στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ η 2-προπανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν ένα σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά την επωαστική περίοδο.



Σχήμα 29: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 35 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.1.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ, σε θερμοκρασία 37°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ, στους 37°C, για 48 ώρες. Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 10** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αερόβια επώαση.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,34 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,04 ± 0,00
12	0,58 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,00
24	0,57 ± 0,00	1,04 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,19 ± 0,02
48	0,58 ± 0,00	1,19 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,19 ± 0,01

Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 6 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,34-0,58 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Οι ανώτερες αλκοόλες άρχισαν να παράγονται, επίσης, μετά από 6 ώρες και εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,23-1,19 mg/dL) ήταν η 1-προπανόλη. Η 1-βουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη παράχθηκαν σε παρόμοια επίπεδα συγκεντρώσεων: 0,12-0,22 mg/dL για την 1-βουτανόλη και 0,04-0,19 mg/dL για τη μεθυλο-βουτανόλη, αντίστοιχα. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις παράχθηκαν από την ισοβουτανόλη και κυμάνθηκαν από 0,01-0,03 mg/dL. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες στους 25°C.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,00
6	0,49 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,29 ± 0,03	0,13 ± 0,00
12	0,25 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,29 ± 0,04	0,10 ± 0,00
24	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,10 ± 0,00
48	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,10 ± 0,00

Σε αντίθεση με τις καλλιέργειες στους 25°C υπό αερόβια επώαση, από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C ήταν η ακεταλδεΐδη (0,09-0,49 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,23-0,38 mg/dL. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,10-0,22 mg/dL και τα αντίστοιχα της ακετόνης από 0,08-0,10 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από το όριο ανίχνευσης (LOD) και δεν συμπεριλαμβάνονται στον **Πίνακα 10**. Γενικά, οι συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τους 25°C.

Στον **Πίνακα 11** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 12** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, στους 37°C.

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,34 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,03 ± 0,00
12	0,58 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,00
24	0,61 ± 0,00	0,78 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,13 ± 0,00
48	0,62 ± 0,01	0,79 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,14 ± 0,00

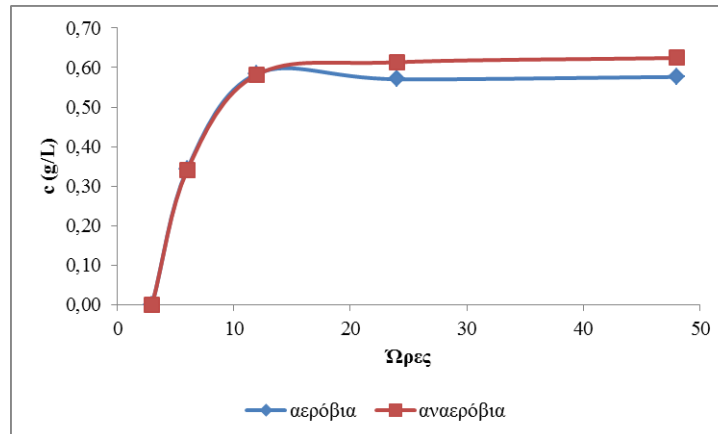
Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 6 ώρες αναερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,34-0,62 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Οι ανώτερες αλκοόλες άρχισαν να παράγονται, επίσης, μετά από 6 ώρες και εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,20-0,79 mg/dL) ήταν η 1-προπανόλη. Ακολούθησε η 1-βουτανόλη με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,11-0,24 mg/dL κι έπειτα η μεθυλο-βουτανόλη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,03-0,14 mg/dL. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις παράχθηκαν από την ισοβουτανόλη και κυμάνθηκαν από 0,01-0,03 mg/dL. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες στους 25°C.

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,00
6	0,54 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,13 ± 0,00
12	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,04	0,11 ± 0,00
24	0,27 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,49 ± 0,04	0,15 ± 0,00
48	0,24 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,14 ± 0,00

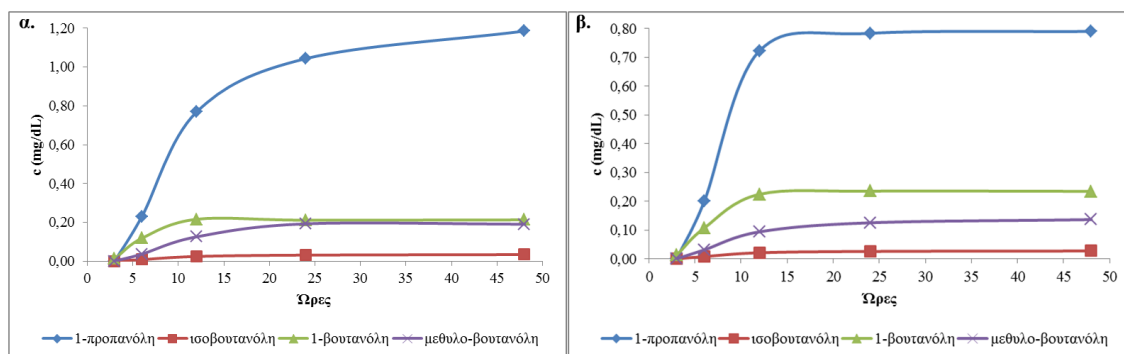
Σε αντίθεση με τις αερόβιες καλλιέργειες στους 37°C, από τα πτητικά συστατικά στις καλλιέργειες υπό αναερόβια επώαση, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παράχθηκαν η ακεταλδεΐδη (0,14-0,54 mg/dL) και η μεθανόλη (0,28-0,55 mg/dL) (Πίνακας 12). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,11-0,23 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,11-0,17 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,01 mg/dL). Γενικά, οι συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων στους 37°C υπό αναερόβιες συνθήκες ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τους 25°C.

Τόσο κατά την αερόβια όσο και κατά την αναερόβια επώαση, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ήταν συγκρίσιμες (Σχήμα 30). Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 6 ώρες επώασης, η οποία αυξήθηκε ως τις 12 ώρες και παρέμεινε σταθερή ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 30: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

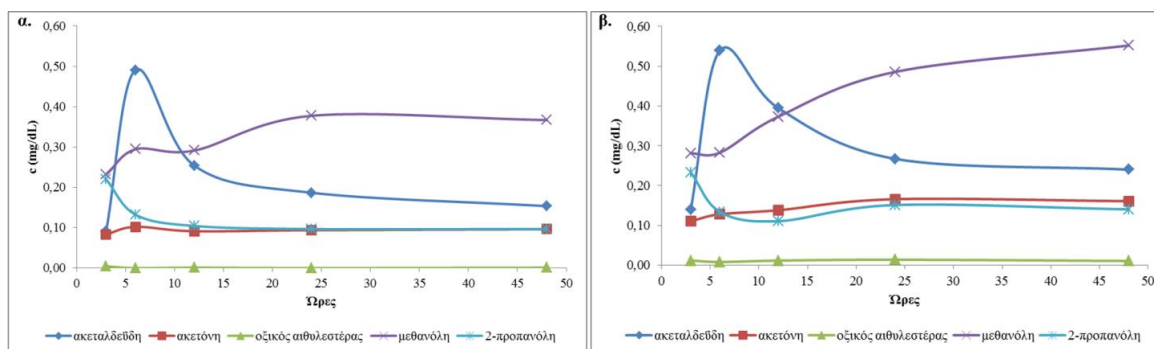
Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 31) η 1-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την 1-βουτανόλη, τη μεθυλο-βουτανόλη, και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από την 1-προπανόλη, τα επίπεδα της οποίας ήταν λίγο υψηλότερα κατά την αερόβια επώαση. Κατά την αερόβια επώαση, η 1-προπανόλη αυξανόταν με σταθερό ρυθμό ως το τέλος, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξήθηκε ραγδαίως μετά από 12 ώρες επώασης και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ως το τέλος. Η 1-βουτανόλη, η μεθυλο-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη είχαν έναν αργό ρυθμό παραγωγής έως τις 12 ώρες, ο οποίος παρέμεινε σταθερός ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 31: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 32), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την μεθανόλη, τη 2-

προπανόλη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από την ακετόνη και τη μεθανόλη τα επίπεδα των οποίων ήταν λίγο υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση. Η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε ραγδαίως μετά από 6 ώρες επώασης, μειώθηκε μετά από 24 ώρες και παρέμεινε σταθερή ως το τέλος της επώασης. Η μεθανόλη αυξήθηκε με αργό ρυθμό μετά από 24 ώρες και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ως το τέλος. Κατά την αερόβια επώαση, η 2-προπανόλη μειωνόταν με αργό ρυθμό ως το τέλος της επώασης, ενώ κατά την αναερόβια επώαση, άρχισε να μειώνεται μέχρι τις 12 ώρες κι έπειτα αυξήθηκε κι έμεινε σταθερή ως το τέλος. Η ακετόνη είχε έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια των 48 ωρών.



Σχήμα 32: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρας, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.1.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 4°C, για 32 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη. Στους Πίνακες 13 και 14 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,23 ± 0,02
16	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,04	0,13 ± 0,00
24	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,19 ± 0,01
32	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,02	0,12 ± 0,01

Η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,26-0,36 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,12-0,23 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,07-0,12 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,09-0,10 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

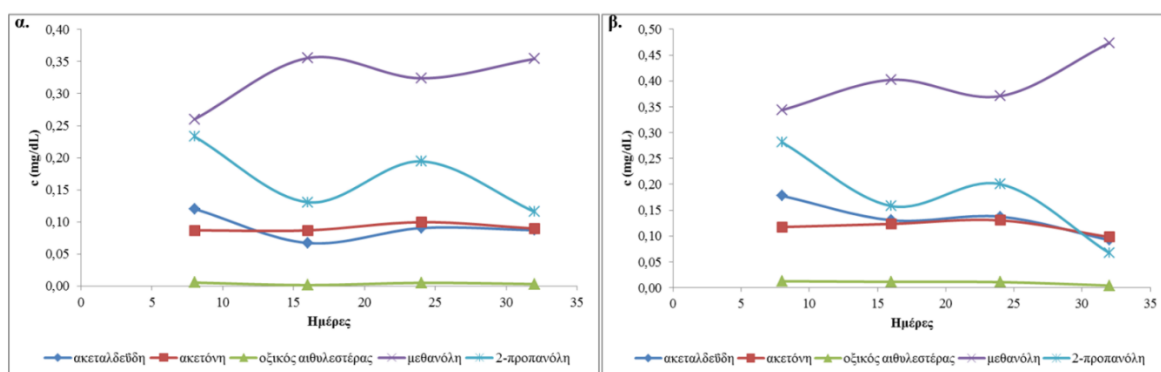
Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,34 ± 0,03	0,28 ± 0,00
16	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,40 ± 0,04	0,16 ± 0,01
24	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,02	0,20 ± 0,02
32	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,03	0,07 ± 0,01

Κατά την αναερόβια επώαση, επίσης, η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,34-0,47 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,07-0,28 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με

συγκεντρώσεις 0,09-0,18 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,10-0,13 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

Και στις δύο συνθήκες επώασης, η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη 2-προπανόλη, την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα (Σχήμα 33), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη τα επίπεδα της οποίας ήταν λίγο υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση. Η μεθανόλη αυξανόταν σταδιακά κατά τη διάρκεια των 32 ημερών επώασης, η 2-προπανόλη παρουσίασε μία αυξομείωση στα επίπεδά της, ενώ οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης μειώνονταν σταθερά κατά τη διάρκεια της επώασης. Τέλος, η ακετόνη είχε έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 33: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 32 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ.

3.3.2. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L

3.3.2.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ με προσθήκη γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 5 g/L, στους 25°C, για 25 ημέρες. Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη,

1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 16** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,35 ± 0,01	1,09 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,11 ± 0,00
2	0,39 ± 0,01	1,25 ± 0,09	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,01
3	0,44 ± 0,01	1,48 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,19 ± 0,01
4	0,42 ± 0,02	1,24 ± 0,07	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,16 ± 0,01
5	0,40 ± 0,01	1,22 ± 0,07	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,22 ± 0,03
6	0,39 ± 0,02	1,20 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,01
7	0,38 ± 0,01	1,13 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,18 ± 0,03
8	0,40 ± 0,00	1,21 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00
9	0,41 ± 0,01	1,19 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,00
10	0,43 ± 0,00	1,31 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,01
11	0,41 ± 0,01	1,30 ± 0,10	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,16 ± 0,00
12	0,35 ± 0,02	1,12 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,00
13	0,35 ± 0,01	1,14 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,01
14	0,42 ± 0,03	1,31 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,00
15	0,39 ± 0,01	1,24 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,20 ± 0,02
16	0,35 ± 0,00	1,15 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,17 ± 0,01
17	0,34 ± 0,00	1,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,01

18	0,32 ± 0,02	0,98 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,22 ± 0,03
19	0,36 ± 0,00	1,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,19 ± 0,01
20	0,36 ± 0,00	1,15 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,00
21	0,37 ± 0,00	1,16 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,01
22	0,36 ± 0,00	1,32 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,01
23	0,36 ± 0,00	1,29 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,00
24	0,33 ± 0,02	1,05 ± 0,11	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,20 ± 0,04
25	0,36 ± 0,01	1,22 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,17 ± 0,02

Η *K. pneumoniae* σε θεραπευτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης 5 g/L υπό μικτές συνθήκες επώασης παράγαγε αιθανόλη με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,32 ± 0,02 g/L τη 18^η ημέρα έως 0,44 ± 0,01 g/L την 3^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε τη 18^η ημέρα επώασης με τιμή 0,98 ± 0,04 mg/dL και η υψηλότερη την 3^η ημέρα με τιμή 1,48 ± 0,08 mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλο-βουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από 0,11 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,22 mg/dL την 5^η, 14^η και 18^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της 1-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,06 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,12 mg/dL τη 10^η και 14^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από 0,02-0,03 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.

Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θεραπευτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,26 ± 0,00
1	0,24 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,12 ± 0,00
2	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,16 ± 0,00

3	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,20 ± 0,01
4	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,03	0,19 ± 0,03
5	0,30 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,27 ± 0,04
6	0,22 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,47 ± 0,02	0,21 ± 0,00
7	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,28 ± 0,03
8	0,34 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,02	0,37 ± 0,03
9	0,36 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,03	0,36 ± 0,01
10	0,41 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,49 ± 0,05	0,37 ± 0,04
11	0,36 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,58 ± 0,05	0,42 ± 0,01
12	0,33 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0,02
13	0,32 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,53 ± 0,07	0,32 ± 0,02
14	0,37 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,65 ± 0,09	0,48 ± 0,06
15	0,37 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,44 ± 0,03
16	0,34 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,52 ± 0,03	0,35 ± 0,06
17	0,35 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,02	0,44 ± 0,05
18	0,33 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,76 ± 0,07	0,39 ± 0,04
19	0,37 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,06	0,54 ± 0,00
20	0,44 ± 0,03	0,30 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,68 ± 0,02	0,50 ± 0,00
21	0,51 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,69 ± 0,04	0,46 ± 0,03
22	0,48 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,69 ± 0,00	0,46 ± 0,00
23	0,51 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,70 ± 0,10	0,49 ± 0,00
24	0,52 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,82 ± 0,07	0,43 ± 0,02
25	0,51 ± 0,04	0,30 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,73 ± 0,06	0,44 ± 0,02

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,22 \pm 0,01$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,82 \pm 0,07$ mg/dL την 24^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,10 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,52 \pm 0,02$ mg/dL την 24^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,12 \pm 0,00$

mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,54 \pm 0,00$ mg/dL τη 19^η ημέρα επώασης και της ακετόνης από $0,10 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,32 \pm 0,03$ mg/dL την 23^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *K. pneumoniae* παράγαγε αμελητέες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0-0,01 mg/dL.

Στον **Πίνακα 17** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 18** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση.

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τοπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,37 ± 0,00	1,32 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,11 ± 0,00
2	0,39 ± 0,00	1,28 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,13 ± 0,00
3	0,43 ± 0,04	1,47 ± 0,14	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,00
4	0,43 ± 0,04	1,47 ± 0,18	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,02
5	0,40 ± 0,01	1,28 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,16 ± 0,02
6	0,41 ± 0,00	1,49 ± 0,08	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,01
7	0,40 ± 0,01	1,36 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,01
8	0,40 ± 0,01	1,26 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,00
9	0,41 ± 0,00	1,32 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,13 ± 0,00
10	0,37 ± 0,04	1,23 ± 0,11	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01
11	0,41 ± 0,01	1,35 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,00
12	0,37 ± 0,00	1,33 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,01
13	0,38 ± 0,01	1,41 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,16 ± 0,00
14	0,39 ± 0,01	1,32 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,01

15	0,38 ± 0,00	1,27 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,13 ± 0,00
16	0,36 ± 0,01	1,18 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,00
17	0,37 ± 0,01	1,24 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,13 ± 0,00
18	0,37 ± 0,01	1,26 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,00
19	0,37 ± 0,02	1,21 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,03
20	0,38 ± 0,01	1,26 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,01
21	0,37 ± 0,00	1,30 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,00
22	0,36 ± 0,01	1,25 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,01
23	0,37 ± 0,01	1,28 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,01
24	0,38 ± 0,00	1,33 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,00
25	0,35 ± 0,00	1,20 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,00

Η *K. pneumoniae* σε θεραπευτικό υλικό ΒΗΙ συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L υπό αναερόβια επώαση παρήγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,35 ± 0,00 g/L την 25^η ημέρα έως 0,43 ± 0,04 g/L την 3^η και 4^η ημέρα επώασης. Επίσης, από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 16^η ημέρα επώασης με τιμή 1,18 ± 0,02 mg/dL και η υψηλότερη την 6^η ημέρα με τιμή 1,49 ± 0,08 mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλοβουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από 0,11 mg/dL την 1^η και τη 10^η ημέρα έως 0,16 mg/dL την 4^η, 5^η και τη 13^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της 1-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,06 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα επώασης έως 0,10 ± 0,00 mg/dL την 11^η και 14^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, με τιμή 0,02 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης.

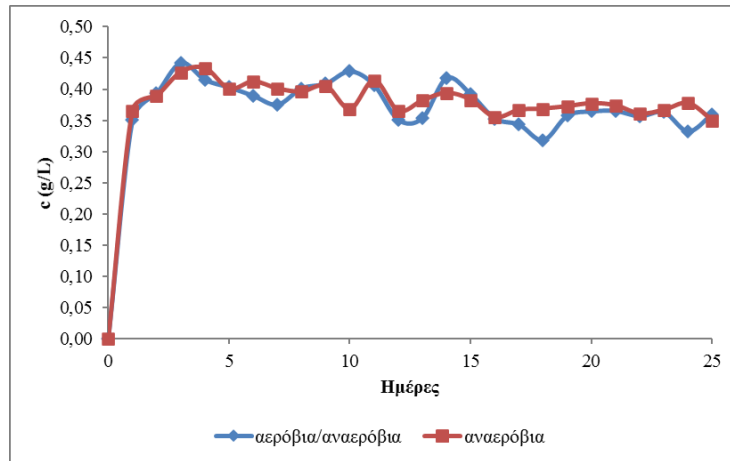
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,26 ± 0,00
1	0,28 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,14 ± 0,01
2	0,20 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,00	0,15 ± 0,00
3	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,44 ± 0,11	0,17 ± 0,02
4	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,06	0,17 ± 0,01
5	0,30 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,22 ± 0,00
6	0,23 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,21 ± 0,02
7	0,29 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,43 ± 0,03	0,27 ± 0,03
8	0,34 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,49 ± 0,04	0,28 ± 0,01
9	0,37 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,31 ± 0,00
10	0,42 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,53 ± 0,06	0,28 ± 0,05
11	0,35 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,54 ± 0,03	0,32 ± 0,03
12	0,42 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,53 ± 0,05	0,27 ± 0,06
13	0,32 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,23 ± 0,01
14	0,41 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,03	0,32 ± 0,07
15	0,45 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,66 ± 0,04	0,34 ± 0,05
16	0,42 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,67 ± 0,01	0,26 ± 0,05
17	0,45 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,03	0,23 ± 0,00
18	0,43 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,96 ± 0,00	0,20 ± 0,01
19	0,38 ± 0,11	0,19 ± 0,08	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,33	0,15 ± 0,05
20	0,53 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,86 ± 0,01	0,29 ± 0,03

21	0,54 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,06 ± 0,04	0,22 ± 0,01
22	0,57 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,01 ± 0,00	1,05 ± 0,02	0,36 ± 0,17
23	0,56 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,01 ± 0,00	1,00 ± 0,04	0,24 ± 0,05
24	0,56 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,14 ± 0,02	0,19 ± 0,01
25	0,52 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,03 ± 0,06	0,21 ± 0,05

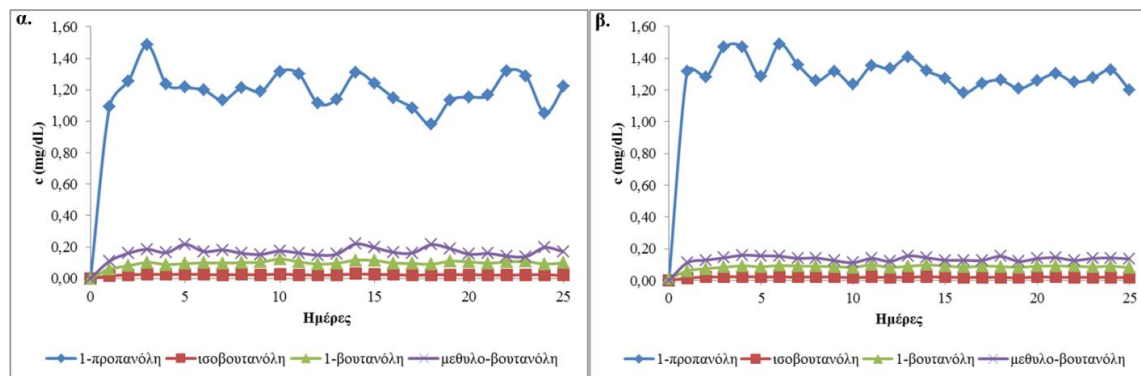
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,22 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $1,14 \pm 0,02$ mg/dL την 24^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,10 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,57 \pm 0,04$ mg/dL την 22^η ημέρα επώασης. Η ακετόνη και η 2-προπανόλη παρήχθησαν σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,10 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,34 \pm 0,03$ mg/dL την 22^η ημέρα επώασης και της 2-προπανόλης από $0,14 \pm 0,01$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,36 \pm 0,17$ mg/dL την 22^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *K. pneumoniae* παρήγαγε αμελητέες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από $0-0,01$ mg/dL.

Τόσο κατά τις μικτές όσο και κατά τις αναερόβιες συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ήταν συγκρίσιμες (**Σχήμα 34**). Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη από την 1^η ημέρα επώασης, η οποία αυξήθηκε ως την 3^η ημέρα και στη συνέχεια τα επίπεδά της παρέμειναν σχετικά σταθερά καθ'όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L ήταν χαμηλότερες από εκείνες σε θρεπτικό υλικό BHI χωρίς προσθήκη γλυκόζης και στις δύο συνθήκες επώασης.



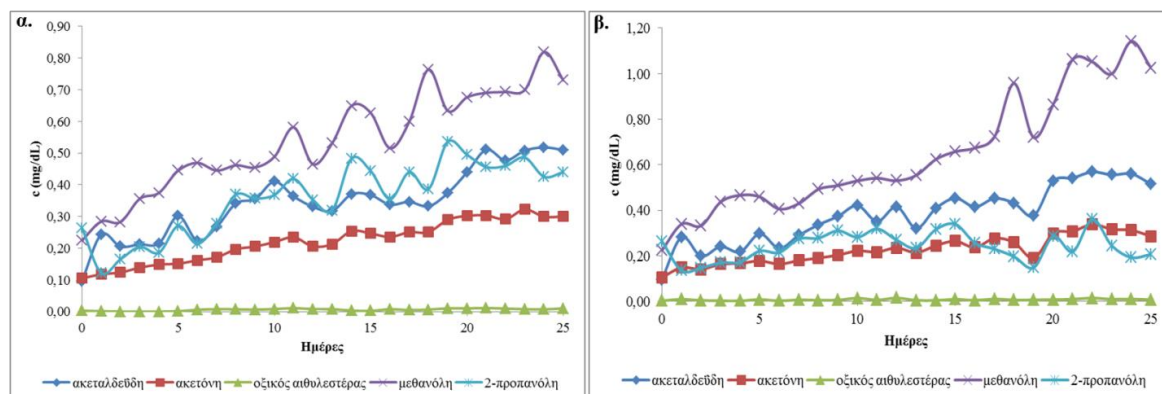
Σχήμα 34: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L.

Από τις ανώτερες αλκοόλες (**Σχήμα 35**) η 1-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθυλο-βουτανόλη, την 1-βουτανόλη και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η 1-προπανόλη αυξήθηκε έως την 3^η ημέρα κατά την αερόβια/αναερόβια και ως την 6^η ημέρα κατά την αναερόβια επώαση και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ως το τέλος της επωαστικής περιόδου. Οι υπόλοιπες ανώτερες αλκοόλες (μεθυλο-βουτανόλη, 1-βουτανόλη και ισοβουτανόλη) παράχθηκαν με σταθερό ρυθμό και στις δύο επωαστικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L ήταν χαμηλότερες από εκείνες σε θρεπτικό υλικό BHI χωρίς προσθήκη γλυκόζης και στις δύο συνθήκες επώασης. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L, τα επίπεδα της 1-προπανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης παρέμειναν σταθερά μετά την 3^η-6^η ημέρα επώασης, ενώ στις καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη, οι συγκεντρώσεις αυτών των δύο αλκοολών αυξάνονταν με σταθερό ρυθμό κατά τη διάρκεια της επώασης. Τέλος, στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L, η 1-βουτανόλη είχε σταθερό ρυθμό παραγωγής και στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ στις καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη, τα επίπεδά της άρχισαν να μειώνονται σταδιακά από την 3^η ημέρα επώασης.



Σχήμα 35: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 36**), η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες επώασης. Κατά τη μικτή επώαση, ακολούθησε η ακεταλδεΐδη μαζί με τη 2-προπανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας, ενώ κατά την αναερόβια επώαση ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη μαζί με τη 2-προπανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Οι συγκεντρώσεις τους ήταν συγκρίσιμες και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη και τη 2-προπανόλη, των οποίων οι συγκεντρώσεις ήταν λίγο υψηλότερες κατά την αναερόβια επώαση. Η μεθανόλη, η ακεταλδεΐδη και η ακετόνη αυξάνονταν σταδιακά και στις δύο συνθήκες επώασης. Η 2-προπανόλη αυξανόταν με αργό ρυθμό κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση, ενώ κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση είχε σταθερό ρυθμό παραγωγής. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες επώασης. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L, οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της μεθανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες χωρίς επιπλέον γλυκόζη και στις δύο συνθήκες επώασης. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης ήταν συγκρίσιμες στις δύο διαφορετικές καλλιέργειες κατά τη μικτή επώαση και υψηλότερες στις καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη υπό αναερόβια επώαση. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L, οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες χωρίς επιπλέον γλυκόζη και στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα ήταν εξίσου αμελητέες και στις δύο διαφορετικές καλλιέργειες.



Σχήμα 36: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L.

3.3.2.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L, στους 4°C, για 8 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη. Στους Πίνακες 19 και 20 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
2	0,17 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,41 ± 0,00
4	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,02
8	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,00

Η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,25-0,41 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,23-0,30 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,09-0,17 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,11-0,12 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

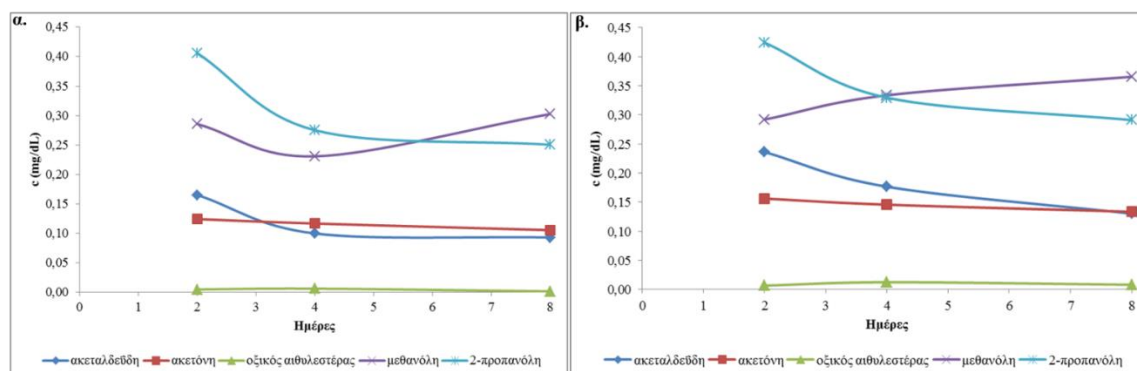
Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τοπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
2	0,24 ± 0,06	0,16 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,29 ± 0,05	0,42 ± 0,01
4	0,18 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
8	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,05	0,29 ± 0,00

Κατά την αναερόβια επώαση, επίσης, η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,29-0,42 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,29-0,37 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,13-0,24 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,13-0,16 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0,01 mg/dL).

Και στις δύο συνθήκες επώασης, η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθανόλη, την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα (**Σχήμα 37**), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης και της ακεταλδεΐδης μειώνονταν μέχρι την 4^η ημέρα και στη συνέχεια παρέμειναν σταθερές ως το τέλος της επώασης. Κατά τη μικτή επώαση, η μεθανόλη μειώθηκε από τη 2^η ως την 4^η ημέρα και στη συνέχεια αυξήθηκε ως την 8^η ημέρα επώασης, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξανόταν σταδιακά ως το τέλος της επώασης. Τέλος, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου. Οι συγκεντρώσεις των πτητικών ήταν συγκρίσιμες και στις δύο καλλιέργειες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις

γλυκόζης, εκτός από τη 2-προπανόλη, τα επίπεδα της οποίας ήταν υψηλότερα στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L.



Σχήμα 37: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρας, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 8 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L.

3.3.3. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L

3.3.3.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό BHI με προσθήκη γλυκόζης τελικής συγκέντρωσης 10 g/L, στους 25°C, για 25 ημέρες. Στον **Πίνακα 21** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 22** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,30 ± 0,00	1,47 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,00
2	0,34 ± 0,00	1,60 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,17 ± 0,00
3	0,34 ± 0,00	1,56 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,18 ± 0,00
4	0,36 ± 0,03	1,61 ± 0,13	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,01
5	0,34 ± 0,01	1,51 ± 0,07	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,25 ± 0,02
6	0,39 ± 0,00	1,79 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,22 ± 0,00
7	0,35 ± 0,00	1,59 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,19 ± 0,00
8	0,35 ± 0,03	1,63 ± 0,18	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,25 ± 0,07
9	0,36 ± 0,00	1,71 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,01
10	0,32 ± 0,00	1,45 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,20 ± 0,02
11	0,36 ± 0,00	1,62 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,01
12	0,37 ± 0,02	1,71 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,01
13	0,36 ± 0,02	1,68 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,00
14	0,32 ± 0,01	1,50 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,17 ± 0,00
15	0,36 ± 0,00	1,67 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,22 ± 0,03
16	0,31 ± 0,01	1,44 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,00
17	0,31 ± 0,00	1,47 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,01
18	0,29 ± 0,01	1,34 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,24 ± 0,00
19	0,28 ± 0,03	1,33 ± 0,16	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,05
20	0,32 ± 0,00	1,52 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,20 ± 0,00

21	0,31 ± 0,00	1,45 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,01
22	0,30 ± 0,00	1,41 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,01
23	0,28 ± 0,02	1,29 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,20 ± 0,04
24	0,31 ± 0,00	1,48 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,00
25	0,31 ± 0,01	1,49 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,17 ± 0,01

Η *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης 10 g/L υπό μικτές συνθήκες επώασης παράγαγε αιθανόλη με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,28 g/L τη 19^η και 23^η ημέρα έως 0,39 ± 0,00 g/L την 6^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 23^η ημέρα επώασης με τιμή 1,29 ± 0,09 mg/dL και η υψηλότερη την 6^η ημέρα με τιμή 1,79 ± 0,01 mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλο-βουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από 0,13 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,25 mg/dL την 5^η και 8^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της 1-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,05 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,09 ± 0,00 mg/dL τη 15^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από 0,02-0,03 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.

Πίνακας 22: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τοπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,07	0,45 ± 0,00
1	0,24 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,15 ± 0,01
2	0,21 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,18 ± 0,00
3	0,19 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,19 ± 0,01
4	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,02	0,19 ± 0,00
5	0,32 ± 0,03	0,17 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,06	0,23 ± 0,02

6	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,00	0,29 ± 0,02
7	0,28 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,29 ± 0,02
8	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,66 ± 0,14	0,27 ± 0,01
9	0,36 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,62 ± 0,01	0,34 ± 0,02
10	0,24 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,58 ± 0,06	0,26 ± 0,04
11	0,33 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,05	0,34 ± 0,03
12	0,32 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,58 ± 0,02	0,41 ± 0,02
13	0,32 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,68 ± 0,05	0,39 ± 0,01
14	0,34 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,05	0,41 ± 0,01
15	0,40 ± 0,06	0,28 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,82 ± 0,12	0,34 ± 0,16
16	0,37 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,66 ± 0,02	0,38 ± 0,06
17	0,33 ± 0,02	0,28 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,03	0,36 ± 0,11
18	0,31 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,69 ± 0,05	0,31 ± 0,03
19	0,37 ± 0,05	0,29 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,79 ± 0,14	0,41 ± 0,13
20	0,39 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,69 ± 0,02	0,51 ± 0,01
21	0,45 ± 0,01	0,34 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,84 ± 0,07	0,55 ± 0,03
22	0,55 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,77 ± 0,02	0,52 ± 0,01
23	0,49 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,88 ± 0,11	0,44 ± 0,10
24	0,49 ± 0,03	0,34 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,91 ± 0,01	0,39 ± 0,01
25	0,44 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,85 ± 0,02	0,52 ± 0,02

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από 0,29 mg/dL την ημέρα 0 και την 1^η ημέρα έως 0,91 ± 0,01 mg/dL την 24^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,14 ± 0,00 mg/dL την ημέρα 0 έως 0,55 ± 0,00 mg/dL την 22^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,15 ± 0,01 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,55 ± 0,03 mg/dL την 21^η ημέρα επώασης και της ακετόνης από 0,14 ± 0,00 mg/dL τις 3 πρώτες ημέρες έως 0,36 ± 0,01

mg/dL την 22^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *K. pneumoniae* παράγαγε αμελητέες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0-0,01 mg/dL.

Στον **Πίνακα 23** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 24** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση.

Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,32 ± 0,00	1,65 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,12 ± 0,00
2	0,35 ± 0,00	1,67 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,15 ± 0,00
3	0,37 ± 0,00	1,82 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,17 ± 0,01
4	0,35 ± 0,00	1,67 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,20 ± 0,01
5	0,36 ± 0,01	1,67 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,19 ± 0,02
6	0,40 ± 0,01	1,94 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,01
7	0,35 ± 0,01	1,63 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,17 ± 0,00
8	0,32 ± 0,00	1,47 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,17 ± 0,03
9	0,35 ± 0,00	1,66 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,15 ± 0,01
10	0,34 ± 0,01	1,71 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,19 ± 0,01
11	0,37 ± 0,00	1,75 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,00
12	0,38 ± 0,00	1,92 ± 0,07	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,01
13	0,37 ± 0,01	1,89 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,22 ± 0,00
14	0,34 ± 0,00	1,78 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,17 ± 0,01
15	0,37 ± 0,02	1,87 ± 0,14	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,03

16	0,34 ± 0,02	1,76 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,16 ± 0,00
17	0,32 ± 0,00	1,56 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,15 ± 0,01
18	0,33 ± 0,01	1,65 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,19 ± 0,02
19	0,32 ± 0,01	1,59 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,15 ± 0,01
20	0,33 ± 0,00	1,59 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,16 ± 0,00
21	0,33 ± 0,01	1,67 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,00
22	0,35 ± 0,03	1,66 ± 0,12	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,00
23	0,26 ± 0,07	1,20 ± 0,38	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,05
24	0,34 ± 0,00	1,64 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,17 ± 0,00
25	0,33 ± 0,00	1,65 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,00

Η *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L υπό αναερόβια επώαση παρήγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,26 ± 0,07 g/L την 23^η ημέρα έως 0,40 ± 0,01 g/L την 6^η ημέρα επώασης. Επίσης, από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 23^η ημέρα επώασης με τιμή 1,20 ± 0,38 mg/dL και η υψηλότερη την 6^η ημέρα με τιμή 1,94 ± 0,08 mg/dL. Ακολούθησε η μεθυλοβουτανόλη τα επίπεδα της οποίας κυμάνθηκαν από 0,12 mg/dL την 1^η και την 23^η ημέρα έως 0,22 ± 0,00 mg/dL τη 13^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της 1-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,05 έως 0,08 ± 0,00 mg/dL, ενώ οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης κυμαίνονταν από 0,02 έως 0,03 mg/dL καθ'όλη τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης.

Πίνακας 24: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

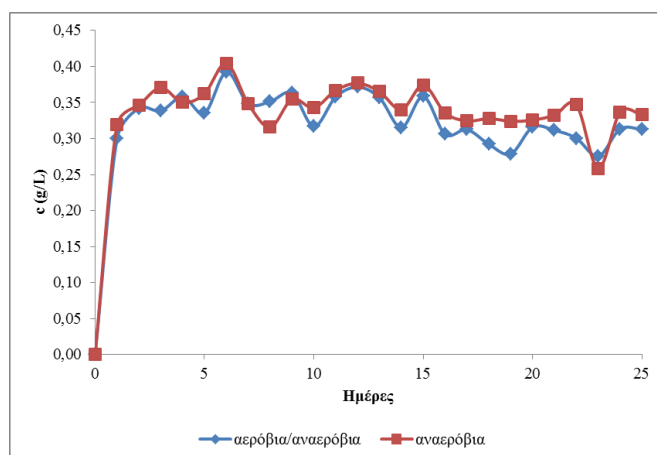
Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,07	0,45 ± 0,00
1	0,29 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,18 ± 0,01

2	0,22 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,02	0,19 ± 0,01
3	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,49 ± 0,11	0,21 ± 0,01
4	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,20 ± 0,01
5	0,29 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,49 ± 0,03	0,24 ± 0,00
6	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,49 ± 0,06	0,25 ± 0,02
7	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,02	0,28 ± 0,05
8	0,19 ± 0,07	0,13 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,22	0,12 ± 0,08
9	0,45 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,68 ± 0,02	0,34 ± 0,04
10	0,31 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,66 ± 0,08	0,24 ± 0,00
11	0,36 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,62 ± 0,05	0,30 ± 0,00
12	0,41 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,67 ± 0,04	0,44 ± 0,01
13	0,36 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,06	0,37 ± 0,10
14	0,44 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,61 ± 0,05	0,51 ± 0,03
15	0,49 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,73 ± 0,02	0,43 ± 0,06
16	0,43 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,59 ± 0,05	0,31 ± 0,13
17	0,47 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,70 ± 0,04	0,35 ± 0,00
18	0,47 ± 0,03	0,30 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,81 ± 0,12	0,39 ± 0,12
19	0,56 ± 0,06	0,34 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,85 ± 0,11	0,39 ± 0,05
20	0,56 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,82 ± 0,05	0,46 ± 0,03
21	0,57 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,80 ± 0,08	0,59 ± 0,02
22	0,54 ± 0,04	0,33 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,75 ± 0,11	0,45 ± 0,17
23	0,46 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,79 ± 0,24	0,43 ± 0,08
24	0,56 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,87 ± 0,01	0,52 ± 0,04
25	0,59 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,92 ± 0,00	0,56 ± 0,04

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,29 \pm 0,07$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,92 \pm 0,00$ mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης. Ακολούθησαν η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,14 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα

0 έως $0,59 \pm 0,01$ mg/dL την 25^η ημέρα επώασης και η 2-προπανόλη με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,12 \pm 0,08$ mg/dL την 8^η ημέρα έως $0,59 \pm 0,02$ mg/dL την 21^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,13 \pm 0,06$ mg/dL την 8^η ημέρα έως $0,39 \pm 0,00$ mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης. Τέλος, η *K. pneumoniae* παράγαγε αμελητέες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0,01-0,02 mg/dL κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης.

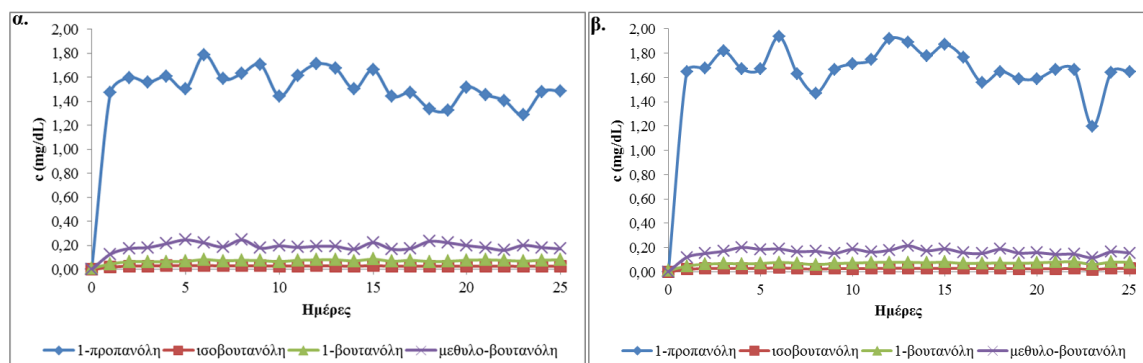
Τόσο κατά τις μικτές όσο και κατά τις αναερόβιες συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης ήταν συγκρίσιμες (**Σχήμα 38**). Η *K. pneumoniae* άρχισε να παράγει αιθανόλη από την 1^η ημέρα επώασης, η οποία αυξήθηκε ως την 6^η ημέρα και στη συνέχεια τα επίπεδά της παρέμειναν σχετικά σταθερά καθ'όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ συγκέντρωσης γλυκόζης 5 και 10 g/L ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στις καλλιέργειες χωρίς γλυκόζη.



Σχήμα 38: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L.

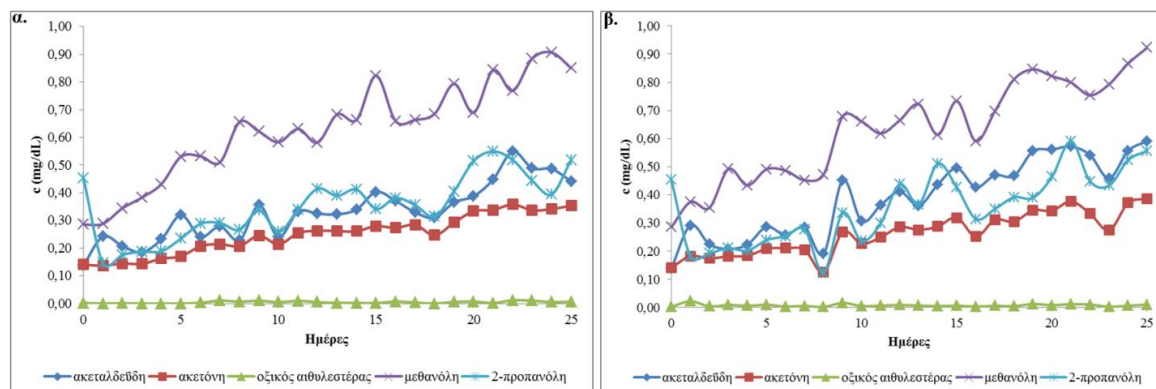
Από τις ανώτερες αλκοόλες (**Σχήμα 39**) η 1-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθυλο-βουτανόλη, την 1-βουτανόλη και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η 1-προπανόλη αυξήθηκε έως την 6^η ημέρα και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ως το τέλος της επωαστικής περιόδου. Οι υπόλοιπες ανώτερες αλκοόλες (μεθυλο-βουτανόλη, 1-βουτανόλη και ισοβουτανόλη) παράχθηκαν με σταθερό ρυθμό και στις δύο επωαστικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ συγκέντρωσης γλυκόζης 5 και 10

g/L ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους. Παρόμοιος ήταν και ο ρυθμός παραγωγής των αλκοολών αυτών και στις δύο διαφορετικές καλλιέργειες και για τις δύο συνθήκες επώασης.



Σχήμα 39: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 40**), η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες επώασης. Ακολούθησαν η ακεταλδεΐδη μαζί με τη 2-προπανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών ήταν συγκρίσιμες και στις δύο συνθήκες επώασης. Οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης, της ακεταλδεΐδης, της 2-προπανόλης και της ακετόνης αυξάνονταν με σταθερό ρυθμό και στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες επώασης. Στις καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 5 και 10 g/L, οι συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους, με εξαίρεση τη 2-προπανόλη, τα επίπεδα της οποίας ήταν υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση στις καλλιέργειες με γλυκόζη 10 g/L σε σύγκριση με τις αντίστοιχες στις καλλιέργειες με γλυκόζη 5 g/L στο θρεπτικό υλικό.



Σχήμα 40: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 25 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L.

3.3.3.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Klebsiella pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες της *K. pneumoniae* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L, στους 4°C, για 8 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη. Στους **Πίνακες 25** και **26** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 25: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
2	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,58 ± 0,02
4	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,53 ± 0,07
8	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,44 ± 0,02

Η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,44-0,58 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,25-0,30 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,14-0,21 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,12-0,15 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

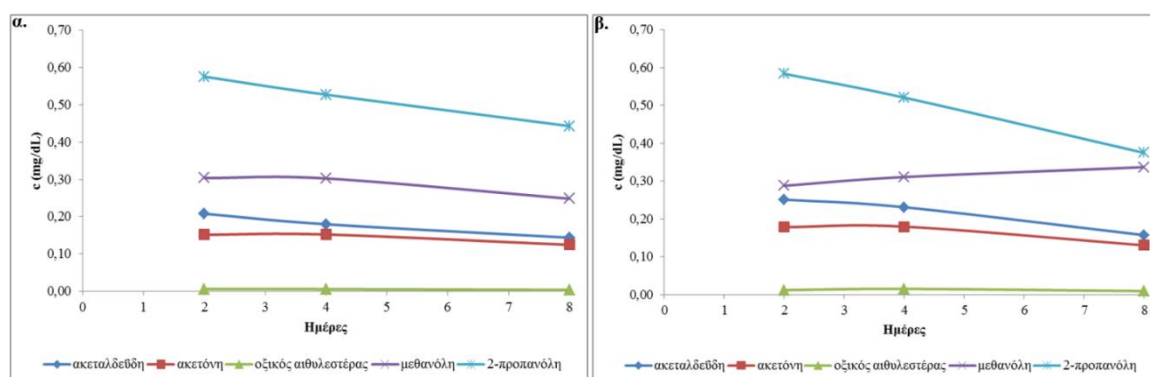
Πίνακας 26: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρας, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
2	0,25 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,29 ± 0,03	0,58 ± 0,00
4	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,52 ± 0,02
8	0,16 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,34 ± 0,02	0,38 ± 0,02

Κατά την αναερόβια επώαση, επίσης, η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,38-0,58 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,29-0,34 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,16-0,25 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,13-0,18 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0,01-0,02 mg/dL).

Και στις δύο συνθήκες επώασης, η 2-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθανόλη, την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα (**Σχήμα 41**), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης, της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης μειώνονταν σταδιακά ως το τέλος και στις δύο συνθήκες επώασης. Κατά τη μικτή επώαση, η μεθανόλη μειωνόταν με αργό ρυθμό, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξανόταν σταδιακά ως το τέλος της επώασης. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες επώασης. Οι συγκεντρώσεις των πτητικών ήταν συγκρίσιμες και στις δύο καλλιέργειες με συγκεντρώσεις γλυκόζης 5 και 10 g/L, εκτός από

τη 2-προπανόλη, τα επίπεδα της οποίας ήταν λίγο υψηλότερα στις αναερόβιες καλλιέργειες με συγκέντρωση γλυκόζης 10 g/L.



Σχήμα 41: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρας, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *K. pneumoniae* για 8 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L.

3.3.4. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI

3.3.4.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram βακτηρίου *S. aureus* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C, για 23 ημέρες. Στον **Πίνακα 27** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 28** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
2	0,28 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,04 ± 0,00
3	0,27 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00
4	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00
5	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00
6	0,27 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00
7	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00
8	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00
9	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00
10	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
11	0,24 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00
12	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00
13	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00
14	0,18 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00
15	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00
16	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00
17	0,19 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00
18	0,17 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,01
19	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,02
20	0,19 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,00
21	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,01

22	0,17 ± 0,00	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,00
23	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,00

Ο *S. aureus* κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,05 ± 0,01 g/L την 1^η ημέρα έως 0,28 ± 0,00 g/L τη 2^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την τελευταία ημέρα επώασης με τιμή 0,09 ± 0,02 mg/dL και η υψηλότερη τη 2^η ημέρα με τιμή 0,22 ± 0,01 mg/dL. Ακολούθησε η 1-βουτανόλη, η υψηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε τη 2^η ημέρα επώασης με τιμή 0,14 ± 0,00 mg/dl. Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις της άρχισαν να μειώνονται κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου με τη χαμηλότερη συγκέντρωση να καταλήγει σε 0,01 ± 0,00 mg/dL τη 19^η-23^η ημέρα. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της μεθυλο-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,10 ± 0,02 mg/dL τη 19^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,07 ± 0,01 mg/dL τη 19^η και 22^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,02	0,18 ± 0,01
1	0,45 ± 0,06	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,05	0,30 ± 0,01
2	1,12 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,13 ± 0,00
3	1,28 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,05	0,13 ± 0,02
4	1,07 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,12 ± 0,00
5	0,91 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,10 ± 0,01
6	1,05 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,17 ± 0,04
7	0,97 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,53 ± 0,03	0,13 ± 0,01

8	0,86 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,11 ± 0,01
9	0,89 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,11 ± 0,03
10	0,83 ± 0,04	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,03	0,11 ± 0,02
11	0,75 ± 0,04	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,58 ± 0,08	0,12 ± 0,03
12	0,77 ± 0,07	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,60 ± 0,08	0,12 ± 0,06
13	0,88 ± 0,06	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,52 ± 0,05	0,18 ± 0,02
14	0,67 ± 0,06	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,38 ± 0,07	0,11 ± 0,00
15	0,69 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,61 ± 0,01	0,09 ± 0,02
16	0,49 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,62 ± 0,03	0,10 ± 0,01
17	0,47 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,56 ± 0,04	0,12 ± 0,00
18	0,47 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,68 ± 0,02	0,11 ± 0,01
19	0,42 ± 0,11	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,60 ± 0,10	0,12 ± 0,05
20	0,51 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,64 ± 0,04	0,15 ± 0,00
21	0,39 ± 0,10	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,68 ± 0,12	0,10 ± 0,02
22	0,63 ± 0,10	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,74 ± 0,00	0,19 ± 0,01
23	0,64 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,19 ± 0,03

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $1,28 \pm 0,05$ mg/dL την 3^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,29 \pm 0,02$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,74$ mg/dL τις δύο τελευταίες ημέρες της επώασης. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,09 \pm 0,02$ mg/dL τη 15^η ημέρα έως $0,31 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα επώασης, ενώ της ακετόνης από $0,07$ mg/dL τη 14^η, 19^η και 21^η ημέρα έως $0,11 \pm 0,02$ mg/dL την 6^η και 7^η ημέρα επώασης. Τέλος, ο *S. aureus* παράγαγε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0,01-0,02 mg/dL.

Στον **Πίνακα 29** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 30** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus*.

Πίνακας 29: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
2	0,31 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,04 ± 0,00
3	0,31 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,04 ± 0,00
4	0,34 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,00
5	0,32 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,05 ± 0,00
6	0,31 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,00
7	0,32 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,00
8	0,32 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,00
9	0,33 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00
10	0,31 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00
11	0,34 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00
12	0,33 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00
13	0,32 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,00
14	0,31 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,00
15	0,29 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,00
16	0,31 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00
17	0,31 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,10 ± 0,00
18	0,32 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01
19	0,29 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00
20	0,27 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00
21	0,26 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,00

22	0,25 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,00
23	0,27 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,00

Ο *S. aureus* κατά την αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,04 ± 0,00 g/L την 1^η ημέρα έως 0,34 g/L την 4^η και 11^η ημέρα επώασης. Επίσης, από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-προπανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή 0,06 ± 0,01 mg/dL και η υψηλότερη την 2^η και 4^η ημέρα με τιμή 0,23 ± 0,01 mg/dL. Ακολούθησε η 1-βουτανόλη, η υψηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε τη 2^η και 4^η ημέρα επώασης με τιμή 0,14 mg/dl. Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις της άρχισαν να μειώνονται κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου με τη χαμηλότερη συγκέντρωση να φτάνει την τιμή 0,01 ± 0,00 mg/dL στο τέλος της επώασης. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της μεθυλο-βουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,10 ± 0,00 mg/dL τη 17^η και 19^η-22^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήταν της ισοβουτανόλης, οι τιμές της οποίας κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,08 ± 0,01 mg/dL τη 18^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 30: Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

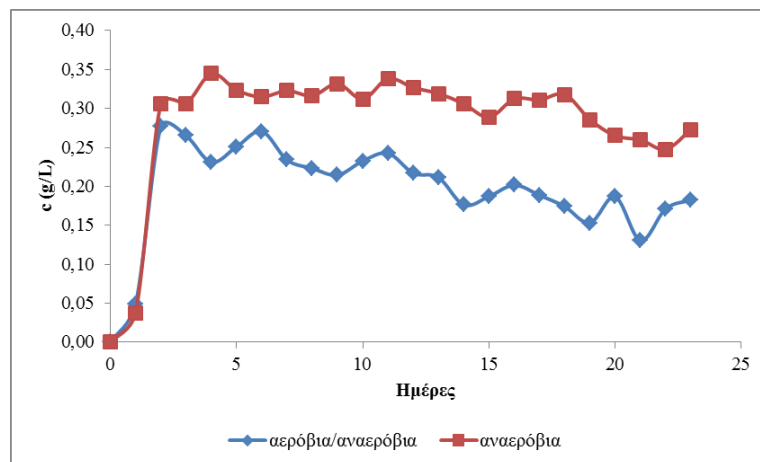
Ημέρες	Ακεταλδεϋδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,02	0,18 ± 0,01
1	0,45 ± 0,10	0,14 ± 0,04	0,01 ± 0,00	0,50 ± 0,06	0,21 ± 0,01
2	1,15 ± 0,10	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,40 ± 0,03	0,13 ± 0,03
3	1,24 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,48 ± 0,06	0,14 ± 0,00
4	1,18 ± 0,08	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,46 ± 0,06	0,21 ± 0,00
5	1,06 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,39 ± 0,04	0,24 ± 0,00
6	1,05 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,26 ± 0,02
7	1,06 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,38 ± 0,02	0,19 ± 0,01

8	1,11 ± 0,07	0,11 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,58 ± 0,06	0,20 ± 0,02
9	1,05 ± 0,06	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,51 ± 0,10	0,20 ± 0,02
10	0,94 ± 0,04	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,19 ± 0,01
11	0,84 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,53 ± 0,02	0,16 ± 0,01
12	0,98 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,21 ± 0,01
13	1,06 ± 0,04	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,23 ± 0,02
14	0,92 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,10 ± 0,00
15	0,80 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,77 ± 0,00	0,06 ± 0,00
16	0,59 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,11 ± 0,01
17	0,57 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,61 ± 0,02	0,11 ± 0,00
18	0,59 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,77 ± 0,07	0,12 ± 0,03
19	0,66 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,08	0,16 ± 0,02
20	0,69 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,64 ± 0,08	0,19 ± 0,01
21	0,68 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,19 ± 0,00
22	0,70 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,04	0,23 ± 0,02
23	0,74 ± 0,11	0,13 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,65 ± 0,05	0,20 ± 0,06

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $1,24 \pm 0,03$ mg/dL την 3^η ημέρα επώασης. Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,29 \pm 0,02$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,77$ mg/dL τη 15^η και 18^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,06 \pm 0,00$ mg/dL τη 15^η ημέρα έως $0,26 \pm 0,02$ mg/dL την 6^η ημέρα επώασης, ενώ της ακετόνης από $0,08 \pm 0,00$ mg/dL τη 15^η και 16^η ημέρα έως $0,14 \pm 0,04$ mg/dL την 1^η ημέρα επώασης. Τέλος, ο *S. aureus* παράγαγε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0,01-0,03 mg/dL κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης.

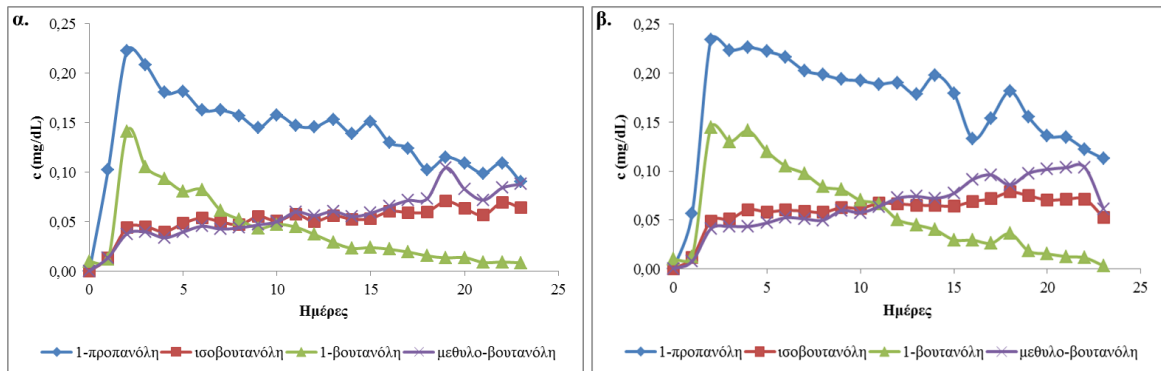
Στο **Σχήμα 42** παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* ήταν υψηλότερες από εκείνες κατά τις μικτές συνθήκες επώασης. Κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση, παράχθηκε αιθανόλη έως τη 2^η ημέρα και τα επίπεδά της παρέμειναν σταθερά μέχρι την 11^η ημέρα περίπου. Στη συνέχεια οι

συγκεντρώσεις της άρχισαν να μειώνονται με αργό ρυθμό ως το τέλος της επώασης. Κατά την αναερόβια επώαση, η αιθανόλη παράχθηκε έως την 4^η ημέρα επώασης και τα επίπεδά της παρέμειναν σχεδόν σταθερά ως το τέλος της επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που παράχθηκαν από τον *S. aureus* ήταν περίπου δύο φορές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες της *K. pneumoniae*. Επίσης, η αιθανόλη στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* και του *S. aureus* υπό αναερόβιες συνθήκες είχε σταθερό ρυθμό παραγωγής, ενώ κατά τη μικτή επώαση του *S. aureus* άρχισε να μειώνεται με αργό ρυθμό.



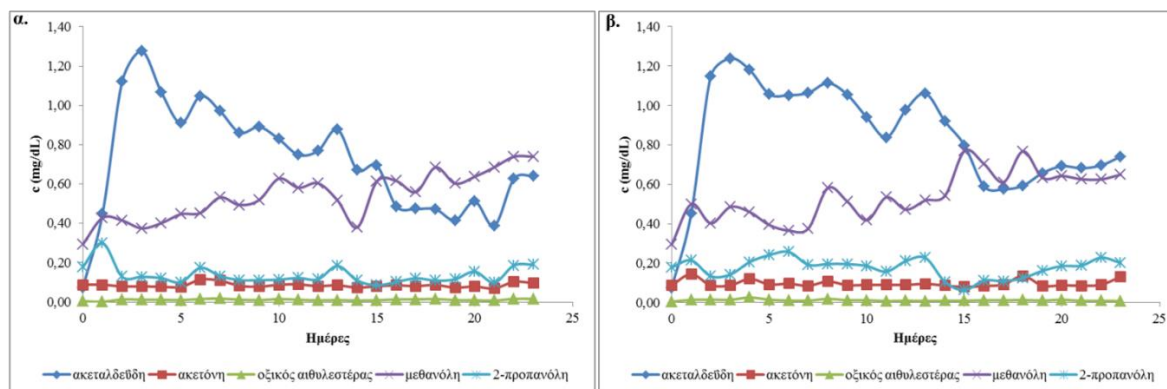
Σχήμα 42: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 43) η 1-προπανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την 1-βουτανόλη, τη μεθυλο-βουτανόλη και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη αυξήθηκαν ως τη 2^η ημέρα επώασης και στη συνέχεια άρχισαν σταδιακά να μειώνονται. Η μεθυλο-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη αυξάνονταν με αργό ρυθμό και στις δύο συνθήκες επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν υψηλότερες στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε σύγκριση με εκείνες του *S. aureus*. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης και της ισοβουτανόλης ήταν συγκρίσιμες στις καλλιέργειες των δύο βακτηρίων. Επιπλέον, στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* η 1-προπανόλη αυξάνεται κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ στις καλλιέργειες του *S. aureus* μειώνεται μετά τη 2^η ημέρα επώασης.



Σχήμα 43: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 44**), η ακεταλδεΰδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθανόλη, τη 2-προπανόλη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Η ακεταλδεΰδη αυξήθηκε ραγδαίως μέχρι περίπου την 3^η ημέρα επώασης και στη συνέχεια άρχισε να μειώνεται μέχρι το τέλος της επώασης. Η μεθανόλη αυξανόταν με αργό ρυθμό μέχρι το τέλος και στις δύο συνθήκες επώασης. Κατά τη μικτή επώαση, η 2-προπανόλη αυξήθηκε ως την 1^η ημέρα και από τη 2^η μειώθηκε και παρέμεινε σχετικά σταθερή ως το τέλος, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράχθηκε με σταθερό ρυθμό καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Τέλος, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν ένα σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά την επωαστική περίοδο. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΰδης ήταν υψηλότερες στις καλλιέργειες του *S. aureus* σε σύγκριση με εκείνες της *K. pneumoniae*. Οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης και της ακετόνης ήταν υψηλότερες στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* σε σύγκριση με εκείνες του *S. aureus*, ενώ οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης και του οξικού αιθυλεστέρα ήταν συγκρίσιμες στις καλλιέργειες και των δύο βακτηρίων. Επιπλέον, στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* η ακεταλδεΰδη παραγόταν με σταθερό ρυθμό κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ στις καλλιέργειες του *S. aureus* αυξήθηκε μέχρι περίπου την 3^η ημέρα και στη συνέχεια άρχισε να μειώνεται μέχρι το τέλος της επώασης.



Σχήμα 44: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.4.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C

Υγρές καλλιέργειες του *S. aureus* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 37°C, για 48 ώρες. Στον **Πίνακα 31** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 32** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αερόβια επώαση.

Πίνακας 31: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,02 ± 0,00
24	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,03 ± 0,00
48	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,00

Ο *S. aureus* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 12 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,10-0,12 g/L, συγκεντρώσεις χαμηλότερες από εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και της 1-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμες: 0,11-0,13 mg/dL για την 1-προπανόλη και 0,12-0,15 mg/dL για την 1-βουτανόλη. Επίσης, τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν ίδια και κυμάνθηκαν από 0,02-0,03 mg/dL, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες στους 25°C.

Πίνακας 32: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
6	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,26 ± 0,01
12	0,62 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,11 ± 0,00
24	0,72 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,02	0,21 ± 0,01
48	0,39 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,38 ± 0,06	0,05 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,06-0,72 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,34-0,38 mg/dL. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,05-0,26 mg/dL και τα αντίστοιχα της ακετόνης από 0,07-0,10 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL). Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της μεθανόλης στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με εκείνες στους 25°C.

Στον **Πίνακα 33** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 34** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, στους 37°C.

Πίνακας 33: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,00
24	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,03 ± 0,00
48	0,15 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,04 ± 0,00

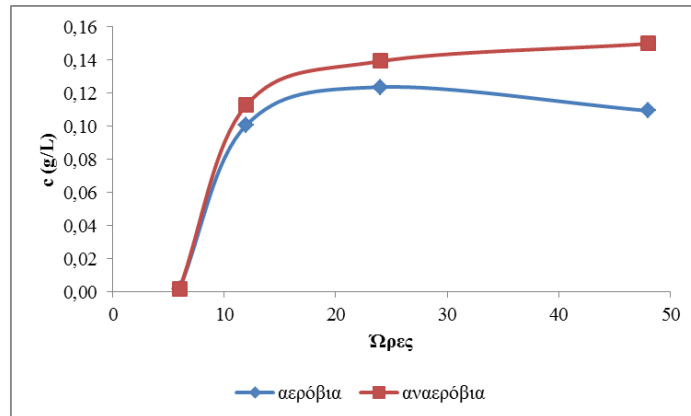
Ο *S. aureus* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 12 ώρες αναερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,11-0,15 g/L, συγκεντρώσεις χαμηλότερες από εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και της 1-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμες: 0,13-0,16 mg/dL για την 1-προπανόλη και 0,15-0,16 mg/dL για την 1-βουτανόλη. Επίσης, τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμα και κυμάνθηκαν από 0,02-0,03 mg/dL για την ισοβουτανόλη και 0,02-0,04 mg/dL για τη μεθυλο-βουτανόλη, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης στους 37°C ήταν παρόμοιες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες στους 25°C.

Πίνακας 34: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
6	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,43 ± 0,04	0,30 ± 0,02
12	0,66 ± 0,03	0,13 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,11 ± 0,00
24	0,74 ± 0,06	0,12 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,21 ± 0,02
48	0,44 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,14 ± 0,00

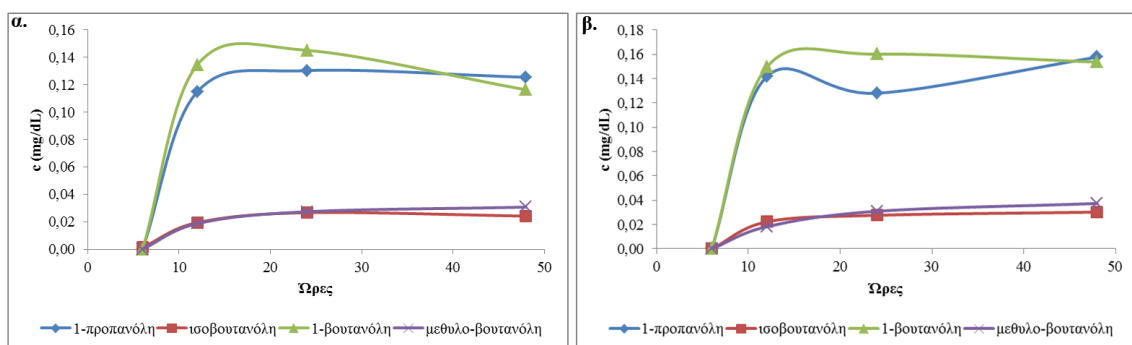
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό ανερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,12-0,74 mg/dL). Ακολούθησε η μεθανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,38-0,51 mg/dL. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,11-0,30 mg/dL και τα αντίστοιχα της ακετόνης από 0,10-0,14 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0,01-0,03 mg/dL). Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της μεθανόλης στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με εκείνες στους 25°C.

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στους 37°C ήταν λίγο υψηλότερες κατά την αναερόβια επώαση σε σύγκριση με τη μικτή επώαση (**Σχήμα 45**). Ο *S. aureus* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 12 ώρες επώασης έως τις 24 ώρες, η οποία παρέμεινε σταθερή ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 45: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

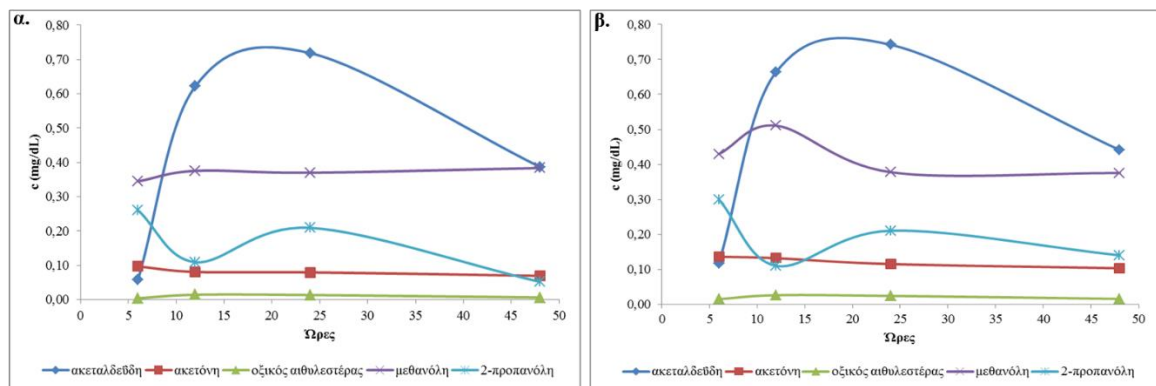
Από τις ανώτερες αλκοόλες, (Σχήμα 46) η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη παρήγαγαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολούθησαν η ισοβουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Κατά την αερόβια επώαση, η 1-προπανόλη αυξήθηκε μετά από 12 ώρες επώασης και παρέμεινε σταθερή ως το τέλος, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξήθηκε μετά από 12 ώρες επώασης, μειώθηκε ως τις 24 ώρες και στη συνέχεια αυξήθηκε ξανά ως το τέλος. Η 1-βουτανόλη αυξανόταν μέχρι τις 24 ώρες επώασης και παρέμεινε σταθερή ως τις 48 ώρες. Τέλος, η μεθυλο-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη είχαν έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 46: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 47), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη μεθανόλη, τη 2-προπανόλη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη τα επίπεδα της οποίας ήταν

λίγο υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση. Η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε ραγδαίως μετά από 24 ώρες επώασης κι έπειτα άρχισε να μειώνεται ως τις 48 ώρες. Κατά τη μικτή επώαση, η μεθανόλη είχε σταθερό ρυθμό παραγωγής ως το τέλος, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξήθηκε μετά από 12 ώρες επώασης και στη συνέχεια μειώθηκε και παρέμεινε σταθερή ως τις 48 ώρες. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης ακολούθησαν μία αυξομείωση κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια των 48 ωρών.



Σχήμα 47: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ.

3.3.4.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες του *S. aureus* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ, στους 4°C, για 23 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη. Στους **Πίνακες 35** και **36** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 35: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,20 ± 0,01
15	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,04	0,15 ± 0,00
23	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,20 ± 0,01

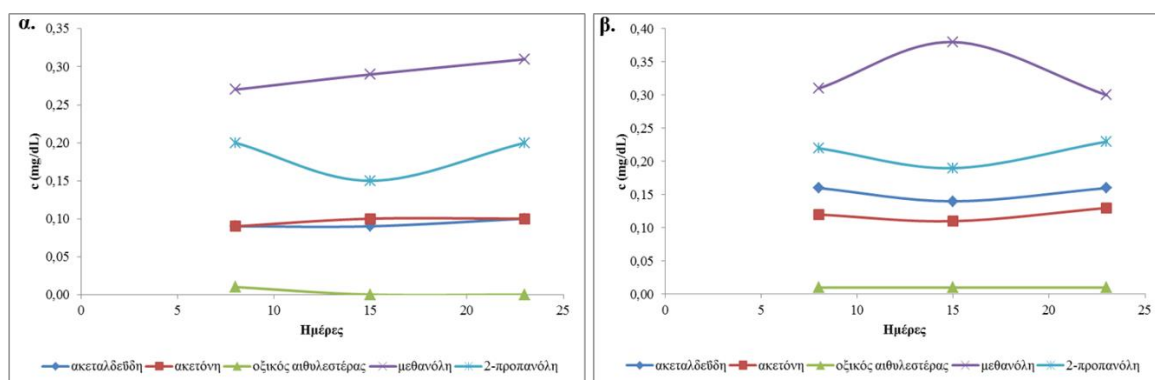
Η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,27-0,31 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,15-0,20 mg/dL, η ακεταλδεΐδη και η ακετόνη με συγκεντρώσεις 0,09-0,10 mg/dL, αντίστοιχα. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

Πίνακας 36: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *S. aureus* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,22 ± 0,00
15	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,38 ± 0,03	0,19 ± 0,01
23	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,23 ± 0,02

Κατά την αναερόβια επώαση, επίσης, η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,30-0,38 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,19-0,23 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,14-0,16 mg/dL και η ακετόνη με επίπεδα συγκεντρώσεων 0,11-0,13 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0,01 mg/dL).

Και στις δύο συνθήκες επώασης, η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη 2-προπανόλη, την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα (Σχήμα 48), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη και την ακεταλδεΐδη τα επίπεδα των οποίων ήταν λίγο υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση. Η μεθανόλη αυξανόταν σταδιακά κατά τη μικτή επώαση, ενώ κατά την αναερόβια επώαση αυξήθηκε ως τη 15^η ημέρα και στη συνέχεια μειώθηκε. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης μειώθηκαν ελάχιστα μέχρι τη 15^η ημέρα κι έπειτα αυξήθηκαν ξανά. Κατά τη μικτή επώαση, οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης ήταν συγκρίσιμες και παρέμειναν σταθερές ως την 23^η ημέρα, ενώ κατά την αναερόβια επώαση είχαν σταθερό ρυθμό παραγωγής, αλλά τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης ήταν λίγο υψηλότερα από της ακετόνης. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 48: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *S. aureus* για 23 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.5. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Enterococcus faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI

3.3.5.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Enterococcus faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram βακτηρίου *E. faecalis* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 25°C, για 30 ημέρες. Στον Πίνακα 37 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη,

1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 38** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 37: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,01 ± 0,00
2	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,01 ± 0,00
3	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,02 ± 0,00
4	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,02 ± 0,00
5	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,02 ± 0,00
6	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,02 ± 0,00
7	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,03 ± 0,00
8	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00
9	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
10	0,12 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,00
11	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00
12	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,02 ± 0,00
13	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,02 ± 0,00
14	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,02	0,02 ± 0,00
15	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,03 ± 0,00
16	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,03 ± 0,00
17	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,03 ± 0,00
18	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00

19	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,03 ± 0,00
20	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00
21	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,03 ± 0,00
22	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,03 ± 0,00
23	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24	0,14 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
25	0,15 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,04 ± 0,00
26	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,03 ± 0,00
27	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
28	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,03 ± 0,01
29	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,03 ± 0,00
30	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,03 ± 0,00

Ο *E. faecalis* κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,10 \pm 0,00$ g/L την 11^η ημέρα έως $0,15$ g/L τη 17^η και 25^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 11^η ημέρα επώασης με τιμή $0,11 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη την 25^η ημέρα με τιμή $0,21 \pm 0,00$ mg/dL. Ακολούθησε η 1-προπανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε την 4^η, 6^η, 11^η και 14^η ημέρα επώασης με τιμή $0,06$ mg/dl και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την 22^η ημέρα επώασης με τιμή $0,10 \pm 0,00$ mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της μεθυλο-βουτανόλης κυμάνθηκαν από $0,01 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η, 2^η, 8^η και 11^η ημέρα έως $0,04 \pm 0,00$ mg/dL την 25^η ημέρα επώασης. Τέλος, οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης ήταν αμελητέες κατά τη διάρκεια της αερόβιας/αναερόβιας επώασης ($0-0,01$ mg/dL).

Πίνακας 38: Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεϋδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,18 ± 0,00
1	0,18 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,16 ± 0,00
2	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,09 ± 0,01
3	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,76 ± 0,01	0,09 ± 0,01
4	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,02	0,08 ± 0,01
5	0,12 ± 0,00	0,34 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,89 ± 0,01	0,11 ± 0,00
6	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,98 ± 0,01	0,08 ± 0,00
7	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00
8	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,87 ± 0,03	0,08 ± 0,00
9	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,96 ± 0,16	0,08 ± 0,02
10	0,09 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,81 ± 0,01	0,07 ± 0,01
11	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,73 ± 0,03	0,07 ± 0,00
12	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,99 ± 0,01	0,11 ± 0,00
13	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,92 ± 0,02	0,11 ± 0,01
14	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,11 ± 0,13	0,12 ± 0,01
15	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,20 ± 0,03	0,13 ± 0,01
16	0,24 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,02 ± 0,00	1,30 ± 0,03	0,12 ± 0,01
17	0,15 ± 0,02	0,22 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,37 ± 0,01	0,16 ± 0,00
18	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,33 ± 0,03	0,17 ± 0,01
19	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,02 ± 0,00	1,23 ± 0,06	0,17 ± 0,01
20	0,14 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,31 ± 0,12	0,17 ± 0,01
21	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,33 ± 0,00	0,15 ± 0,02

22	0,11 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,29 ± 0,07	0,17 ± 0,00
23	0,11 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,29 ± 0,00	0,13 ± 0,04
24	0,12 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,35 ± 0,05	0,18 ± 0,00
25	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,37 ± 0,01	0,19 ± 0,00
26	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,25 ± 0,01	0,12 ± 0,05
27	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,21 ± 0,18	0,15 ± 0,03
28	0,15 ± 0,00	0,20 ± 0,02	0,00 ± 0,00	1,16 ± 0,33	0,13 ± 0,05
29	0,13 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,40 ± 0,03	0,18 ± 0,00
30	0,12 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,42 ± 0,08	0,12 ± 0,06

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,26 \pm 0,01$ mg/dL την ημέρα 0 έως $1,42 \pm 0,08$ mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης. Ακολούθησε η ακετόνη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από $0,09 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,34 \pm 0,11$ mg/dL την 5^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,24$ mg/dL τη 16^η και 19^η ημέρα επώασης, ενώ της 2-προπανόλης από $0,07$ mg/dL τη 10^η και 11^η ημέρα έως $0,19 \pm 0,00$ mg/dL την 25^η ημέρα επώασης. Τέλος, ο *E. faecalis* παρήγαγε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0,01-0,02 mg/dL.

Στον **Πίνακα 39** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 40** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis*.

Πίνακας 39: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,13 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00
2	0,14 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,02 ± 0,00
3	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,02 ± 0,00
4	0,15 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,02 ± 0,00
5	0,16 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,02 ± 0,00
6	0,15 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,02 ± 0,00
7	0,15 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,03 ± 0,00
8	0,15 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
9	0,14 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,02 ± 0,00
10	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
11	0,15 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
12	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
13	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,00
14	0,14 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,00
15	0,15 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,03 ± 0,00
16	0,16 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,03 ± 0,00
17	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00
18	0,15 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00

19	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,03 ± 0,00
20	0,16 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
21	0,16 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
22	0,16 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,04 ± 0,00
23	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,04 ± 0,00
24	0,16 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,16 ± 0,05	0,03 ± 0,00
25	0,17 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
26	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00
27	0,17 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,04 ± 0,01
28	0,16 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,03 ± 0,00
29	0,16 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,04 ± 0,00
30	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,04 ± 0,00

Ο *E. faecalis* κατά την αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,13 \pm 0,00$ g/L την 1^η ημέρα έως $0,17 \pm 0,00$ g/L την 25^η και 27^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η 1-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 9^η ημέρα επώασης με τιμή $0,13 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη τις τελευταίες ημέρες επώασης με τιμή $0,20$ mg/dL. Ακολούθησε η 1-προπανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε την 1^η, 8^η και 9^η ημέρα επώασης με τιμή $0,06 \pm 0,00$ mg/dl και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την τελευταία ημέρα επώασης με τιμή $0,11 \pm 0,01$ mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της μεθυλο-βουτανόλης κυμάνθηκαν από $0,01 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,04$ mg/dL τις τελευταίες ημέρες επώασης. Τέλος, οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης ήταν αμελητέες κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επώασης ($0-0,01$ mg/dL).

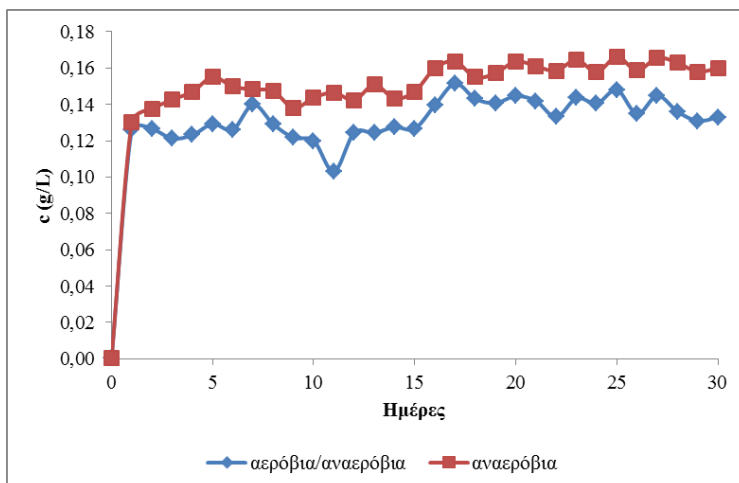
Πίνακας 40: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,18 ± 0,00
1	0,21 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,04	0,15 ± 0,01
2	0,17 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,04	0,13 ± 0,00
3	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,81 ± 0,01	0,11 ± 0,00
4	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,89 ± 0,04	0,12 ± 0,00
5	0,25 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,98 ± 0,02	0,16 ± 0,00
6	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,07 ± 0,01	0,13 ± 0,00
7	0,20 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,15 ± 0,02	0,15 ± 0,00
8	0,22 ± 0,05	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,88 ± 0,03	0,12 ± 0,00
9	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,91 ± 0,00	0,12 ± 0,00
10	0,17 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,96 ± 0,00	0,12 ± 0,00
11	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,99 ± 0,03	0,14 ± 0,01
12	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,98 ± 0,02	0,17 ± 0,00
13	0,19 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,03 ± 0,01	0,18 ± 0,01
14	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,99 ± 0,05	0,18 ± 0,00
15	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,35 ± 0,06	0,13 ± 0,05
16	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,29 ± 0,02	0,21 ± 0,00
17	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,29 ± 0,10	0,17 ± 0,04
18	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,32 ± 0,04	0,21 ± 0,00
19	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,26 ± 0,00	0,21 ± 0,01
20	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,35 ± 0,01	0,25 ± 0,00
21	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,35 ± 0,00	0,24 ± 0,00

22	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,36 ± 0,02	0,19 ± 0,04
23	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,41 ± 0,02	0,22 ± 0,02
24	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,18 ± 0,24	0,13 ± 0,03
25	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,32 ± 0,18	0,12 ± 0,00
26	0,16 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,13 ± 0,19	0,18 ± 0,06
27	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,13 ± 0,26	0,17 ± 0,07
28	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,26 ± 0,29	0,12 ± 0,01
29	0,18 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,42 ± 0,05	0,19 ± 0,05
30	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,45 ± 0,03	0,23 ± 0,01

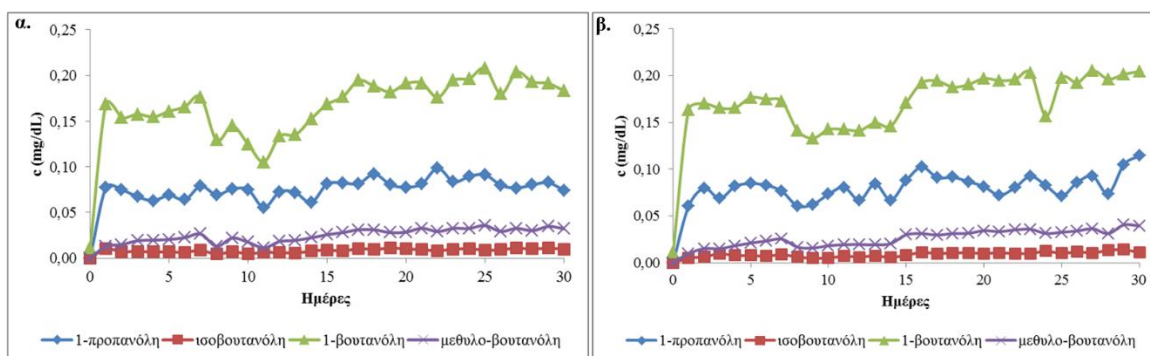
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά την αναερόβια επώαση ήταν η μεθανόλη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,26 \pm 0,01$ mg/dL την ημέρα 0 έως $1,45 \pm 0,03$ mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης. Ακολούθησαν η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη και η 2-προπανόλη με συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,25$ mg/dL την 5^η και 21^η ημέρα επώασης. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,09 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,23$ mg/dL την 4^η, 21^η, 23^η, 24^η και 30^η ημέρα επώασης, ενώ της 2-προπανόλης από $0,11 \pm 0,00$ mg/dL την 3^η ημέρα έως $0,25 \pm 0,00$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης. Τέλος, ο *E. faecalis* παρήγαγε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα, από 0-0,01 mg/dL.

Στο **Σχήμα 49** παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης που παράχθηκαν από τον *E. faecalis* και στις δύο συνθήκες επώασης ήταν συγκρίσιμες. Και στις δύο επωαστικές συνθήκες τα επίπεδα της αιθανόλης αυξήθηκαν μέχρι περίπου την 5^η-7^η ημέρα και στη συνέχεια παρέμειναν σχεδόν σταθερά μέχρι την 30^η ημέρα. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που παρήχθησαν από τον *E. faecalis* ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες της *K. pneumoniae* και του *S. aureus*.



Σχήμα 49: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

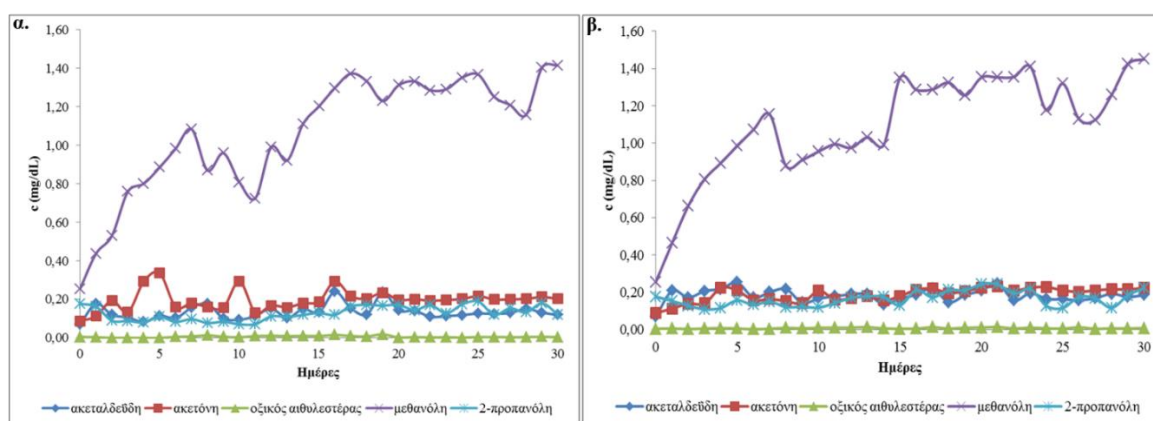
Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 50), η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την 1-προπανόλη, τη μεθυλο-βουτανόλη και την ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης και είχαν ένα σχετικά σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια της επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες στις καλλιέργειες του *E. faecalis* σε σύγκριση με εκείνες των άλλων δύο βακτηρίων. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης που παρήχθησαν από τον *E. faecalis* ήταν συγκρίσιμες με εκείνες της *K. pneumoniae* και υψηλότερες από τις αντίστοιχες του *S. aureus*.



Σχήμα 50: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 51), η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ακετόνη, την

ακεταλδεΐδη, τη 2-προπανόλη και τον οξικό αιθυλεστέρα. Οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από την ακετόνη, οι συγκεντρώσεις της οποίας ήταν λίγο υψηλότερες κατά τη μικτή επώαση. Η μεθανόλη αυξανόταν με γρήγορο ρυθμό ως το τέλος της επωαστικής περιόδου, ενώ τα υπόλοιπα πτητικά είχαν έναν σχετικά σταθερό ρυθμό παραγωγής καθ' όλη τη διάρκεια της μικτής και αναερόβιας επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης στις καλλιέργειες του *E. faecalis* ήταν χαμηλότερες από εκείνες της *K. pneumoniae* και υψηλότερες από τις αντίστοιχες του *S. aureus*. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης ήταν χαμηλότερες στις καλλιέργειες του *E. faecalis* σε σύγκριση με εκείνες της *K. pneumoniae* και του *S. aureus*, ενώ οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης και του οξικού αιθυλεστέρα ήταν συγκρίσιμες στις καλλιέργειες και των τριών βακτηρίων. Τέλος, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης κατά τη μικτή επώαση του *E. faecalis* ήταν συγκρίσιμες με εκείνες κατά τη μικτή επώαση της *K. pneumoniae*.



Σχήμα 51: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 30 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.5.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Enterococcus faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C

Υγρές καλλιέργειες του *E. faecalis* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιας και αναερόβιας συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 37°C, για 48 ώρες. Στον **Πίνακα 41** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 42** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αερόβια επώαση.

Πίνακας 41: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,06	0,00 ± 0,00
12	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,02	0,02 ± 0,00
24	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,03 ± 0,00
48	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,03 ± 0,00

Ο *E. faecalis* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 6 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,05-0,12 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη άρχισαν να παράγονται μετά από 6 ώρες επώασης, ενώ η ισοβουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη μετά από 12 ώρες. Εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,09-0,17 mg/dL) ήταν η 1-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,03-0,09 mg/dL. Επίσης, τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμα και κυμάνθηκαν από 0-0,01 mg/dL για την ισοβουτανόλη και 0,02-0,03 mg/dL για τη μεθυλο-βουτανόλη, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 42: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,22 ± 0,01
6	0,49 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,22 ± 0,01
12	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,71 ± 0,10	0,11 ± 0,00
24	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,04 ± 0,04	0,09 ± 0,00
48	0,14 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,39 ± 0,01	0,07 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αερόβια επώαση ήταν η μεθανόλη (0,35-1,39 mg/dL). Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,10-0,49 mg/dL. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,07-0,22 mg/dL και τα αντίστοιχα της ακετόνης από 0,11-0,16 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL). Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στους 37°C ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, της ακετόνης ήταν χαμηλότερες, ενώ οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με εκείνες στους 25°C.

Στον **Πίνακα 43** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 44** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, στους 37°C.

Πίνακας 43: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,02 ± 0,00
24	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,03 ± 0,00
48	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,03 ± 0,00

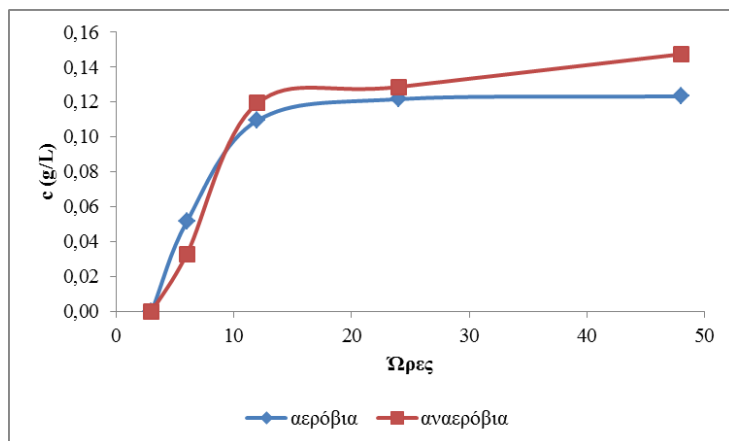
Ο *E. faecalis* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 6 ώρες αναερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,03-0,15 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η 1-βουτανόλη άρχισε να παράγεται μετά από 6 ώρες επώασης, ενώ η 1-προπανόλη, η ισοβουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη μετά από 12 ώρες. Εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,02-0,18 mg/dL) ήταν η 1-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,06-0,08 mg/dL. Επίσης, τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμα και κυμάνθηκαν από 0-0,01 mg/dL για την ισοβουτανόλη και 0,02-0,03 mg/dL για τη μεθυλο-βουτανόλη, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 44: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,44 ± 0,05	0,24 ± 0,01
6	0,60 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,21 ± 0,00
12	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,04	0,11 ± 0,01
24	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,11 ± 0,01
48	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,17 ± 0,02	0,09 ± 0,00

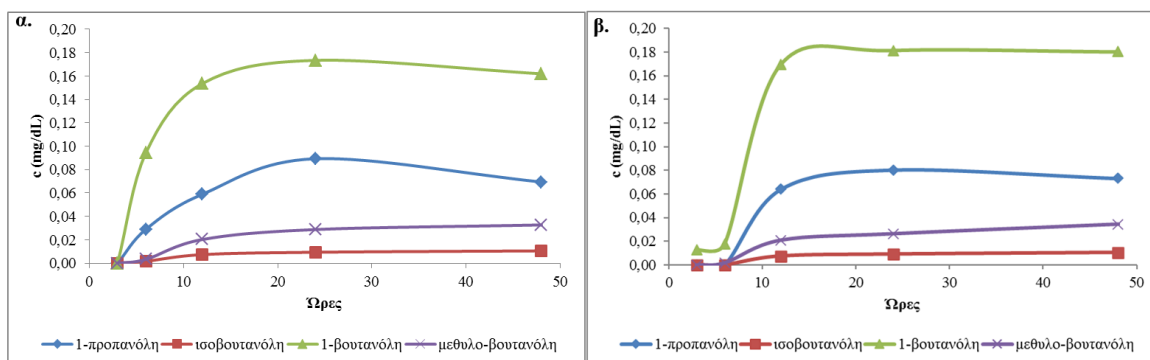
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αναερόβια επώαση ήταν η μεθανόλη (0,37-1,17 mg/dL). Ακολούθησε η ακεταλδεΐδη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,13-0,60 mg/dL. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,09-0,24 mg/dL και τα αντίστοιχα της ακετόνης από 0,11-0,16 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL). Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στους 37°C ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, της ακετόνης ήταν χαμηλότερες, ενώ οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με εκείνες στους 25°C.

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης (**Σχήμα 52**). Ο *E. faecalis* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 12 ώρες επώασης, η οποία παρέμεινε σχετικά σταθερή ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 52: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

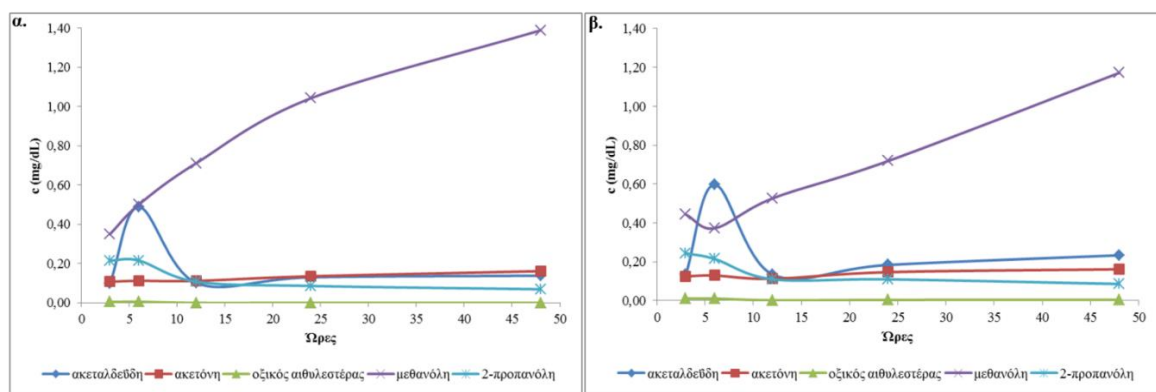
Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 53), η 1-βουτανόλη παρήγαγε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολούθησαν η 1-προπανόλη, η μεθυλο-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η 1-βουτανόλη και η 1-προπανόλη αυξήθηκαν έως τις 24 ώρες επώασης και παρέμειναν σταθερές ως το τέλος και στις δύο επωαστικές συνθήκες, ενώ η μεθυλο-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη άρχισαν να παράγουν μικρές συγκεντρώσεις μετά από 12 ώρες επώασης και ακολούθησαν έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής ως το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 53: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 54), η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ακεταλδεΰδη, τη 2-προπανόλη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη, της οποίας η μέγιστη

συγκέντρωση ήταν λίγο υψηλότερη κατά τη μικτή επώαση και την ακεταλδεΐδη, η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας ήταν λίγο υψηλότερη κατά την αναερόβια επώαση. Η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε ραγδαίως μετά από 24 ώρες επώασης κι έπειτα άρχισε να μειώνεται ως τις 48 ώρες. Και στις δύο συνθήκες επώασης, η μεθανόλη αυξήθηκε με γρήγορο ρυθμό κατά τη διάρκεια των 48 ωρών. Τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης αυξήθηκαν μετά από 6 ώρες επώασης, μειώθηκαν μετά από 12 ώρες και στη συνέχεια παρέμειναν σταθερά ως το τέλος της επώασης. Τα επίπεδα της 2-προπανόλης μειώθηκαν μετά από 6 ώρες ως τις 12 ώρες επώασης και παρέμειναν σταθερά ως το τέλος, ενώ η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια των 48 ωρών.



Σχήμα 54: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 48 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ.

3.3.5.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες του *Enterococcus faecalis* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες του *E. faecalis* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ, στους 4°C, για 32 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη. Στους Πίνακες 45 και 46 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 45: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,03	0,18 ± 0,01
16	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,02	0,16 ± 0,00
24	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,01
32	0,08 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,20 ± 0,00

Η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,26-0,30 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,16-0,21 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,08-0,10 mg/dL και η ακετόνη με συγκεντρώσεις 0,09-0,10 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0-0,01 mg/dL).

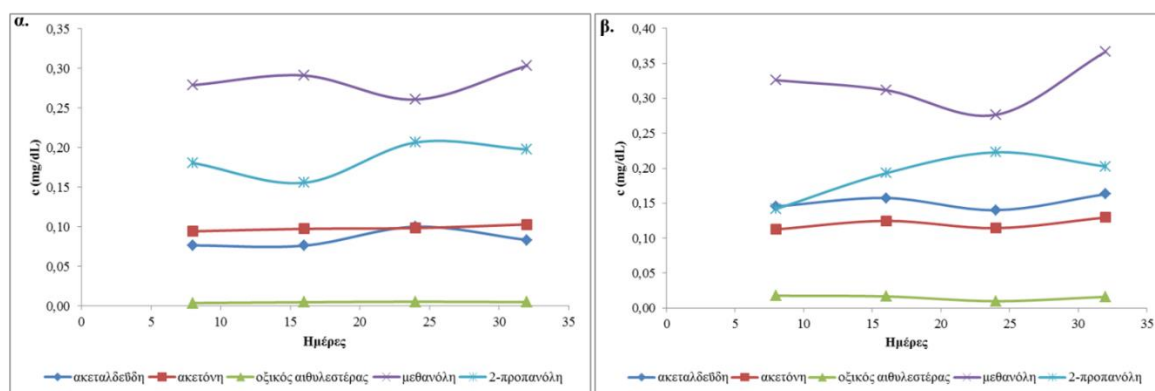
Πίνακας 46: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση του *E. faecalis* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	Μεθανόλη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
8	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,33 ± 0,04	0,14 ± 0,01
16	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,01
24	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,01
32	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,37 ± 0,04	0,20 ± 0,01

Η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πτητικές ενώσεις (0,28-0,37 mg/dL). Ακολούθησε η 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις της οποίας κυμάνθηκαν από 0,14-0,22 mg/dL, η ακεταλδεΐδη με συγκεντρώσεις 0,14-0,16 mg/dL και η ακετόνη με

συγκεντρώσεις 0,11-0,13 mg/dL. Τέλος, ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις (0,01-0,02 mg/dL).

Και στις δύο συνθήκες επώασης, η μεθανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τη 2-προπανόλη, την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα (Σχήμα 55), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης, εκτός από τη μεθανόλη και την ακεταλδεΐδη τα επίπεδα των οποίων ήταν λίγο υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση. Η μεθανόλη παραγόταν με σταθερό ρυθμό κατά τη μικτή επώαση, ενώ κατά την αναερόβια επώαση μειώθηκε την 24^η ημέρα και στη συνέχεια αυξήθηκε. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης άρχισαν να αυξάνονται μέχρι την 24^η ημέρα και παρέμειναν σχετικά σταθερές. Τέλος, η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας είχαν σταθερό ρυθμό παραγωγής κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 55: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης κατά την α. αερόβια/αναερόβια και β. αναερόβια επώαση του *E. faecalis* για 32 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.6. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI

3.3.6.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram μύκητα *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιερητικό υλικό BHI, στους 25°C, για 21 ημέρες. Στον Πίνακα 47 παρουσιάζονται οι

συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 48** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεΐδη, ακετόνη και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 47: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,22 ± 0,00	0,03 ± 0,01	< LOD	< LOD	0,15 ± 0,01
2	0,51 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	< LOD	0,37 ± 0,01
3	0,49 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	< LOD	0,40 ± 0,01
4	0,54 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,12 ± 0,00	< LOD	0,59 ± 0,01
5	0,52 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,03	< LOD	0,54 ± 0,04
6	0,61 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,03	< LOD	0,64 ± 0,07
7	0,56 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,00	< LOD	0,64 ± 0,03
8	0,57 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,03	< LOD	0,65 ± 0,03
9	0,57 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,01	< LOD	0,69 ± 0,02
10	0,59 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,01	< LOD	0,75 ± 0,05
11	0,56 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,01	< LOD	0,77 ± 0,10
12	0,51 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,19 ± 0,02	< LOD	0,84 ± 0,04
13	0,50 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,01	< LOD	0,81 ± 0,00
14	0,46 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,20 ± 0,01	< LOD	0,98 ± 0,00
15	0,50 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,20 ± 0,00	< LOD	0,85 ± 0,02
16	0,50 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,03	< LOD	0,86 ± 0,09
17	0,50 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,99 ± 0,06
18	0,52 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,22 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,94 ± 0,08

19	0,44 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,24 ± 0,02
20	0,50 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,06 ± 0,00
21	0,46 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,30 ± 0,07

Η *C. albicans* κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,22 ± 0,00 g/L την 1^η ημέρα έως 0,61 ± 0,03 g/L την 6^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή 0,15 ± 0,01 mg/dL και η υψηλότερη την 21^η ημέρα με τιμή 1,30 ± 0,07 mg/dL. Ακολούθησε η ισοβουτανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε την 3^η ημέρα επώασης με τιμή 0,06 ± 0,00 mg/dL και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την 21^η ημέρα επώασης με τιμή 0,33 ± 0,01 mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,03 ± 0,01 mg/dL την 1^η ημέρα έως 0,10 ± 0,01 mg/dL την 9^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* ξεκίνησε να παράγει 1-βουτανόλη τη 17^η ημέρα επώασης και οι συγκεντρώσεις της κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 mg/dL τη 17^η και 19^η ημέρα έως 0,05 ± 0,01 mg/dL την 20^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 48: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,00	<LOD
2	0,21 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,05 ± 0,01
3	0,19 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01
4	0,30 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00
5	0,17 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,11 ± 0,01
6	0,28 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,02
7	0,30 ± 0,10	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,00

8	0,50 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,01
9	0,27 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,09 ± 0,01
10	0,23 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,00
11	0,22 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01
12	0,26 ± 0,08	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01
13	0,25 ± 0,04	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,01
14	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00
15	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,09 ± 0,00
16	0,21 ± 0,07	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,03
17	0,22 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01
18	0,31 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
19	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,00
20	0,29 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,00
21	0,18 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,12 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,50 \pm 0,00$ mg/dL την 8^η ημέρα επώασης. Ακολούθησαν η ακετόνη και η 2-προπανόλη με συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,09$ mg/dL την 3^η, 4^η, 7^η, 11^η, 14^η και 16^η ημέρα επώασης έως $0,14 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0, ενώ τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,05 \pm 0,01$ mg/dL τη 2^η ημέρα έως $0,12$ mg/dL την 7^η και 16^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* δεν παράγαγε μεθανόλη, ενώ οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα προσδιορίστηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Στον **Πίνακα 49** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 50** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* στους 25°C.

Πίνακας 49: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,26 ± 0,00	0,03 ± 0,01	< LOD	< LOD	0,15 ± 0,01
2	0,57 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00	< LOD	0,33 ± 0,01
3	0,71 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	< LOD	0,41 ± 0,01
4	0,79 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,16 ± 0,00	< LOD	0,49 ± 0,01
5	0,81 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,00	< LOD	0,50 ± 0,00
6	0,81 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,03	< LOD	0,54 ± 0,02
7	0,84 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,00	< LOD	0,56 ± 0,01
8	0,80 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,19 ± 0,00	< LOD	0,66 ± 0,00
9	0,81 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,02	< LOD	0,63 ± 0,06
10	0,88 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,22 ± 0,00	< LOD	0,75 ± 0,00
11	0,84 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,02	< LOD	0,73 ± 0,02
12	0,82 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,25 ± 0,00	< LOD	0,95 ± 0,14
13	0,83 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,23 ± 0,02	< LOD	0,82 ± 0,07
14	0,78 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,94 ± 0,05
15	0,76 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,29 ± 0,00	< LOD	1,01 ± 0,02
16	0,83 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,90 ± 0,04
17	0,78 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,95 ± 0,01
18	0,78 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,30 ± 0,04	0,05 ± 0,00	1,09 ± 0,09

19	0,77 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0,05 ± 0,03	1,17 ± 0,16
20	0,68 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,04 ± 0,02	1,27 ± 0,10
21	0,71 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,45 ± 0,06	0,06 ± 0,02	1,48 ± 0,23

Η *C. albicans* κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,26 \pm 0,00$ g/L την 1^η ημέρα έως $0,88 \pm 0,00$ g/L τη 10^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή $0,15 \pm 0,01$ mg/dL και η υψηλότερη την 21^η ημέρα με τιμή $1,48 \pm 0,23$ mg/dL. Ακολούθησε η ισοβουτανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε τη 2^η ημέρα επώασης με τιμή $0,08 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την 21^η ημέρα επώασης με τιμή $0,45 \pm 0,06$ mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,03 \pm 0,01$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,12 \pm 0,00$ mg/dL την 7^η και 10^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* ξεκίνησε να παράγει 1-βουτανόλη τη 14^η ημέρα επώασης και οι συγκεντρώσεις της κυμάνθηκαν από $0,03 \pm 0,00$ mg/dL τη 14^η και 17^η ημέρα έως $0,06 \pm 0,02$ mg/dL την 21^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 50: Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τοπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

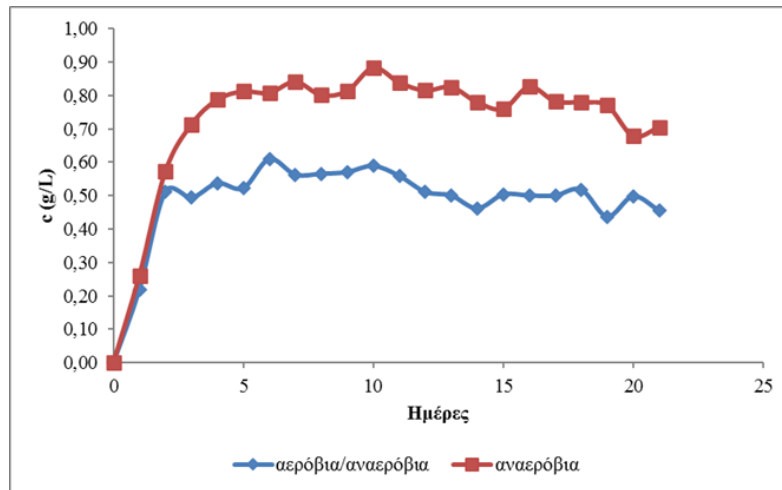
Ημέρες	Ακεταλδεϋδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,27 ± 0,01	0,14 ± 0,00	<LOD
2	0,60 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,05 ± 0,00
3	0,41 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00
4	0,59 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01
5	0,35 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,11 ± 0,00
6	0,43 ± 0,08	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,00
7	0,56 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,00

8	0,88 ± 0,06	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00
9	0,40 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00
10	0,47 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,01
11	0,44 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,09 ± 0,00
12	0,42 ± 0,18	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,00
13	0,47 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,00
14	0,37 ± 0,03	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00
15	0,59 ± 0,08	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,01
16	0,58 ± 0,03	0,13 ± 0,00	0,07 ± 0,00
17	0,37 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,00
18	0,43 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,00
19	0,42 ± 0,04	0,13 ± 0,00	0,09 ± 0,01
20	0,35 ± 0,05	0,14 ± 0,00	0,09 ± 0,01
21	0,41 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,02

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,12 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $0,88 \pm 0,06$ mg/dL την 8^η ημέρα επώασης. Ακολούθησαν η ακετόνη και η 2-προπανόλη με συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την 5^η ημέρα επώασης έως $0,14$ mg/dL την ημέρα 0, 1^η, 20^η και 21^η ημέρα, ενώ τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,05 \pm 0,01$ mg/dL τη 2^η ημέρα έως $0,12 \pm 0,00$ mg/dL την 6^η και 7^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* δεν παράγαγε μεθανόλη, ενώ οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα προσδιορίστηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

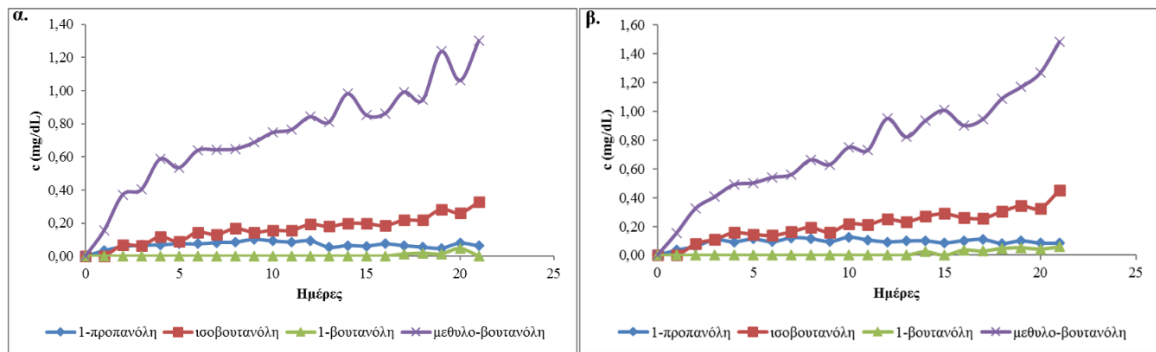
Στο **Σχήμα 56** παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης που παράχθηκαν από την *C. albicans* ήταν υψηλότερες κατά την αναερόβια επώαση σε σύγκριση με τη μικτή επώαση. Υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες, τα επίπεδα της αιθανόλης αυξήθηκαν μέχρι την 6^η ημέρα και παρέμειναν σχεδόν σταθερά μέχρι την 21^η ημέρα, ενώ υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες η αιθανόλη αυξήθηκε ως τη 10^η ημέρα και τα επίπεδά της διατηρήθηκαν σταθερά ως το τέλος της επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που παράχθηκαν από την *C. albicans* υπό μικτές συνθήκες επώασης ήταν

συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες της *K. pneumoniae*, ενώ οι συγκεντρώσεις της υπό αναερόβιες συνθήκες ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες στις καλλιέργειες των τριών βακτηρίων.



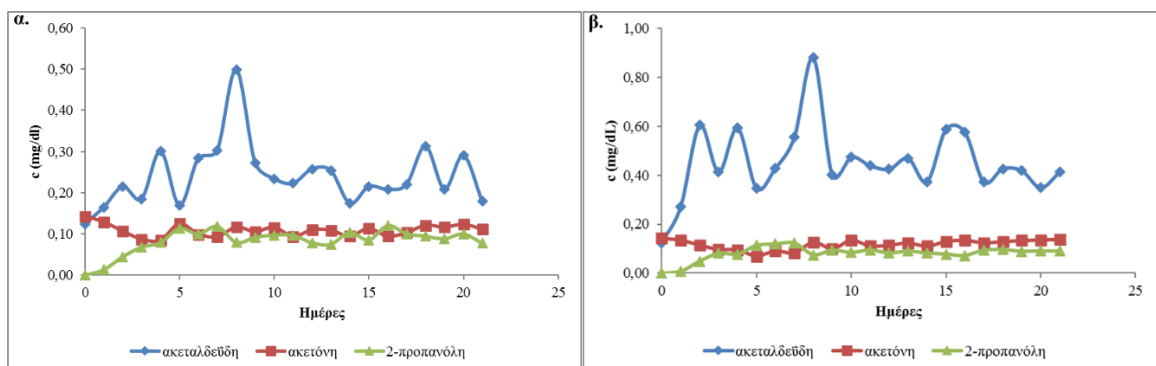
Σχήμα 56: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 57), η μεθυλο-βουτανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ισοβουτανόλη, την 1-προπανόλη και την 1-βουτανόλη. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν υψηλότερες κατά την αναερόβια επώαση σε σύγκριση με τη μικτή, ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και της 1-βουτανόλης ήταν συγκρίσιμες και στις δύο συνθήκες επώασης. Τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης παρουσίασαν έναν σταθερό ρυθμό αύξησης, η 1-προπανόλη είχε έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής καθ' όλη την επωαστική περίοδο, ενώ η 1-βουτανόλη άρχισε να παράγεται σε μικρές συγκεντρώσεις τις τελευταίες ημέρες της επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν υψηλότερες στις καλλιέργειες της *C. albicans* σε σύγκριση με εκείνες των τριών βακτηρίων. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες με εκείνες του *E. faecalis* και χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* και του *S. aureus*, ενώ της 1-βουτανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες που παράχθηκαν από τα τρία βακτήρια.



Σχήμα 57: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 58**), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ακετόνη και τη 2-προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης και της 2-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης ήταν υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση, σε σύγκριση με τη μικτή. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης αυξάνονταν ως την 8^η ημέρα, μειώθηκαν την 9^η και παρέμειναν σχεδόν σταθερές ως το τέλος της επώασης και στις δύο συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης αυξήθηκαν σταδιακά ως την 6^η-7^η ημέρα και παρέμειναν σταθερές ως το τέλος, ενώ η ακετόνη είχε έναν σταθερό ρυθμό παραγωγής καθ' όλη τη διάρκεια της μικτής και αναερόβιας επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στις καλλιέργειες της *C. albicans* ήταν συγκρίσιμες με εκείνες της *K. pneumoniae*, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες του *S. aureus*, ενώ οι συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης ήταν χαμηλότερες από εκείνες των τριών βακτηρίων.



Σχήμα 58: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.6.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε θερμοκρασία 37°C

Υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό BHI, στους 37°C, για 120 ώρες. Στον **Πίνακα 51** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 52** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αερόβια επώαση.

Πίνακας 51: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλοβουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ωρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο- βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
6	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	< LOD	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00
12	0,18 ± 0,00	0,05 ± 0,01	< LOD	< LOD	0,14 ± 0,00
24	0,35 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	< LOD	0,25 ± 0,02
48	0,55 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	< LOD	0,54 ± 0,00
72	0,59 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	< LOD	0,66 ± 0,00
96	0,74 ± 0,10	0,10 ± 0,02	0,22 ± 0,01	< LOD	0,88 ± 0,03
120	0,81 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,00	< LOD	0,83 ± 0,02

Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 3 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,01-0,81 g/L, συγκεντρώσεις λίγο υψηλότερες από εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η μεθυλο-βουτανόλη άρχισε να παράγεται μετά από 3 ώρες επώασης, η 1-προπανόλη μετά από 12 ώρες, ενώ η ισοβουτανόλη μετά από 24 ώρες. Η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις, μικρότερες από το όριο ανίχνευσης. Εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,01-0,88 mg/dL) ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,01-0,22 mg/dL, ενώ τα επίπεδα της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,05-0,15 mg/dL.

Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλοβουτανόλης στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 52: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,31 ± 0,01	0,14 ± 0,00	LOD
24	0,36 ± 0,06	0,13 ± 0,00	0,05 ± 0,00
48	0,26 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00
72	0,18 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,01
96	0,36 ± 0,13	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01
120	0,54 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,12-0,54 mg/dL). Ακολούθησε η ακετόνη και 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν συγκρίσιμες. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από 0,08-0,15 mg/dL και της 2-προπανόλης από 0,05-0,14 mg/dL. Δεν παράχθηκε μεθανόλη, ενώ οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα ήταν μικρότερες από το όριο ανίχνευσης. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C.

Στον **Πίνακα 53** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 54** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, στους 37°C.

Πίνακας 53: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλοβουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο- βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
6	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00
12	0,15 ± 0,02	0,02 ± 0,01	< LOD	< LOD	0,11 ± 0,01
24	0,34 ± 0,01	0,04 ± 0,01	< LOD	< LOD	0,20 ± 0,00
48	0,71 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	< LOD	0,43 ± 0,03
72	0,82 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,15 ± 0,00	< LOD	0,56 ± 0,00
96	0,77 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,04	< LOD	0,89 ± 0,16
120	0,84 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,19 ± 0,00	< LOD	0,72 ± 0,02

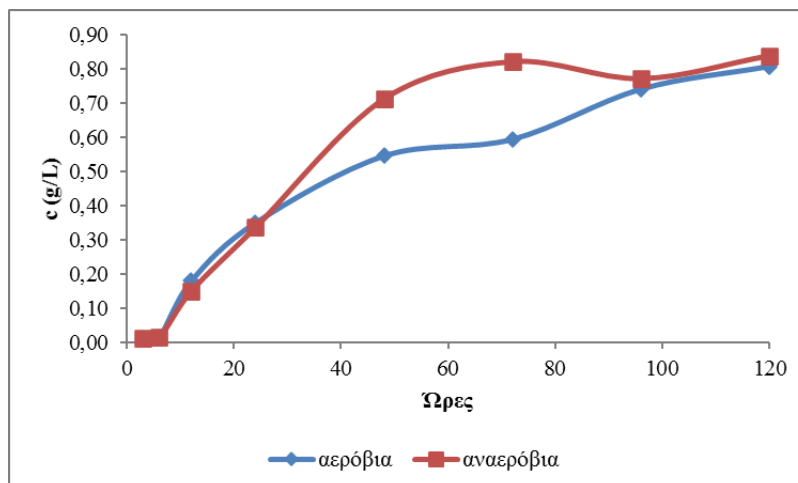
Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 3 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,01-0,84 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η μεθυλο-βουτανόλη άρχισε να παράγεται μετά από 3 ώρες επώασης, η 1-προπανόλη μετά από 12 ώρες, ενώ η ισοβουτανόλη μετά από 48 ώρες. Η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις, μικρότερες από το όριο ανίχνευσης. Εκείνη που παράχθηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (0,01-0,89 mg/dL) ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,09-0,21 mg/dL, ενώ τα επίπεδα της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,02-0,14 mg/dL. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 54: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ώρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,13 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,32 ± 0,01	0,15 ± 0,00	<LOD
24	0,50 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,03 ± 0,00
48	0,38 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,01
72	0,29 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,01
96	0,27 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,02
120	0,37 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00

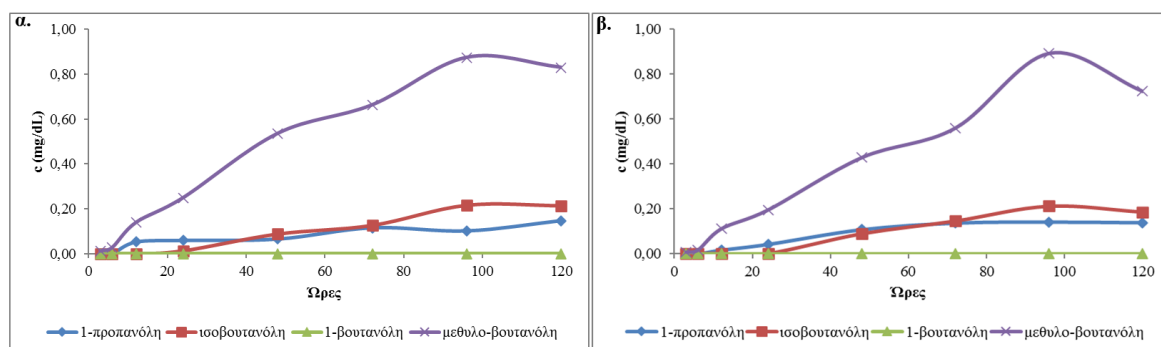
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αναερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,12-0,50 mg/dL). Ακολούθησε η ακετόνη και 2-προπανόλη, οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν συγκρίσιμες. Τα επίπεδα της ακετόνης κυμάνθηκαν από 0,09-0,15 mg/dL και της 2-προπανόλης από 0,03-0,16 mg/dL. Δεν παράχθηκε μεθανόλη, ενώ οι συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα ήταν μικρότερες από το όριο ανίχνευσης. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ τα επίπεδα της ακετόνης και της 2-προπανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμα με εκείνα στους 25°C.

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες από τις 3-24 ώρες και από τις 96-120 ώρες στις δύο συνθήκες επώασης. Μεταξύ των 24 και των 96 ωρών τα επίπεδα της αιθανόλης ήταν υψηλότερα κατά την αναερόβια επώαση σε σύγκριση με τη μικτή (Σχήμα 59). Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη από την αρχή και να αυξάνεται με σταθερό ρυθμό μέχρι το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 59: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

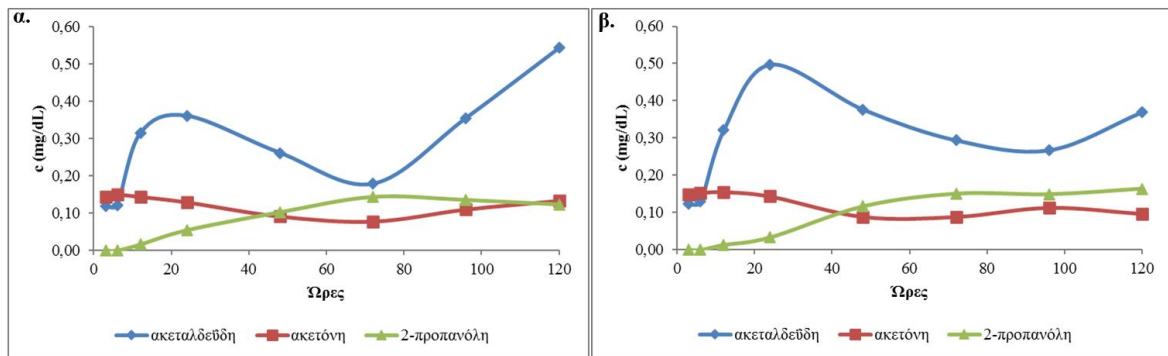
Από τις ανώτερες αλκοόλες (**Σχήμα 60**), η μεθυλο-βουτανόλη παρήγαγε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολούθησαν η ισοβουτανόλη και η 1-προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες και για τις δύο συνθήκες επώασης. Η μεθυλο-βουτανόλη αυξήθηκε ταχέως από την αρχή της επώασης ως τις 96 ώρες και ακολούθησε μία τάση μείωσης των επιπέδων της μέχρι τις 120 ώρες, ενώ η ισοβουτανόλη και η 1-προπανόλη αυξάνονταν με αργό ρυθμό μέχρι το τέλος της επώασης. Η 1-βουτανόλη παρήγαγε μηδαμινές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 60: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 61**), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ακετόνη και τη 2-προπανόλη, οι οποίες ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Υπό αερόβιες συνθήκες, η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε μετά από 24 ώρες επώασης, μειώθηκε μέχρι

τις 72 ώρες κι έπειτα άρχισε να παράγεται ξανά ως το τέλος. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η ακεταλδεΐδη αυξήθηκε μετά από 24 ώρες, μειώθηκε μέχρι τις 96 ώρες και στη συνέχεια άρχισε να παράγεται πάλι ως τις 120 ώρες. Η ακετόνη διατήρησε έναν σχεδόν σταθερό ρυθμό παραγωγής μέχρι το τέλος της επώασης, ενώ η 2-προπανόλη αυξανόταν σταθερά μέχρι τις 72 ώρες και στη συνέχεια παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα ως το τέλος.



Σχήμα 61: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ.

3.3.6.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό ΒΗΙ, στους 4°C, για 21 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Στους **Πίνακες 55** και **56** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 55: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
7	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,00
14	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,00
21	0,09 ± 0,00	0,13 ± 0,00

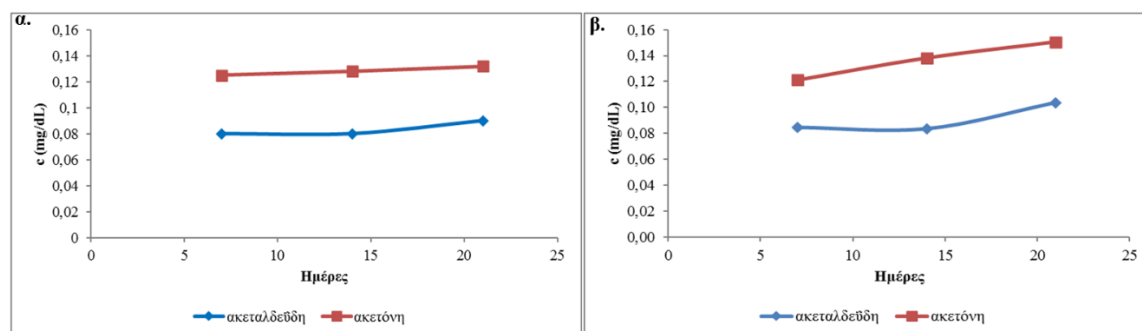
Κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση στους 4°C παράχθηκαν μόνο ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από 0,08-0,09 mg/dL και της ακετόνης 0,13 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Πίνακας 56: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό BHI στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
7	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,01
14	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,00
21	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,00

Κατά την αναερόβια επώαση στους 4°C παράχθηκαν, επίσης, μόνο ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από 0,08-0,10 mg/dL και της ακετόνης από 0,12-0,15 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Και στις δύο συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης ήταν λίγο μεγαλύτερες από εκείνες της ακεταλδεΐδης (**Σχήμα 62**). Κατά τη μικτή επώαση, οι δύο πτητικές ενώσεις παράγονταν με σχετικά σταθερό ρυθμό, ενώ κατά την αναερόβια επώαση παρουσίασαν μία αυξητική τάση.



Σχήμα 62: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεϋδης και της ακετόνης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό BHI.

3.3.7. Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB

3.3.7.1 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 25°C

Υγρές καλλιέργειες του δυνητικά αναερόβιου, θετικού κατά Gram μύκητα *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε καλλιεργητικό υλικό SDB, στους 25°C, για 21 ημέρες. Στον **Πίνακα 57** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) και στον **Πίνακα 58** οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών, ακεταλδεϋδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας και 2-προπανόλη κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση.

Πίνακας 57: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,58 ± 0,00	0,04 ± 0,00	< LOD	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,00

2	2,02 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,00
3	3,90 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,01
4	6,27 ± 0,10	0,33 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,94 ± 0,01
5	7,57 ± 0,20	0,37 ± 0,00	0,50 ± 0,01	< LOD	1,05 ± 0,03
6	8,66 ± 0,08	0,39 ± 0,02	0,56 ± 0,01	< LOD	1,17 ± 0,02
7	9,34 ± 0,05	0,51 ± 0,06	0,68 ± 0,07	< LOD	1,40 ± 0,08
8	9,56 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,72 ± 0,05	< LOD	1,45 ± 0,10
9	9,53 ± 0,05	0,45 ± 0,01	0,66 ± 0,00	< LOD	1,37 ± 0,00
10	9,65 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,69 ± 0,00	< LOD	1,38 ± 0,03
11	9,77 ± 0,13	0,47 ± 0,00	0,74 ± 0,02	0,06 ± 0,01	1,46 ± 0,03
12	9,71 ± 0,11	0,51 ± 0,04	0,74 ± 0,05	0,05 ± 0,01	1,49 ± 0,12
13	9,87 ± 0,07	0,48 ± 0,00	0,70 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,38 ± 0,00
14	9,55 ± 0,07	0,48 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,04 ± 0,02	1,43 ± 0,05
15	9,70 ± 0,07	0,46 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,05 ± 0,01	1,48 ± 0,03
16	9,86 ± 0,15	0,52 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,11 ± 0,00	1,55 ± 0,01
17	9,70 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,05 ± 0,01	1,62 ± 0,02
18	9,70 ± 0,09	0,50 ± 0,00	0,81 ± 0,01	0,11 ± 0,00	1,63 ± 0,00
19	9,85 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,81 ± 0,00	0,16 ± 0,01	1,62 ± 0,01
20	9,87 ± 0,06	0,49 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,09 ± 0,01	1,71 ± 0,04
21	9,70 ± 0,14	0,50 ± 0,00	0,82 ± 0,01	0,18 ± 0,02	1,70 ± 0,03

Η *C. albicans* κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση σε θρεπτικό υλικό SDB παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,58 \pm 0,00$ g/L την 1^η ημέρα έως $9,87$ g/L την 13^η και 20^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή $0,13 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη την 20^η ημέρα με τιμή $1,71 \pm 0,04$ mg/dL. Ακολούθησε η ισοβουτανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε τη 2^η ημέρα επώασης με τιμή $0,13 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα επώασης με τιμή $0,84 \pm 0,02$ mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,04 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα έως

0,52 ± 0,01 mg/dL τη 16^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* ξεκίνησε να παράγει 1-βουτανόλη την 11^η ημέρα επώασης και οι συγκεντρώσεις της κυμάνθηκαν από 0,04 ± 0,02 mg/dL τη 14^η ημέρα έως 0,18 ± 0,02 mg/dL την 21^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 58: Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Ακεταλδεϋδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,61 ± 0,07	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	1,91 ± 0,07	0,01 ± 0,00	<LOD	0,02 ± 0,00
3	1,88 ± 0,03	0,03 ± 0,00	<LOD	0,06 ± 0,00
4	2,49 ± 0,40	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00
5	2,76 ± 0,56	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00
6	3,16 ± 0,28	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,00
7	2,22 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,00
8	2,71 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,19 ± 0,05	0,13 ± 0,00
9	1,99 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,00
10	1,75 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,11 ± 0,02
11	2,62 ± 0,35	0,04 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,13 ± 0,01
12	3,91 ± 0,82	0,04 ± 0,00	0,28 ± 0,05	0,13 ± 0,01
13	3,90 ± 0,64	0,04 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,01
14	3,40 ± 0,22	0,04 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,12 ± 0,01
15	4,07 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,10 ± 0,01
16	6,47 ± 0,54	0,05 ± 0,00	0,34 ± 0,02	0,13 ± 0,00
17	5,37 ± 0,09	0,05 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,00 ± 0,00
18	6,51 ± 0,58	0,05 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,00 ± 0,00

19	8,04 ± 0,28	0,05 ± 0,00	0,52 ± 0,04	0,00 ± 0,00
20	7,11 ± 0,27	0,04 ± 0,01	0,56 ± 0,12	0,00 ± 0,00
21	7,53 ± 0,31	0,05 ± 0,00	0,66 ± 0,02	0,00 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από 0,05 ± 0,00 mg/dL την ημέρα 0 έως 8,04 ± 0,28 mg/dL τη 19^η ημέρα επώασης. Ακολούθησαν ο οξικός αιθυλεστέρας, η 2-προπανόλη και η ακετόνη. Τα επίπεδα του οξικού αιθυλεστέρα κυμάνθηκαν από 0,07 ± 0,00 mg/dL την 4^η ημέρα έως 0,66 ± 0,02 mg/dL την τελευταία ημέρα επώασης, ενώ τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,02 ± 0,00 mg/dL τη 2^η ημέρα έως 0,13 mg/dL την 7^η, 8^η, 11^η, 12^η και 16^η ημέρα επώασης. Επιπλέον, παρήχθησαν πολύ μικρές συγκεντρώσεις ακετόνης που κυμάνθηκαν από 0,01 ± 0,00 τις τρεις πρώτες ημέρες έως 0,05 ± 0,00 τις τελευταίες ημέρες επώασης. Τέλος, η *C. albicans* δεν παρήγαγε καθόλου μεθανόλη.

Στον **Πίνακα 59** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 60** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB.

Πίνακας 59: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,54 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	< LOD	0,12 ± 0,01
2	1,74 ± 0,04	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,01
3	3,44 ± 0,10	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,52 ± 0,02
4	5,16 ± 0,08	0,24 ± 0,01	0,33 ± 0,01	< LOD	0,71 ± 0,01
5	6,74 ± 0,15	0,24 ± 0,01	0,39 ± 0,02	< LOD	0,83 ± 0,04
6	7,54 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,41 ± 0,01	< LOD	0,92 ± 0,02

7	8,64 ± 0,70	0,36 ± 0,05	0,46 ± 0,04	< LOD	1,03 ± 0,10
8	8,74 ± 0,25	0,35 ± 0,03	0,50 ± 0,03	< LOD	1,04 ± 0,07
9	8,60 ± 0,20	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,05	< LOD	0,96 ± 0,10
10	9,55 ± 0,04	0,37 ± 0,00	0,55 ± 0,02	< LOD	1,15 ± 0,01
11	9,84 ± 0,18	0,39 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,02 ± 0,00	1,27 ± 0,05
12	10,1 ± 0,12	0,39 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,03 ± 0,00	1,36 ± 0,05
13	10,1 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,07 ± 0,03	1,28 ± 0,05
14	10,2 ± 0,24	0,39 ± 0,00	0,67 ± 0,02	0,03 ± 0,02	1,33 ± 0,07
15	10,1 ± 0,16	0,37 ± 0,00	0,66 ± 0,03	0,02 ± 0,00	1,31 ± 0,05
16	10,5 ± 0,23	0,41 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,06 ± 0,00	1,46 ± 0,04
17	10,5 ± 0,20	0,43 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,04 ± 0,01	1,47 ± 0,01
18	10,0 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,09 ± 0,02	1,47 ± 0,02
19	10,2 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,58 ± 0,00
20	10,2 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,82 ± 0,06	0,15 ± 0,03	1,70 ± 0,06
21	10,1 ± 0,20	0,40 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,12 ± 0,00	1,58 ± 0,00

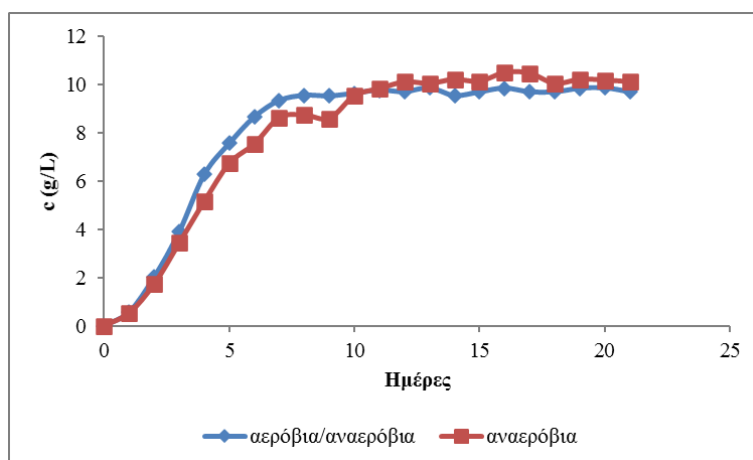
Η *C. albicans* κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση σε θρεπτικό υλικό SDB παράγαγε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από $0,54 \pm 0,01$ g/L την 1^η ημέρα έως $10,5$ g/L τη 16^η και 17^η ημέρα επώασης. Από τις ανώτερες αλκοόλες, εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Η χαμηλότερη συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή $0,12 \pm 0,01$ mg/dL και η υψηλότερη την 20^η ημέρα με τιμή $1,70 \pm 0,06$ mg/dL. Ακολούθησε η ισοβουτανόλη, η χαμηλότερη συγκέντρωση της οποίας μετρήθηκε την 1^η ημέρα επώασης με τιμή $0,05 \pm 0,00$ mg/dL και η υψηλότερη προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα επώασης με τιμή $0,82 \pm 0,06$ mg/dL. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,04 \pm 0,00$ mg/dL την 1^η ημέρα έως $0,46 \pm 0,01$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* ξεκίνησε να παράγει 1-βουτανόλη την 11^η ημέρα επώασης και οι συγκεντρώσεις της κυμάνθηκαν από $0,02 \pm 0,00$ mg/dL την 11^η και 15^η ημέρα έως $0,15 \pm 0,03$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης.

Πίνακας 60: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης, οξικού αιθυλεστέρα και 2-προπανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 25°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL	2-Προπανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
0	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	0,50 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	1,45 ± 0,01	0,01 ± 0,00	<LOD	<LOD
3	1,58 ± 0,03	0,01 ± 0,00	<LOD	0,02 ± 0,00
4	2,50 ± 0,12	0,02 ± 0,00	<LOD	0,05 ± 0,00
5	3,27 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	4,49 ± 0,43	0,04 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00
7	4,65 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,00 ± 0,00
8	4,75 ± 0,49	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,00 ± 0,00
9	4,89 ± 0,41	0,04 ± 0,00	0,15 ± 0,02	0,00 ± 0,00
10	3,20 ± 0,07	0,04 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00
11	3,95 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,00 ± 0,00
12	3,66 ± 0,23	0,04 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,13 ± 0,00
13	3,57 ± 0,26	0,04 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,00
14	2,84 ± 0,28	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,01
15	3,22 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,11 ± 0,00
16	4,34 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,12 ± 0,00
17	4,95 ± 0,42	0,05 ± 0,00	0,33 ± 0,00	0,11 ± 0,00
18	5,90 ± 0,13	0,04 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,00 ± 0,00
19	5,02 ± 0,31	0,04 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,00 ± 0,00
20	6,30 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,65 ± 0,11	0,00 ± 0,00
21	5,86 ± 0,40	0,04 ± 0,00	0,51 ± 0,09	0,00 ± 0,00

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Τα επίπεδά της κυμάνθηκαν από $0,05 \pm 0,00$ mg/dL την ημέρα 0 έως $6,30 \pm 0,00$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης. Ακολούθησαν ο οξικός αιθυλεστέρας, η 2-προπανόλη και η ακετόνη. Τα επίπεδα του οξικού αιθυλεστέρα κυμάνθηκαν από $0,07 \pm 0,00$ mg/dL την 5^η ημέρα έως $0,65 \pm 0,11$ mg/dL την 20^η ημέρα επώασης, ενώ τα επίπεδα της 2-προπανόλης κυμάνθηκαν από $0,02 \pm 0,00$ mg/dL την 3^η ημέρα έως $0,13 \pm 0,00$ mg/dL τη 12^η και 13^η ημέρα επώασης. Επιπλέον, παρήχθησαν πολύ μικρές συγκεντρώσεις ακετόνης που κυμάνθηκαν από $0,01 \pm 0,00$ την ημέρα 0, τη 2^η και 3^η ημέρα έως $0,05 \pm 0,00$ την 11^η και 17^η ημέρα επώασης. Τέλος, η *C. albicans* δεν παρήγαγε καθόλου μεθανόλη.

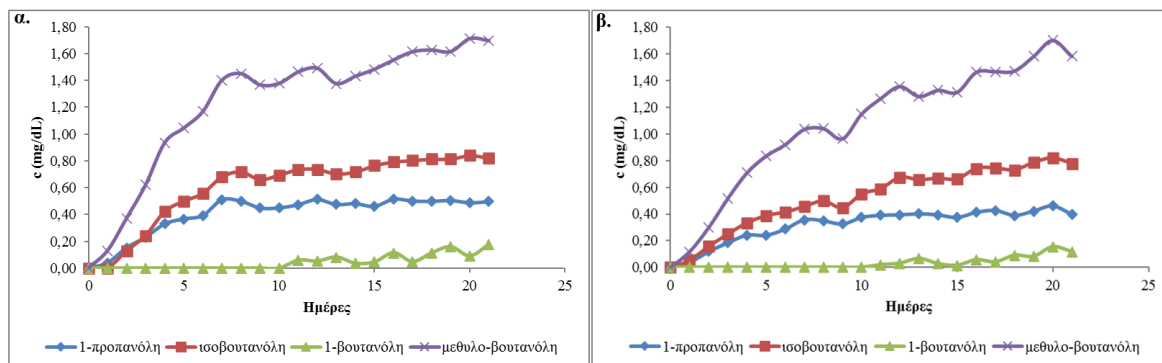
Στο **Σχήμα 63** παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης που παράχθηκαν από την *C. albicans* ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης. Τα επίπεδα της αιθανόλης αυξήθηκαν μέχρι περίπου τη 10^η ημέρα και παρέμειναν σχεδόν σταθερά μέχρι το τέλος της επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που παρήχθησαν από την *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB ήταν περίπου 10 φορές μεγαλύτερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες σε θρεπτικό υλικό BHI.



Σχήμα 63: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια/αναερόβια και αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

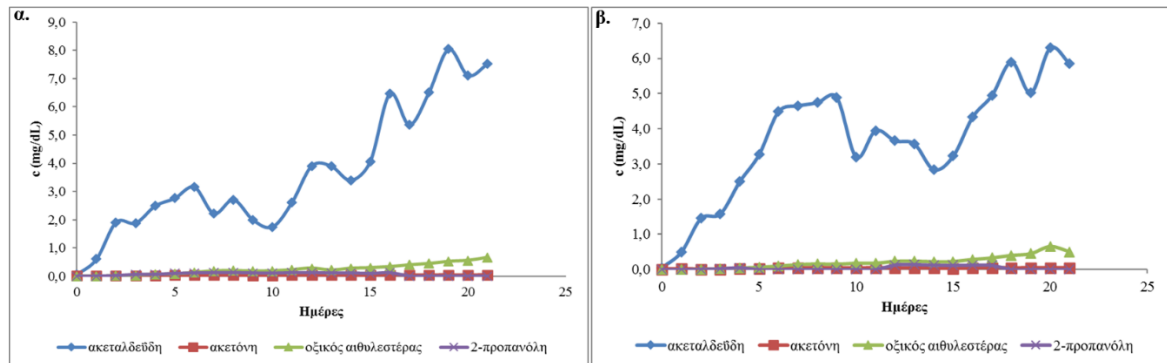
Από τις ανώτερες αλκοόλες (**Σχήμα 64**), η μεθυλο-βουτανόλη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από την ισοβουτανόλη, την 1-προπανόλη και την 1-βουτανόλη και ήταν συγκρίσιμες και στις δύο συνθήκες επώασης. Η μεθυλο-βουτανόλη αυξανόταν με σταθερό ρυθμό καθ' όλη τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου. Τα επίπεδα της ισοβουτανόλης και της 1-προπανόλης αυξήθηκαν μέχρι περίπου την 7^η ημέρα και στη συνέχεια παρέμειναν σταθερά μέχρι το τέλος της επώασης. Τέλος, η 1-

βουτανόλη άρχισε να παράγεται σταδιακά μετά την 11^η ημέρα επώασης. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στις καλλιέργειες της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες σε θρεπτικό υλικό BHI.



Σχήμα 64: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αυστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (**Σχήμα 65**), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τον οξικό αιθυλεστέρα, τη 2-προπανόλη και την ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης ήταν υψηλότερα κατά τη μικτή επώαση σε σύγκριση με την αναερόβια. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης αυξάνονταν με γρήγορο ρυθμό ως το τέλος της επώασης και στις δύο συνθήκες, ενώ τα επίπεδα του οξικού αιθυλεστέρα αυξάνονταν σταδιακά ως το τέλος της επωαστικής περιόδου. Η 2-προπανόλη προσδιορίστηκε μόνο σε ορισμένες ημέρες κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ η ακετόνη παράχθηκε σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης στις καλλιέργειες της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες σε θρεπτικό υλικό BHI, οι συγκεντρώσεις της ακετόνης ήταν χαμηλότερες, ενώ της 2-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες στις καλλιέργειες και με τα δύο θρεπτικά υλικά. Τέλος, στις μυκητιακές καλλιέργειες σε SDB ευνοήθηκε η παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα.



Σχήμα 65: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αστηρά αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 25°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

3.3.7.2 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 37°C

Υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό SDB, στους 37°C, για 120 ώρες. Στον **Πίνακα 61** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 62** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αερόβια επώαση.

Πίνακας 61: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλοβουτανόλης κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο- βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	< LOD	0,00 ± 0,00
6	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	< LOD	0,01 ± 0,00
12	1,09 ± 0,09	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,02	< LOD	0,26 ± 0,03
24	3,35 ± 0,12	0,25 ± 0,03	0,18 ± 0,00	< LOD	0,51 ± 0,00
48	5,34 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,24 ± 0,00	< LOD	0,67 ± 0,01
72	7,39 ± 0,18	0,58 ± 0,01	0,43 ± 0,01	< LOD	1,07 ± 0,02
96	8,75 ± 0,06	0,70 ± 0,01	0,72 ± 0,04	< LOD	1,69 ± 0,12
120	9,56 ± 0,08	0,80 ± 0,01	0,74 ± 0,06	0,05 ± 0,01	1,55 ± 0,08

Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 3 ώρες αερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,01-9,56 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η μεθυλο-βουτανόλη άρχισε να παράγεται μετά από 6 ώρες επώασης, ενώ η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη μετά από 12 ώρες. Η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις, μικρότερες από το όριο ανίχνευσης, εκτός της τελευταίας μέτρησης μετά από 120 ώρες, η τιμή της οποίας προσδιορίστηκε 0,05 ± 0,01 mg/dL. Εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα (0,01-1,69 mg/dL) ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,09-0,80 mg/dL, ενώ τα επίπεδα της ισοβουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,04-0,74 mg/dL. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στους 37°C ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλοβουτανόλης στους 37°C ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 62: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και οξικού αιθυλεστέρα κατά την αερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ώρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,08 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	1,44 ± 0,16	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	2,58 ± 0,23	0,01 ± 0,00	<LOD
48	4,38 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00
72	5,48 ± 0,19	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,01
96	5,39 ± 0,81	0,04 ± 0,00	0,20 ± 0,03
120	4,90 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,23 ± 0,02

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,06-5,48 mg/dL). Ακολούθησε ο οξικός αιθυλεστέρας κι έπειτα η ακετόνη. Τα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα κυμάνθηκαν από 0,05-0,23 mg/dL, ενώ της ακετόνης από 0,01-0,04 mg/dL. Δεν παράχθηκε μεθανόλη και 2-προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και του οξικού αιθυλεστέρα στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ της ακετόνης ήταν συγκρίσιμες.

Στον **Πίνακα 63** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών και στον **Πίνακα 64** οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών συστατικών κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση, στους 37°C.

Πίνακας 63: Συγκεντρώσεις αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης, 1-βουτανόλης και μεθυλοβουτανόλης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ώρες	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο- βουτανόλη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	< LOD	0,00 ± 0,00
6	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	< LOD	< LOD
12	0,47 ± 0,02	0,07 ± 0,00	< LOD	< LOD	0,11 ± 0,00
24	1,93 ± 0,18	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,03
48	4,73 ± 0,04	0,36 ± 0,00	0,20 ± 0,00	< LOD	0,55 ± 0,01
72	7,83 ± 0,97	0,53 ± 0,11	0,36 ± 0,10	< LOD	0,89 ± 0,23
96	8,82 ± 0,07	0,70 ± 0,00	0,49 ± 0,02	< LOD	1,09 ± 0,04
120	9,75 ± 0,06	0,73 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,06 ± 0,00	1,32 ± 0,07

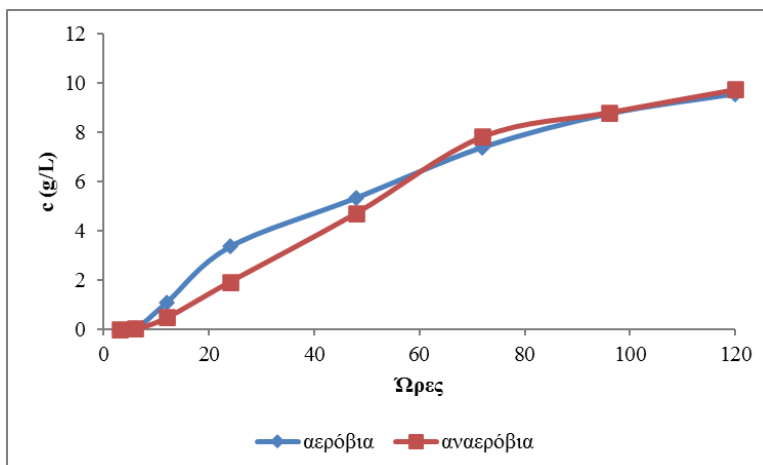
Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη μετά από 3 ώρες αναερόβιας επώασης και κυμάνθηκε από 0,01-9,75 g/L, συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με εκείνες που προσδιορίστηκαν στους 25°C. Από τις ανώτερες αλκοόλες, η μεθυλο-βουτανόλη και η 1-προπανόλη άρχισαν να παράγονται μετά από 12 ώρες επώασης, ενώ η ισοβουτανόλη μετά από 24 ώρες. Η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις, μικρότερες από το όριο ανίχνευσης, εκτός της τελευταίας μέτρησης μετά από 120 ώρες, η τιμή της οποίας προσδιορίστηκε 0,06 ± 0,00 mg/dL. Εκείνη που παράχθηκε σε υψηλότερα επίπεδα (0,11-1,32 mg/dL) ήταν η μεθυλο-βουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης κυμάνθηκαν από 0,07-0,73 mg/dL, ενώ τα επίπεδα της ισοβουτανόλης κυμάνθηκαν από 0,08-0,60 mg/dL. Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης στους 37°C ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ οι συγκεντρώσεις της ισοβουτανόλης και της μεθυλοβουτανόλης στους 37°C ήταν λίγο χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C.

Πίνακας 64: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, ακετόνης και οξικού αιθυλεστέρα κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 37°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση, LOD: όριο ανίχνευσης).

Ωρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL	Οξικός αιθυλεστέρας, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
3	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6	0,07 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12	0,81 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	1,67 ± 0,06	0,02 ± 0,00	<LOD
48	3,25 ± 0,14	0,03 ± 0,00	<LOD
72	3,09 ± 0,53	0,03 ± 0,00	0,13 ± 0,00
96	4,78 ± 0,56	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,00
120	4,80 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,17 ± 0,02

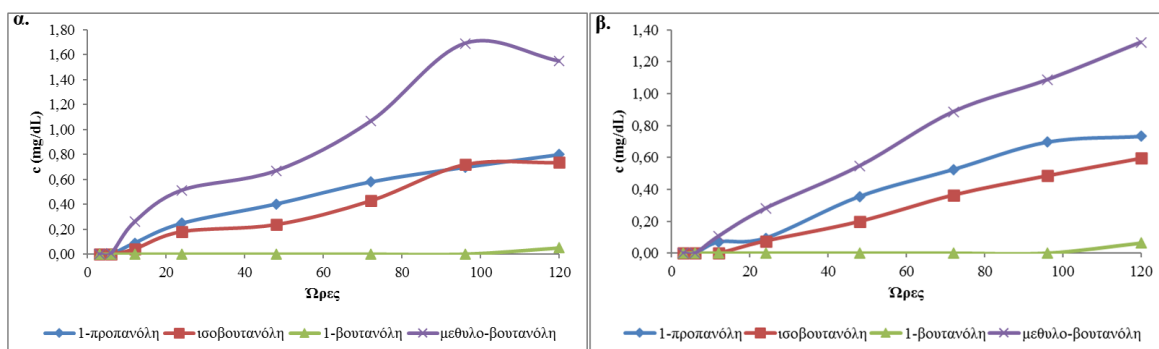
Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά, εκείνο που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους 37°C υπό αναερόβια επώαση ήταν η ακεταλδεΐδη (0,06-4,80 mg/dL). Ακολούθησε ο οξικός αιθυλεστέρας κι έπειτα η ακετόνη. Τα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα κυμάνθηκαν από 0,13-0,17 mg/dL, ενώ της ακετόνης από 0,01-0,04 mg/dL. Δεν παράχθηκε μεθανόλη και 2-προπανόλη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και του οξικού αιθυλεστέρα στους 37°C ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους 25°C, ενώ της ακετόνης ήταν συγκρίσιμες.

Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB ήταν συγκρίσιμες στις δύο συνθήκες επώασης. (Σχήμα 66). Η *C. albicans* άρχισε να παράγει αιθανόλη από την αρχή με γρήγορο ρυθμό μέχρι το τέλος της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 66: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της αιθανόλης κατά την αερόβια και αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

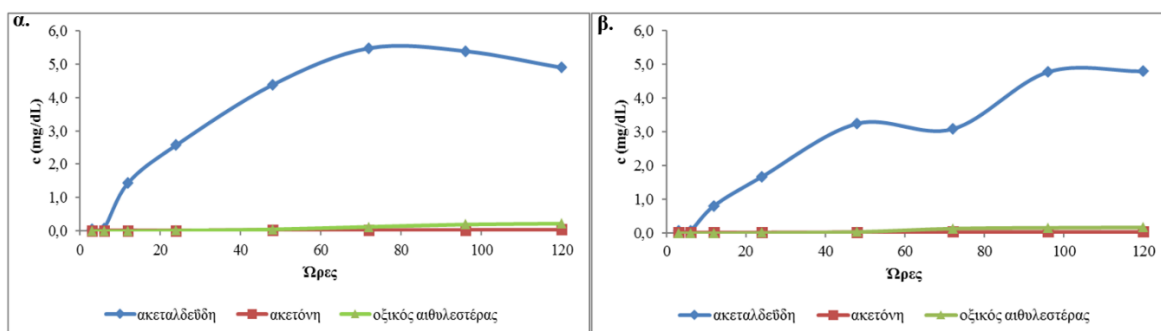
Από τις ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 67), η μεθυλο-βουτανόλη παρήγαγε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολούθησαν η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη. Οι συγκεντρώσεις της μεθυλο-βουτανόλης και της ισοβουτανόλης ήταν υψηλότερες κατά την αερόβια επώαση, ενώ της 1-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες και στις δύο συνθήκες επώασης. Η μεθυλο-βουτανόλη, η 1-προπανόλη και η ισοβουτανόλη αυξάνονταν ταχέως καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, ενώ η 1-βουτανόλη παρήγαγε μηδαμινές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 67: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της 1-βουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

Από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 68), η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ακολουθούμενη από τον οξικό αιθυλεστέρα και την ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης ήταν υψηλότερες κατά την αερόβια επώαση, ενώ της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους και στις δύο συνθήκες επώασης. Η ακεταλδεΐδη αυξανόταν ταχέως καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας άρχισε να παράγεται σε πολύ μικρότερες

συγκεντρώσεις και να αυξάνεται σταδιακά μετά από 24 ώρες. Τέλος, η ακετόνη παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της επωαστικής περιόδου.



Σχήμα 68: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρας κατά την **α.** αερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 120 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

3.3.7.3 Προσδιορισμός πτητικών στις καλλιέργειες της *Candida albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB, σε θερμοκρασία 4°C

Υγρές καλλιέργειες της *C. albicans* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, χωριστά, σε καλλιεργητικό υλικό SDB, στους 4°C, για 21 ημέρες. Δεν παράχθηκαν καθόλου αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες, αντιθέτως προσδιορίστηκε ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Στους **Πίνακες 65** και **66** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που παράχθηκαν στις δύο συνθήκες επώασης.

Πίνακας 65: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 4°C (M.O.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
7	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
14	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
21	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00

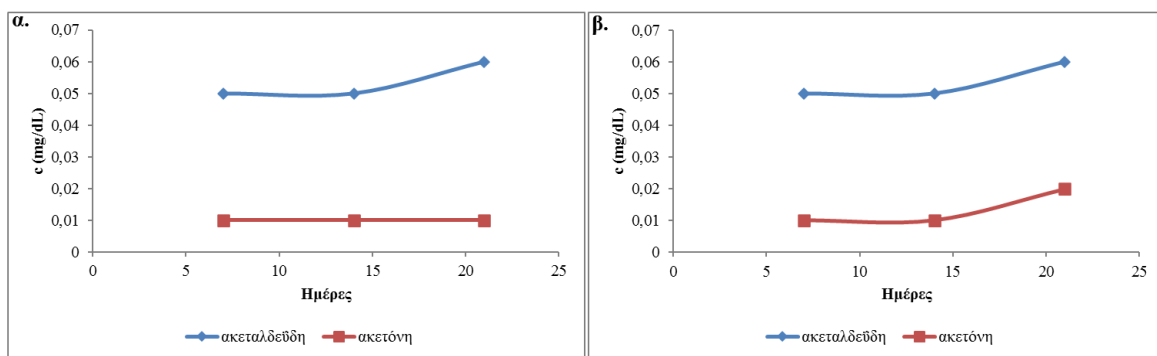
Κατά την αερόβια/αναερόβια επώαση στους 4°C παράχθηκαν μόνο ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από 0,05-0,06 mg/dL και της ακετόνης 0,01 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Πίνακας 66: Συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης και ακετόνης κατά την αναερόβια επώαση της *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB στους 4°C (Μ.Ο.: Μέσος όρος δύο μετρήσεων, S.D.: Τυπική απόκλιση).

Ημέρες	Ακεταλδεΐδη, mg/dL	Ακετόνη, mg/dL
	M.O. ± S.D.	M.O. ± S.D.
7	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
14	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
21	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00

Κατά την αυστηρά αναερόβια επώαση στους 4°C παράχθηκαν μόνο ακεταλδεΐδη και ακετόνη. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης κυμάνθηκαν από 0,05-0,06 mg/dL και της ακετόνης 0,01-0,02 mg/dL καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Και στις δύο συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης ήταν λίγο μεγαλύτερες από εκείνες της ακετόνης (Σχήμα 69). Κατά τη μικτή επώαση, η ακετόνη παραγόταν με σταθερό ρυθμό, ενώ κατά την αναερόβια επώαση είχε μία αυξητική τάση. Η ακεταλδεΐδη μετά από 14 ημέρες παρουσίασε μία τάση αύξησης και στις δύο συνθήκες επώασης.



Σχήμα 69: Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης κατά την **α.** αερόβια/αναερόβια και **β.** αναερόβια επώαση της *C. albicans* για 21 ημέρες στους 4°C σε θρεπτικό υλικό SDB.

3.4 Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης

Όλα τα πειραματικά δεδομένα από κάθε μικροβιακή καλλιέργεια στους 25°C αναλύθηκαν στατιστικά με βηματική γραμμική πολυπαραγοντική ανάλυση. Τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν είναι μαθηματικές εξισώσεις πρώτου βαθμού, στα οποία η αιθανόλη αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή και οι συγγενείς αλκοόλες (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη) τις ανεξάρτητες μεταβλητές και υπολογίζουν την θεωρητική τιμή της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε διάφορα βιολογικά δείγματα. Κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή εισήχθη σταδιακά για την κατασκευή του εκάστοτε μοντέλου, εκτιμήθηκε η σημασία της στο τελικό μοντέλο και συσχετίστηκε με τις υπόλοιπες μεταβλητές.

Η αξιολόγηση των μοντέλων επιτεύχθηκε με τους εξής συντελεστές: τον συντελεστή προσδιορισμού, R^2 , ο οποίος παίρνει τιμές από 0 έως 1. Όσο πιο κοντά στο 1 είναι η τιμή του, τόσο καλύτερη η εφαρμογή του μοντέλου. Ο δεύτερος συντελεστής είναι το μέσο τετραγωνικό σφάλμα, RMSE (Root Mean Squared Error). Όσο πιο κοντά στο 0 είναι η τιμή του, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το μοντέλο.

3.4.1 Μοντέλο για τον *E. faecalis* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Για την κατασκευή του μοντέλου για τον *E. faecalis* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες επώασης (**Εξίσωση 1**) χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές, η 1-προπανόλη, η 1-βουτανόλη και η ισοβουτανόλη. Η μεθυλο-βουτανόλη ελήφθη υπόψη κατά την πολυπαραμετρική ανάλυση, αλλά θεωρήθηκε ασήμαντη και δεν συμπεριλήφθηκε στο τελικό μοντέλο.

$$\text{Αιθανόλη} = 0,16 \times \text{1-προπανόλη} - 1,24 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,27 \times \text{1-βουτανόλη} + 0,09, R^2 = 0,37, \text{RMSE} = 0,01 \quad (1)$$

Η χαμηλή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 δείχνει ότι ένα γραμμικό μοντέλο δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά την θεωρητικά παραγόμενη αιθανόλη από τις τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές.

Σημειώνεται ότι η γραμμική πολυπαραγοντική ανάλυση απέτυχε να δημιουργήσει ένα μοντέλο για τον *E. faecalis* υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης.

3.4.2 Μοντέλα για την *K. pneumoniae* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Το αρχικό μοντέλο για την *K. pneumoniae* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες επώασης κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας και τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη, όπως φαίνεται από την **Εξίσωση 2**.

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,13 \times \text{1-προπανόλη} + 6,17 \times \text{ισοβουτανόλη} + 1,37 \times \text{1-βουτανόλη} - 0,43 \times \\ &\text{μεθυλο-βουτανόλη} - 0,02, \\ R^2 &= 0,94, \text{RMSE} = 0,03 \quad (2) \end{aligned}$$

Όταν για τη γραμμική πολυπαραμετρική ανάλυση χρησιμοποιούνται μόνο οι μεγαλύτερες σε συγκέντρωση αλκοόλες, 1-προπανόλη και μεθυλο-βουτανόλη, το μοντέλο διαμορφώνεται ως ακολούθως (**Εξίσωση 3**):

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,31 \times \text{1-προπανόλη} - 0,41 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 0,05, \\ R^2 &= 0,88, \text{RMSE} = 0,05 \quad (3) \end{aligned}$$

3.4.3 Μοντέλα για την *K. pneumoniae* υπό αναερόβιες συνθήκες

Για την κατασκευή του μοντέλου για την *K. pneumoniae* υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης (**Εξίσωση 4**) χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη. Η ισοβουτανόλη θεωρήθηκε ασήμαντη και δεν συμπεριλήφθηκε στο τελικό μοντέλο.

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,23 \times \text{1-προπανόλη} + 1,20 \times \text{1-βουτανόλη} - 0,27 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 0,03, \\ R^2 &= 0,90, \text{RMSE} = 0,04 \quad (4) \end{aligned}$$

Όταν για την πολυπαραμετρική ανάλυση χρησιμοποιούνται μόνο οι μεγαλύτερες σε συγκέντρωση αλκοόλες, 1-προπανόλη και μεθυλο-βουτανόλη, το μοντέλο διαμορφώνεται ως ακολούθως (**Εξίσωση 5**):

$$\text{Αιθανόλη} = 0,36 \times \text{1-προπανόλη} - 0,71 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 0,10,$$

$$R^2 = 0,83, \text{ RMSE} = 0,05 \quad (5)$$

3.4.4 Μοντέλο για την *K. pneumoniae* τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στο θρεπτικό υλικό υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Το μοντέλο αυτό δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας δύο μόνο ανεξάρτητες μεταβλητές, την 1-προπανόλη και την ισοβουτανόλη (**Εξίσωση 6**) κι έχει πολύ καλή εφαρμογή.

$$\text{Αιθανόλη} = 0,22 \times \text{1-προπανόλη} + 4,56 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,01, \\ R^2 = 0,95, \text{ RMSE} = 0,02 \quad (6)$$

3.4.5 Μοντέλο για την *K. pneumoniae* τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 g/L στο θρεπτικό υλικό υπό αναερόβιες συνθήκες

Ομοίως, για την κατασκευή αυτού του μοντέλου (**Εξίσωση 7**) χρησιμοποιήθηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη και ισοβουτανόλη.

$$\text{Αιθανόλη} = 0,21 \times \text{1-προπανόλη} + 4,38 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,01, \\ R^2 = 0,97, \text{ RMSE} = 0,02 \quad (7)$$

Από την τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , που είναι πολύ κοντά την τιμή 1, συμπεραίνουμε ότι το μοντέλο έχει πολύ καλή εφαρμογή.

3.4.6 Μοντέλο για την *K. pneumoniae* τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στο θρεπτικό υλικό υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Το μοντέλο αυτό δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας τις δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη και ισοβουτανόλη (**Εξίσωση 8**), οι οποίες είναι και οι πιο σημαντικές.

$$\text{Αιθανόλη} = 0,20 \times \text{1-προπανόλη} + 1,16 \times \text{ισοβουτανόλη}, \\ R^2 = 0,99, \text{ RMSE} = 0,01 \quad (8)$$

Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 είναι σχεδόν ίση με 1, άρα το μοντέλο εφαρμόζει πολύ καλά.

3.4.7 Μοντέλο για την *K. pneumoniae* τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 10 g/L στο θρεπτικό υλικό υπό αναερόβιες συνθήκες

Για την κατασκευή αυτού του μοντέλου (Εξίσωση 9) χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, οι πιο σημαντικές, ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη και ισοβουτανόλη.

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,15 \times \text{1-προπανόλη} + 3,04 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,02, \\ R^2 &= 0.97, \text{ RMSE} = 0,01 \quad (9) \end{aligned}$$

3.4.8 Μοντέλο για τον *S. aureus* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Το μοντέλο για τον *S. aureus* υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες επώασης κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας και τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη, όπως φαίνεται από την Εξίσωση 10.

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,28 \times \text{1-προπανόλη} + 3,52 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,91 \times \text{1-βουτανόλη} - 1,05 \times \\ &\text{μεθυλο-βουτανόλη}, \\ R^2 &= 0,85, \text{ RMSE} = 0,03 \quad (10) \end{aligned}$$

3.4.9 Μοντέλο για τον *S. aureus* υπό αναερόβιες συνθήκες

Το μοντέλο του *S. aureus* υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας και τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη, όπως φαίνεται από την Εξίσωση 11.

$$\begin{aligned} \text{Αιθανόλη} &= 0,40 \times \text{1-προπανόλη} + 5,33 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,04 \times \text{1-βουτανόλη} - 1,65 \times \\ &\text{μεθυλο-βουτανόλη} + 0,01, \\ R^2 &= 0,91, \text{ RMSE} = 0,03 \quad (11) \end{aligned}$$

3.4.10 Μοντέλο για την *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Για την κατασκευή αυτού του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις από τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη και περιγράφεται από την **Εξίσωση 12**. Από το μοντέλο εξαιρέθηκε η 1-βουτανόλη, καθώς παράχθηκε σε αμελητέες συγκεντρώσεις στην αντίστοιχη καλλιέργεια στους 25°C.

$$\text{Αιθανόλη} = 3,01 \times \text{1-προπανόλη} - 0,09 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 0,46 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,28, \\ R^2 = 0,49, \text{RMSE} = 0,06 \quad (12)$$

3.4.11 Μοντέλα για την *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό ΒΗΙ υπό αναερόβιες συνθήκες

Ομοίως, το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τρεις από τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές. Η πιο σημαντική μεταβλητή ήταν η 1-προπανόλη, ακολουθούμενη από την ισοβουτανόλη και τέλος, τη μεθυλο-βουτανόλη (**Εξίσωση 13**).

$$\text{Αιθανόλη} = 3,98 \times \text{1-προπανόλη} - 0,25 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 1,10 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,33, \\ R^2 = 0,68, \text{RMSE} = 0,08 \quad (13)$$

Ένα πιο απλοποιημένο μοντέλο χρησιμοποιώντας μόνο δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, την 1-προπανόλη και την ισοβουτανόλη, περιγράφεται από την **Εξίσωση 14**:

$$\text{Αιθανόλη} = 4,30 \times \text{1-προπανόλη} + 0,29 \times \text{ισοβουτανόλη} \text{ (ή μεθυλο-βουτανόλη)} + 0,28, \\ R^2 = 0,67, \text{RMSE} = 0,08 \quad (14)$$

Η ισοβουτανόλη συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη μεθυλο-βουτανόλη κι επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά είτε η μία είτε η άλλη στη γραμμική εξίσωση.

3.4.12 Μοντέλα για την *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB υπό αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες

Για την κατασκευή του μοντέλου αυτού (**Εξίσωση 15**) χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις από τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλοβουτανόλη.

$$\text{Αιθανόλη} = 10,4 \times 1\text{-προπανόλη} - 2,24 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} + 9,62 \times \text{ισοβουτανόλη} + 0,76, \\ R^2 = 0,95, \text{RMSE} = 0,60 \quad (15)$$

Ένα πιο απλοποιημένο μοντέλο χρησιμοποιώντας μόνο δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, την 1-προπανόλη και την ισοβουτανόλη, περιγράφεται από την **Εξίσωση 16**:

$$\text{Αιθανόλη} = 10,4 \times 1\text{-προπανόλη} + 5,58 \times \text{ισοβουτανόλη (ή μεθυλο-βουτανόλη)} + 0,43, \\ R^2 = 0,95, \text{RMSE} = 0,61 \quad (16)$$

3.4.13 Μοντέλα για την *C. albicans* σε θρεπτικό υλικό SDB υπό αναερόβιες συνθήκες

Ομοίως, το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τρεις από τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλοβουτανόλη. Όπως και στα προηγούμενα μοντέλα της *C. albicans*, εξαιρέθηκε η 1-βουτανόλη, διότι οι συγκεντρώσεις της ήταν αμελητέες στις αντίστοιχες καλλιέργειες στους 25°C. Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει σημαντική γραμμικότητα και περιγράφεται από την **Εξίσωση 17**:

$$\text{Αιθανόλη} = 20,6 \times 1\text{-προπανόλη} + 4,13 \times \text{μεθυλο-βουτανόλη} - 5,16 \times \text{ισοβουτανόλη} - 0,42, \\ R^2 = 0,95, \text{RMSE} = 0,71 \quad (17)$$

Ένα πιο απλοποιημένο μοντέλο χρησιμοποιώντας μόνο δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, την 1-προπανόλη και την ισοβουτανόλη, περιγράφεται από την **Εξίσωση 18**:

$$\text{Αιθανόλη} = 21,5 \times 1\text{-προπανόλη} + 1,31 \times \text{ισοβουτανόλη (ή μεθυλο-βουτανόλη)} - 0,38, \\ R^2 = 0,95, \text{RMSE} = 0,71 \quad (18)$$

Ομοίως, όπως και στα προηγούμενα απλοποιημένα μοντέλα της *C. albicans*, η ισοβουτανόλη συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη μεθυλοβουτανόλη κι επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά είτε η μία είτε η άλλη στη γραμμική εξίσωση.

Όλα τα μικροβιακά μοντέλα που περιγράφηκαν παραπάνω περιλαμβάνονται συνοπτικά στον **Πίνακα 67**. Η συντομογραφία EF αναφέρεται στο μοντέλο του *E. faecalis*, οι KP1-8 στα μοντέλα της *K. pneumoniae*, οι SA1-2 στα μοντέλα του *S. aureus* και οι CA1-7 στα μοντέλα της *C. albicans*.

Πίνακας 67: Κατάλογος βακτηριακών και μυκητιακών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακής συγκέντρωσης αιθανόλης (σε g/L) από τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών (σε mg/dL).

	No	Μοντέλο	Μοντέλο (Εξίσωση)	R ²
Βακτηριακά	1	EF	Αιθανόλη = 0,16 x 1-προπανόλη – 1,24 x ισοβουτανόλη + 0,27 x 1-βουτανόλη + 0,09	0,37
	2	KP1	Αιθανόλη = 0,13 x 1-προπανόλη + 6,17 x ισοβουτανόλη + 1,37 x 1-βουτανόλη – 0,43 x μεθυλο-βουτανόλη – 0,02	0,94
	3	KP2	Αιθανόλη = 0,31 x 1-προπανόλη – 0,41 x μεθυλο-βουτανόλη + 0,05	0,88
	4	KP3	Αιθανόλη = 0,23 x 1-προπανόλη + 1,20 x 1-βουτανόλη – 0,27 x μεθυλο-βουτανόλη + 0,03	0,90
	5	KP4	Αιθανόλη = 0,36 x 1-προπανόλη – 0,71 x μεθυλο-βουτανόλη + 0,10	0,83
	6	KP5	Αιθανόλη = 0,22 x 1-προπανόλη + 4,56 x ισοβουτανόλη + 0,01	0,95
	7	KP6	Αιθανόλη = 0,21 x 1-προπανόλη + 4,38 x ισοβουτανόλη + 0,01	0,97
	8	KP7	Αιθανόλη = 0,20 x 1-προπανόλη + 1,16 x ισοβουτανόλη	0,99
	9	KP8	Αιθανόλη = 0,15 x 1-προπανόλη + 3,04 x ισοβουτανόλη + 0,02	0,97
	10	SA1	Αιθανόλη = 0,28 x 1-προπανόλη + 3,52 x ισοβουτανόλη + 0,91 x 1-βουτανόλη – 1,05 x μεθυλο-βουτανόλη	0,85
	11	SA2	Αιθανόλη = 0,40 x 1-προπανόλη + 5,33 x ισοβουτανόλη + 0,04 x 1-βουτανόλη – 1,65 x μεθυλο-βουτανόλη + 0,01	0,91
Μυκητιακά	12	CA1	Αιθανόλη = 3,01 x 1-προπανόλη – 0,09 x μεθυλο-βουτανόλη + 0,46 x ισοβουτανόλη + 0,28	0,49
	13	CA2	Αιθανόλη = 3,98 x 1-προπανόλη – 0,25 x μεθυλο-βουτανόλη + 1,10 x ισοβουτανόλη + 0,33	0,68
	14	CA3	Αιθανόλη = 4,30 x 1-προπανόλη + 0,29 x ισοβουτανόλη (ή μεθυλο-βουτανόλη) + 0,28	0,67
	15	CA4	Αιθανόλη = 10,4 x 1-προπανόλη – 2,24 x μεθυλο-βουτανόλη + 9,62 x ισοβουτανόλη + 0,76	0,95
	16	CA5	Αιθανόλη = 10,4 x 1-προπανόλη + 5,58 x ισοβουτανόλη (ή μεθυλο-βουτανόλη) + 0,43	0,95
	17	CA6	Αιθανόλη = 20,6 x 1-προπανόλη + 4,13 x μεθυλο-βουτανόλη – 5,16 x ισοβουτανόλη – 0,42	0,95
	18	CA7	Αιθανόλη = 21,5 x 1-προπανόλη + 1,31 x ισοβουτανόλη (ή μεθυλο-βουτανόλη) – 0,38	0,95

3.5 Εφαρμοσιμότητα των μικροβιακών μοντέλων

Η εφαρμοσιμότητα των εξαχθέντων μικροβιακών μοντέλων, δηλαδή η ικανότητα να υπολογιστεί με ακρίβεια η συγκέντρωση της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης από τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών σε ένα βιολογικό δείγμα, μελετήθηκε σε μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C, σε μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C, καθώς και σε βιολογικά δείγματα από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών.

3.5.1 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C

Η δυνατότητα εφαρμογής των μικροβιακών μοντέλων, που περιγράφονται από τις εξισώσεις 1-18 (Πίνακας 67) ελέγχθηκε σε καλλιέργειες της *K. pneumoniae*, του *S. aureus*, του *E. faecalis* και της *C. albicans* στους 37°C (θετικά δείγματα ελέγχου). Τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 0,10 g/L χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μοντέλων. Η θεωρητικά παραγόμενη μικροβιακή αιθανόλη υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα μοντέλα και η τιμή που λήφθηκε συγκρίθηκε με την αντίστοιχη πειραματική συγκέντρωση αιθανόλης. Για να θεωρηθεί επιτυχής η εφαρμογή κάθε μοντέλου κατά τη σύγκριση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης με τη πειραματική τιμή της, τέθηκε ως κριτήριο το τυπικό σφάλμα (E%) να είναι μικρότερο από $\pm 40\%$.

Περίληπτικά, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μοντέλων περιλάμβαναν 6 δείγματα του *S. aureus* και του *E. faecalis* μετά από 12 ώρες επώασης, 8 δείγματα της *K. pneumoniae* μετά από 6 ώρες επώασης και 12 δείγματα της *C. albicans* μετά από 12 ώρες επώασης.

Στον **Πίνακα 68** παρουσιάζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των αλκοολών που παρήχθησαν στις μικροβιακές καλλιέργειες, σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά (BHI ή SDB), στους 37°C, υπό αερόβιες (Αε) ή αναερόβιες (Αν) συνθήκες επώασης.

Πίνακας 68: Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες στους 37°C.

Μικροβιακές καλλιέργειες	Αιθανόλη, g/L	Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών, mg/dL			
		1- Προπανόλη	Ισοβουτανόλη	1- Βουτανόλη	Μεθυλο- βουτανόλη
<i>E. faecalis</i> , BHI, Αε	0,05-0,13	0,04-0,10	0-0,01	0,04-0,18	0,02-0,03
<i>E. faecalis</i> , BHI, Αν	0,03-0,15	0,05-0,10	0-0,01	0,02-0,18	0,02-0,03
<i>K. pneumoniae</i> , BHI, Αε	0,34-0,59	0,23-1,24	0,01-0,03	0,12-0,22	0,04-0,21
<i>K. pneumoniae</i> , BHI, Αν	0,33-0,63	0,19-0,81	0,01-0,03	0,10-0,24	0,03-0,14
<i>S. aureus</i> , BHI, Αε	0,10-0,13	0,10-0,14	0,02-0,03	0,11-0,15	0,02-0,03
<i>S. aureus</i> , BHI, Αν	0,11-0,15	0,10-0,18	0,02-0,03	0,15-0,16	0,02-0,04
<i>C. albicans</i> , BHI, Αε	0,01-0,84	0,04-0,15	0,01-0,23	0	0,01-0,91
<i>C. albicans</i> , BHI, Αν	0,01-0,86	0,01-0,15	0,08-0,25	0	0,01-1,05
<i>C. albicans</i> , SDB, Αε	0,01-9,64	0,09-0,81	0,03-0,80	0,04-0,06	0,01-1,81
<i>C. albicans</i> , SDB, Αν	0,01-9,80	0,06-0,75	0,06-0,63	0,06-0,07	0,10-1,39

Όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 68**, τα επίπεδα των αλκοολών ήταν συγκρίσιμα στις καλλιέργειες του ίδιου βακτηρίου, υπό διαφορετικές συνθήκες επώασης, και η αιθανόλη ήταν η κυρίαρχη αλκοόλη. Η *K. pneumoniae* παρήγαγε περισσότερη αιθανόλη από τα υπόλοιπα βακτήρια υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες. Η μεγαλύτερη σε συγκέντρωση συγγενής αλκοόλη ήταν η 1-προπανόλη για την *K. pneumoniae*, η 1-βουτανόλη για τον *E. faecalis* και η μεθυλο-βουτανόλη για την *C. albicans*. Επίσης, ο *S. aureus* παρήγαγε συγκρίσιμες ποσότητες 1-προπανόλης και 1-βουτανόλης.

Όσον αφορά τις καλλιέργειες του μύκητα, στο θρεπτικό υλικό SDB, παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης και ανώτερων αλκοολών από ότι στο θρεπτικό υλικό BHI. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν παράχθηκε 1-βουτανόλη, παρά μόνο μετά από 120 ώρες επώασης στις καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό SDB. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις των αλκοολών που παράγονται από κάθε μικρόβιο θα μπορούσαν να είναι διαφορετικές, αν αλλάξουν οι συνθήκες καλλιέργειας.

Στον **Πίνακα 69** παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά σύνολο επιλεγμένων δειγμάτων από τις αντίστοιχες μικροβιακές καλλιέργειες.

Πίνακας 69: Ο αριθμός των δειγμάτων (*n*) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (*N*) των μικροβιακών καλλιιεργειών στους 37°C.

Μικροβιακές καλλιέργειες		<i>E. f.</i> , BHI/ Aε	<i>E. f.</i> , BHI/ Av	<i>K. p.</i> , BHI/ Aε	<i>K. p.</i> , BHI/ Av	<i>S. a.</i> , BHI/ Aε	<i>S. a.</i> , BHI/ Av	<i>C. a.</i> , BHI/ Aε	<i>C. a.</i> , BHI/ Av	<i>C. a.</i> , SDB/ Aε	<i>C. a.</i> , SDB/ Av
No	MM										
1	EF	6/6	6/6	0/8	0/8	6/6	6/6	0/12	1/12	0/12	0/12
2	KP1	0/6	0/6	7/8	6/8	0/6	0/6	7/12	6/12	0/12	0/12
3	KP2	0/6	0/6	1/8	0/8	6/6	4/6	0/12	0/12	0/12	0/12
4	KP3	0/6	0/6	8/8	6/8	0/6	0/6	0/12	0/12	0/12	0/12
5	KP4	6/6	6/6	3/8	0/8	6/6	6/6	0/12	0/12	0/12	0/12
6	KP5	2/6	0/6	4/8	0/8	6/6	6/6	7/12	6/12	0/12	0/12
7	KP6	2/6	0/6	4/8	0/8	6/6	6/6	7/12	6/12	0/12	0/12
8	KP7	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	0/12	0/12	0/12	0/12
9	KP8	0/6	0/6	0/8	0/8	6/6	6/6	6/12	4/12	0/12	0/12
10	SA1	1/6	2/6	6/8	6/8	0/6	0/6	0/12	0/12	0/12	0/12
11	SA2	0/6	0/6	1/8	0/8	6/6	5/6	0/12	0/12	0/12	0/12
12	CA1	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	10/12	10/12	0/12	2/12
13	CA2	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	9/12	9/12	1/12	2/12
14	CA3	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	8/12	9/12	1/12	2/12
15	CA4	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	0/12	0/12	11/12	10/12
16	CA5	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	0/12	0/12	11/12	10/12
17	CA6	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	0/12	0/12	0/12	2/12
18	CA7	0/6	0/6	0/8	0/8	0/6	0/6	0/12	0/12	0/12	2/12

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 69**, η δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων ποικίλλει μεταξύ των δειγμάτων από διαφορετικές μικροβιακές καλλιέργειες. Γενικά, τα βακτηριακά μοντέλα εφαρμόστηκαν καλύτερα σε δείγματα από καλλιέργειες βακτηρίων παρά σε καλλιέργειες μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα, τα μοντέλα KP1-6 και KP8 της *K. pneumoniae* είχαν τα μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας μεταξύ όλων των βακτηριακών μοντέλων, τόσο σε δείγματα βακτηρίων όσο και μυκήτων (έως και 100% των δειγμάτων με E% ≤ 40%). Το μοντέλο EF εφαρμόστηκε με 100% επιτυχία μόνο στα δείγματα από καλλιέργειες του *E. faecalis* και του *S. aureus* στους 37°C. Επίσης, τα SA μοντέλα εφαρμόστηκαν αποκλειστικά σε βακτηριακά δείγματα (έως 75% επιτυχία το SA1 και 100% επιτυχία το SA2). Τα CA

μοντέλα εφαρμόστηκαν αποκλειστικά σε δείγματα μυκήτων, ενώ απέτυχαν να εφαρμοστούν στα δείγματα από βακτηριακές καλλιέργειες. Τα μοντέλα CA1-5 εφαρμόστηκαν στα περισσότερα δείγματα από τα υπόλοιπα μοντέλα του μύκητα (έως 92% επιτυχία).

3.5.2 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C

Η εφαρμοσιμότητα των μικροβιακών μοντέλων, που περιγράφονται από τις εξισώσεις 1-18 (Πίνακας 67) ελέγχθηκε σε καλλιέργειες της *K. pneumoniae*, του *S. aureus*, του *E. faecalis* και της *C. albicans* σε ανθρώπινο φυσιολογικό μετουσιωμένο αίμα, όξινο (οξ) ή ουδέτερο (ουδ), με ή χωρίς προσθήκη γλυκόζης (γλυ), στους 25°C, υπό αερόβιες/αναερόβιες (AA) ή αναερόβιες (Av) συνθήκες επώασης. Τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 0,10 g/L χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μοντέλων. Η θεωρητικά παραγόμενη μικροβιακή αιθανόλη υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα μοντέλα και η τιμή που λήφθηκε συγκρίθηκε με την αντίστοιχη πειραματική συγκέντρωση αιθανόλης. Για να θεωρηθεί επιτυχής η εφαρμογή κάθε μοντέλου κατά τη σύγκριση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης με τη πειραματική τιμή της, τέθηκε ως κριτήριο το τυπικό σφάλμα (E%) να είναι μικρότερο από $\pm 40\%$.

Στον **Πίνακα 70** παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των αλκοολών όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μικροβιακών μοντέλων.

Πίνακας 70: Συγκεντρώσεις αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο μετουσιωμένο αίμα (ΜΑ), όξινο (οξ) ή ουδέτερο (ουδ), με ή χωρίς προσθήκη γλυκόζης (γλυ), στους 25°C, υπό αερόβιες/αναερόβιες (ΑΑ) ή αναερόβιες (Αν) συνθήκες επώασης. Επιλέχθηκαν δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 0,10 g/L.

Μικρόβιο /Συνθήκες	No	Αιθανόλη, g/L	1-Προπανόλη, mg/dL	Ισοβουτανόλη, mg/dL	1-Βουτανόλη, mg/dL	Μεθυλο-βουτανόλη, mg/dL
<i>K. pneumoniae</i> /ΑΑ	1	0,24	0,10	0,00	0,00	0,01
	2	0,26	0,10	0,00	0,00	0,03
	3	0,27	0,13	0,00	0,00	0,03
	4	0,32	0,07	0,00	0,00	0,01
	5	0,34	0,07	0,00	0,00	0,02
	6	0,38	0,11	0,00	0,00	0,01
	7	0,38	0,08	0,00	0,00	0,01
	8	0,43	0,06	0,00	0,00	0,01
	9	0,46	0,08	0,00	0,00	0,00
	10	0,47	0,09	0,00	0,00	0,01
	11	0,47	0,08	0,00	0,00	0,01
	12	0,48	0,05	0,00	0,00	0,00
	13	0,49	0,09	0,00	0,00	0,00
	14	0,52	0,07	0,00	0,00	0,01
<i>K. pneumoniae</i> /Αν	1	0,45	0,26	0,00	0,00	0,00
	2	0,46	0,79	0,00	0,00	0,03
	3	0,50	0,56	0,00	0,00	0,01
	4	0,51	0,23	0,00	0,00	0,00
	5	0,51	0,48	0,00	0,00	0,03
	6	0,52	0,79	0,00	0,00	0,01
	7	0,53	0,44	0,00	0,00	0,01
	8	0,54	0,22	0,00	0,00	0,01
	9	0,54	0,42	0,00	0,00	0,03
	10	0,55	0,27	0,00	0,00	0,00
	11	0,56	0,25	0,00	0,00	0,00
	12	0,56	0,23	0,00	0,00	0,01
	13	0,58	0,24	0,00	0,00	0,01
	14	0,58	0,26	0,00	0,00	0,01

<i>S. aureus</i> /AA	1	0,42	0,10	0,42	0,11	0,14
	2	0,42	0,26	0,31	0,02	0,12
	3	0,45	0,14	0,31	0,05	0,12
	4	0,47	0,44	0,28	0,07	0,09
	5	0,48	0,53	0,27	0,11	0,08
	6	0,49	0,55	0,23	0,08	0,08
	7	0,50	0,18	0,36	0,13	0,12
	8	0,53	0,62	0,27	0,07	0,09
	9	0,54	0,18	0,40	0,13	0,14
	10	0,11	0,11	0,00	0,09	0,02
<i>S. aureus</i> /Av	1	0,50	0,57	0,21	0,10	0,08
	2	0,54	0,54	0,19	0,09	0,07
	3	0,55	0,16	0,36	0,10	0,14
	4	0,55	0,20	0,34	0,10	0,11
	5	0,59	0,55	0,19	0,08	0,08
<i>C. albicans</i> 0ξ + 1 g/L γλν	1	0,14	0,04	0,00	0,00	0,07
	2	0,17	0,00	0,00	0,00	0,07
	3	0,20	0,03	0,00	0,00	0,07
	4	0,23	0,00	0,01	0,00	0,07
	5	0,34	0,02	0,02	0,00	0,06
	6	0,41	0,05	0,02	0,00	0,07
	7	0,49	0,07	0,00	0,00	0,05
	8	0,53	0,08	0,00	0,00	0,05
<i>C. albicans</i> 0ξ + 3 g/L γλν	1	0,82	0,08	0,09	0,00	0,10
	2	1,01	0,14	0,14	0,00	0,14
	3	1,08	0,05	0,07	0,00	0,09
	4	1,12	0,07	0,11	0,00	0,11
	5	1,12	0,12	0,13	0,00	0,12
	6	1,14	0,05	0,06	0,00	0,08
	7	1,14	0,10	0,14	0,00	0,13
	8	1,19	0,12	0,15	0,00	0,13
<i>C. albicans</i> 0ξ + 7 g/L γλν	1	1,79	0,09	0,15	0,00	0,12
	2	2,16	0,18	0,19	0,00	0,15
	3	2,33	0,19	0,29	0,00	0,21
	4	2,44	0,21	0,32	0,00	0,22
	5	2,62	0,22	0,37	0,00	0,26
	6	2,68	0,19	0,41	0,00	0,28
	7	2,83	0,25	0,41	0,00	0,27

	8	2,85	0,21	0,39	0,00	0,26
<i>C. albicans</i> οξ + 11 g/L γλν	1	1,98	0,15	0,17	0,00	0,14
	2	2,09	0,10	0,17	0,00	0,14
	3	4,07	0,31	0,41	0,00	0,28
	4	4,08	0,34	0,42	0,00	0,28
	5	4,20	0,26	0,56	0,00	0,41
	6	4,21	0,32	0,50	0,00	0,33
	7	4,65	0,34	0,56	0,00	0,37
	8	4,72	0,27	0,56	0,00	0,37
<i>C. albicans</i> ονδ + 1 g/L γλν	1	0,28	0,03	0,03	0,00	0,07
	2	0,29	0,03	0,01	0,00	0,06
	3	0,35	0,03	0,03	0,00	0,07
	4	0,35	0,05	0,03	0,00	0,07
	5	0,36	0,06	0,06	0,00	0,09
	6	0,45	0,02	0,00	0,00	0,05
	7	0,48	0,06	0,00	0,00	0,04
	8	0,52	0,03	0,07	0,00	0,09
<i>C. albicans</i> ονδ + 3 g/L γλν	1	0,98	0,11	0,10	0,00	0,11
	2	0,99	0,13	0,11	0,00	0,12
	3	1,03	0,07	0,14	0,00	0,13
	4	1,12	0,12	0,15	0,00	0,13
	5	1,14	0,12	0,14	0,00	0,13
	6	1,19	0,11	0,16	0,00	0,15
	7	1,19	0,10	0,08	0,00	0,09
	8	1,25	0,11	0,08	0,00	0,10
<i>C. albicans</i> ονδ + 7 g/L γλν	1	1,79	0,09	0,15	0,00	0,12
	2	2,22	0,18	0,20	0,00	0,15
	3	2,62	0,21	0,37	0,00	0,27
	4	2,65	0,21	0,36	0,00	0,26
	5	2,71	0,22	0,43	0,00	0,30
	6	2,72	0,19	0,38	0,00	0,26
	7	3,06	0,19	0,44	0,00	0,29
	8	3,20	0,21	0,41	0,00	0,29
<i>C. albicans</i> ονδ + 11 g/L γλν	1	1,99	0,16	0,17	0,00	0,15
	2	2,21	0,17	0,14	0,00	0,13
	3	2,84	0,21	0,25	0,00	0,21
	4	2,94	0,21	0,31	0,00	0,26
	5	3,46	0,18	0,34	0,00	0,25

	6	3,57	0,25	0,33	0,00	0,25
	7	3,69	0,24	0,41	0,00	0,30
	8	3,78	0,27	0,44	0,00	0,32
<i>C. albicans</i> οξ + δεξτρ 5% w/v	1	1,70	0,14	0,19	0,00	0,15
	2	1,77	0,13	0,23	0,00	0,16
	3	3,38	0,30	0,73	0,00	0,47
	4	3,39	0,30	0,65	0,00	0,42
	5	3,41	0,32	0,84	0,00	0,56
	6	3,43	0,31	0,67	0,00	0,40
	7	3,58	0,30	0,66	0,00	0,40
	8	3,86	0,35	0,80	0,00	0,46

Στον **Πίνακα 71** παρουσιάζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των αλκοολών που παρήχθησαν στις μικροβιακές καλλιέργειες, σε ανθρώπινο φυσιολογικό ΜΑ, με ή χωρίς προσθήκη γλυκόζης, στους 25°C, υπό ΑΑ ή Αν συνθήκες επώασης. Το ανθρώπινο ΜΑ χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο του απαλλαγμένου από μικρόβια μεταθανάτιου αίματος.

Πίνακας 71: Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο ΜΑ στους 25°C.

Μικροβιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο ΜΑ ± προστιθέμενη γλυκόζη	Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών, mg/dL				
	Αιθανόλη, g/L	1- Προπανόλη	Ισοβουτανόλη	1- Βουτανόλη	Μεθυλοβουτανόλη
<i>E. faecalis</i> , AA	0,01-0,05	0	0	0	0,01-0,12
<i>E. faecalis</i> , Av	0,01-0,07	0-0,01	0	0	0,01-0,18
<i>K. pneumoniae</i> , AA	0,24-0,52	0,05-0,13	0	0	0,01-0,03
<i>K. pneumoniae</i> , Av	0,45-0,58	0,22-0,79	0	0	0,01-0,03
<i>S. aureus</i> , AA	0,08-0,55	0,10-0,62	0,01-0,42	0,02-0,27	0,03-0,14
<i>S. aureus</i> , Av	0,03-0,59	0,01-0,57	0,01-0,36	0,08-0,12	0,01-0,14
<i>C. albicans</i> οξ + 0 g/L γλυ	0,01-0,08	0	0	0	0,01-0,02
<i>C. albicans</i> οξ + 1 g/L γλυ	0,14-0,53	0,02-0,08	0,01-0,02	0	0,05-0,07
<i>C. albicans</i> οξ + 3 g/L γλυ	0,82-1,19	0,05-0,14	0,06-0,15	0	0,08-0,14
<i>C. albicans</i> οξ + 7 g/L γλυ	1,79-2,85	0,09-0,25	0,15-0,41	0	0,12-0,28
<i>C. albicans</i> οξ + 11 g/L γλυ	1,98-4,72	0,10-0,34	0,17-0,56	0	0,14-0,41
<i>C. albicans</i> ουδ + 0 g/L γλυ	0,01-0,07	0	0	0	0,01-0,02
<i>C. albicans</i> ουδ + 1 g/L γλυ	0,26-0,52	0,02-0,06	0,01-0,07	0	0,04-0,09
<i>C. albicans</i> ουδ + 3 g/L γλυ	0,98-1,25	0,07-0,13	0,08-0,16	0	0,09-0,15
<i>C. albicans</i> ουδ + 7 g/L γλυ	1,79-3,20	0,09-0,22	0,15-0,44	0	0,12-0,30
<i>C. albicans</i> ουδ + 11 g/L γλυ	1,99-3,78	0,16-0,27	0,14-0,44	0	0,13-0,32
<i>C. albicans</i> οξ + δεξτρ 5% w/v	1,70-3,86	0,13-0,35	0,19-0,84	0	0,15-0,56

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 71**, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν σε κάθε βακτηριακή καλλιέργεια ΜΑ ποικίλλουν. Τα επίπεδα αιθανόλης που παράγονται από την *K. pneumoniae* και τον *S. aureus* ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους, ενώ ο *E. faecalis* παρήγαγε αμελητέες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο ο *S. aureus*, μεταξύ των εξεταζόμενων μικροβίων, παρήγαγε όλες τις ανώτερες αλκοόλες. Επιπλέον, η *K. pneumoniae* δεν παρήγαγε ισοβουτανόλη και 1-βουτανόλη, ενώ ο *E. faecalis* δεν παρήγαγε 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη και 1-βουτανόλη και στις δύο επωαστικές συνθήκες.

Όσον αφορά τις καλλιέργειες του μύκητα σε ανθρώπινο ΜΑ, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης, της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης και της μεθυλο-βουτανόλης ήταν ανάλογες με τη συγκέντρωση της προστιθέμενης γλυκόζης· τα επίπεδά τους αυξάνονταν όσο αυξανόταν και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Δεν παράχθηκε 1-βουτανόλη σε καμία από τις μυκητιακές καλλιέργειες και δεν παράχθηκε 1-προπανόλη στις καλλιέργειες χωρίς προστιθέμενη γλυκόζη. Επίσης, στις καλλιέργειες του μύκητα χωρίς προστιθέμενη γλυκόζη παράχθηκαν μόνο αμελητέες συγκεντρώσεις αιθανόλης και μεθυλο-βουτανόλη.

Στον **Πίνακα 72** παρουσιάζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών (ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη) που παρήχθησαν στις μικροβιακές καλλιέργειες, σε ανθρώπινο φυσιολογικό ΜΑ.

Πίνακας 72: Εύρη συγκεντρώσεων πτητικών ενώσεων σε βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο ΜΑ στους 25°C.

Μικροβιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο Μ.Α. ± προστιθέμενη γλυκόζη	Εύρη συγκεντρώσεων πτητικών, mg/dL				
	Ακεταλδεΐδη	Ακετόνη	Οξικός αιθυλεστέρας	Μεθανόλη	2- Προπανόλη
<i>E. faecalis</i> , ΑΑ	0,07-0,87	0,12-0,18	0	0	0,02-0,06
<i>E. faecalis</i> , Αν	0,05-1,14	0,07-0,18	0	0	0,02-0,06
<i>K. pneumoniae</i> , ΑΑ	0,42-2,79	0,07-0,17	0	0	0,02-0,07
<i>K. pneumoniae</i> , Αν	0,30-2,99	0,07-0,17	0	0	0,02-0,07
<i>S. aureus</i> , ΑΑ	1,05-2,20	0,06-0,15	0	0-0,10	0,02-0,13
<i>S. aureus</i> , Αν	0,21-2,04	0,09-0,15	0	0	0,02-0,08
<i>C. albicans</i> οξ + 0 g/L γλυ	0,05-0,12	0,06-0,18	0	0	0,04-0,12
<i>C. albicans</i> οξ + 1 g/L γλυ	0,20-0,73	0,09-0,15	0	0	0,04-0,10
<i>C. albicans</i> οξ + 3 g/L γλυ	0,86-1,86	0,09-0,19	0	0	0,03-0,12
<i>C. albicans</i> οξ + 7 g/L γλυ	1,24-3,33	0,08-0,18	0-0,05	0	0,04-0,12
<i>C. albicans</i> οξ + 11 g/L γλυ	1,57-4,23	0,07-0,18	0,05-0,06	0	0,04-0,09
<i>C. albicans</i> ουδ + 0 g/L γλυ	0,05-0,14	0,05-0,16	0	0	0,05-0,12
<i>C. albicans</i> ουδ + 1 g/L γλυ	0,41-1,15	0,09-0,19	0	0-0,10	0,06-0,11
<i>C. albicans</i> ουδ + 3 g/L γλυ	1,43-1,78	0,09-0,17	0	0	0,04-0,11
<i>C. albicans</i> ουδ + 7 g/L γλυ	1,39-3,43	0,08-0,18	0,05-0,07	0	0,05-0,10
<i>C. albicans</i> ουδ + 11 g/L γλυ	1,50-3,89	0,09-0,17	0,05-0,06	0	0,03-0,11
<i>C. albicans</i> οξ + δεξτρ 5% w/v	2,75-3,81	0,07-0,18	0,05-0,06	0	0,05-0,09

Οι συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων ήταν συγκρίσιμες στις καλλιέργειες του ίδιου βακτηρίου και στις δύο συνθήκες επώασης, με την ακεταλδεΐδη να είναι η ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η *K. pneumoniae* παράγαγε την περισσότερη ακεταλδεΐδη, ακολουθούμενη από τον *S. aureus* και τον *E. faecalis*. Και τα τρία βακτήρια παράγαγαν συγκρίσιμες ποσότητες ακετόνης και 2-προπανόλης, ενώ δεν παράγαγαν καθόλου οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη. Εξάιρεση αποτέλεσε ο *S. aureus*, ο οποίος παράγαγε μικρή συγκέντρωση μεθανόλης υπό μικτές συνθήκες επώασης.

Όσον αφορά τις καλλιέργειες του μύκητα, οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης ήταν ανάλογες με τις συγκεντρώσεις της προστιθέμενης γλυκόζης, όπως ακριβώς παρατηρήσαμε και με τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης. Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης και της 2-προπανόλης ήταν συγκρίσιμες όχι μόνο στις καλλιέργειες του μύκητα, αλλά και με τις καλλιέργειες των τριών βακτηρίων. Δεν παράχθηκε μεθανόλη, παρά μόνο μικρή συγκέντρωση στις μυκητιακές καλλιέργειες σε ουδ MA με 1g/L προστιθέμενη γλυκόζη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, το γεγονός ότι παράχθηκαν μικρές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα στις καλλιέργειες του μύκητα με προσθήκη γλυκόζης υψηλής συγκέντρωσης (7 και 11 g/L), καθώς και στις καλλιέργειες με προσθήκη δεξτρόζης 5% w/v.

Στον **Πίνακα 73** παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά σύνολο επιλεγμένων δειγμάτων από τις αντίστοιχες μικροβιακές καλλιέργειες. Τα δείγματα από τις καλλιέργειες του *E. faecalis* εξαιρέθηκαν από την αξιολόγηση των μοντέλων, διότι τα επίπεδα της αιθανόλης σε αυτά ήταν μικρότερα από 0,10 g/L.

Πίνακας 73: Ο αριθμός των δειγμάτων (*n*) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (*N*) των μικροβιακών καλλιιεργειών σε ανθρώπινο φυσιολογικό ΜΑ, στους 25°C.

Μικροβιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο ΜΑ		Κ. ρ., ΑΑ	Κ. ρ., Αν	S. α., ΑΑ	S. α., Αν	C. α. οξ + 1 g/L γλν	C. α. οξ + 3 g/L γλν	C. α. οξ + 7 g/L γλν	C. α. οξ + 11 g/L γλν	C. α. ουδ + 1 g/L γλν	C. α. ουδ + 3 g/L γλν	C. α. ουδ + 7 g/L γλν	C. α. ουδ + 11 g/L γλν	C. α. οξ + δέξτρ 5% w/v
No	MM													
1	EF	0/14	0/14	0/10	1/5	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
2	KP1	0/14	0/14	0/10	1/5	0/8	4/8	6/8	6/8	2/8	5/8	6/8	3/8	7/8
3	KP2	0/14	1/14	0/10	1/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
4	KP3	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
5	KP4	0/14	2/14	0/10	1/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
6	KP5	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	2/8	5/8	1/8	2/8	3/8	6/8	0/8	7/8
7	KP6	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	1/8	4/8	1/8	2/8	3/8	5/8	0/8	6/8
8	KP7	0/14	0/14	10/10	3/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
9	KP8	0/14	0/14	0/10	2/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	5/8
10	SA1	0/14	0/14	0/10	2/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	3/8
11	SA2	0/14	2/14	0/10	0/5	0/8	1/8	4/8	0/8	0/8	0/8	5/8	0/8	6/8
12	CA1	8/14	0/14	0/10	0/5	5/8	3/8	0/8	0/8	8/8	4/8	0/8	0/8	0/8
13	CA2	5/14	0/14	0/10	0/5	5/8	6/8	2/8	0/8	4/8	8/8	0/8	0/8	7/8
14	CA3	7/14	0/14	0/10	0/5	5/8	5/8	0/8	0/8	4/8	8/8	0/8	0/8	0/8
15	CA4	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
16	CA5	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	2/8	1/8	2/8	0/8	0/8	1/8	3/8	0/8
17	CA6	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	3/8	8/8	8/8	1/8	2/8	8/8	8/8	8/8
18	CA7	0/14	0/14	0/10	0/5	0/8	3/8	1/8	3/8	3/8	1/8	3/8	1/8	0/8

Όπως παρατηρούμε στον **Πίνακα 73**, η εφαρμοσιμότητα των μοντέλων ποικίλλει μεταξύ των δειγμάτων από διαφορετικές καλλιέργειες ανθρώπινου ΜΑ. Γενικά, τα μοντέλα των βακτηρίων εφαρμόστηκαν καλύτερα από τα αντίστοιχα των μυκήτων. Συγκεκριμένα, τουλάχιστον ένα από τα ΚΡ μοντέλα εφαρμόστηκε με επιτυχία σε δείγματα από όλες τις βακτηριακές και μυκητιακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο ΜΑ. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το

γεγονός ότι τα ΚΡ μοντέλα, και συγκεκριμένα τα ΚΡ1, ΚΡ5-8, αν και είχαν περιορισμένη εφαρμογή σε δείγματα από καλλιέργειες της *K. pneumoniae*, εντούτοις είχαν εφαρμογή σε ορισμένα μετουσιωμένα δείγματα μυκήτων (έως 88% επιτυχία), ενώ το ΚΡ7 είχε έως 100% εφαρμογή στα μετουσιωμένα δείγματα των καλλιέργειών του *S. aureus*. Το SA2 μοντέλο είχε, επίσης, ικανοποιητική εφαρμογή σε μετουσιωμένα δείγματα μυκήτων (έως και 75% των δειγμάτων), ενώ το EF μοντέλο δεν κρίθηκε ιδιαίτερα επιτυχημένο.

Τέλος, τα CA μοντέλα εφαρμόστηκαν κυρίως σε δείγματα από καλλιέργειες μυκήτων σε ανθρώπινο ΜΑ. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα CA1-3 μοντέλα (που κατασκευάστηκαν για τις ΒΗΙ καλλιέργειες) εφαρμόστηκαν με επιτυχία στα ουδέτερα και όξινα μετουσιωμένα δείγματα αίματος, με χαμηλή συγκέντρωση προστιθέμενης γλυκόζης, 1 g/L και 3 g/L, αντίστοιχα, επιτυγχάνοντας δυνατότητα εφαρμογής έως 100% (8/8) στα ουδέτερα και έως 75% (6/8) στα όξινα δείγματα, αντίστοιχα. Είχαν, επίσης, εφαρμογή σε δείγματα της *K. pneumoniae* με επιτυχία έως 57%. Από την άλλη πλευρά, το CA6 μοντέλο (που κατασκευάστηκε για τις καλλιέργειες SDB στους 25 °C) είχε έως και 100% εφαρμογή τόσο στα όξινα όσο και στα ουδέτερα δείγματα αίματος με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (συγκέντρωση προστιθέμενης γλυκόζης 7 και 11 g/L αντίστοιχα). Τέλος, το CA2 μοντέλο (από ΒΗΙ καλλιέργειες) και το CA6 μοντέλο (από SDB καλλιέργειες) όταν εφαρμόστηκαν σε όξινα δείγματα αίματος με αραιωμένο διάλυμα δεξτρόζης, πέτυχαν εφαρμοσιμότητα 88% (7/8) και 100% (8/8), αντίστοιχα.

3.5.3 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών

Η εφαρμοσιμότητα των μικροβιακών μοντέλων, που περιγράφονται από τις εξισώσεις 1-18 (Πίνακας 67) ελέγχθηκε σε βιολογικά υλικά από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών. Συνοπτικά, τα υλικά αυτά περιλαμβάναν 128 δείγματα αίματος, τέσσερα δείγματα υαλοειδούς υγρού (YY) του οφθαλμού, τέσσερα δείγματα ούρων, δύο δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), ένα δείγμα γαστρικού περιεχομένου κι ένα δείγμα ήπατος. Τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 0,10 g/L χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των μοντέλων. Η θεωρητικά παραγόμενη μικροβιακή αιθανόλη υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα μοντέλα και η τιμή που λήφθηκε συγκρίθηκε με την αντίστοιχη πειραματική συγκέντρωση αιθανόλης. Για να θεωρηθεί επιτυχής η εφαρμογή κάθε μοντέλου κατά τη σύγκριση της υπολογιζόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης με τη

πειραματική τιμή της, τέθηκε ως κριτήριο το τυπικό σφάλμα (E%) να είναι μικρότερο από $\pm 40\%$.

3.5.3.1 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών

Η δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων ελέγχθηκε σε 128 δείγματα μεταθανάτιου αίματος από αντίστοιχα περιστατικά νεκροψιών. Το χρονικό διάστημα από την ανεύρεση έως τη νεκροψία-νεκροτομή κυμαινόταν από 18-24 h για τις περισσότερες περιπτώσεις αιφνίδιων/φυσικών ή βίαιων θανάτων, ενώ ήταν άγνωστο για τις περιπτώσεις απροσδιόριστου τρόπου θανάτου. Από τα δείγματα αυτά, τα 122 επιλέχθηκαν από την αναδρομική ανασκόπηση των χρωματογραφημάτων του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και έξι δείγματα από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Κριτήριο της επιλογής μας αποτέλεσε η συγκέντρωση της αιθανόλης να είναι μεγαλύτερη από 0,10 g/L, με ταυτόχρονη παρουσία τουλάχιστον μίας από τις ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλοβουτανόλη).

Από τα 128 περιστατικά, σε όλα προσδιορίστηκε αιθανόλη, 1-προπανόλη σε 125, ισοβουτανόλη σε 71, 1-βουτανόλη σε 69, μεθυλο-βουτανόλη σε 44, ακεταλδεΰδη σε 109, ακετόνη σε 110, οξικός αιθυλεστέρας σε 34, μεθανόλη σε 54 και 2-προπανόλη σε 99 περιστατικά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα αντίστοιχα LOD.

Στον **Πίνακα 74** απεικονίζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα περιστατικά των νεκροτομών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης στα αντίστοιχα περιστατικά.

Πίνακας 74: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).

Πτητικά (Δείγματα, v/N)	Συγκεντρώσεις EtOH, Εύρη συγκεντρώσεων,	
	g/L (v/N)	mg/dL
1-Προπανόλη (125/128)	<0,25 (30/32)	0,11-8,56
	0,25-0,50 (28/28)	0,30-11,71
	0,50-0,75 (30/30)	0,47-12,97

	0,75-1,0 (10/11)	0,72-13,62
	>1,0 (27/27)	0,10-13,22
Ισοβουτανόλη (71/128)	<0,25 (12/32)	0,01-1,12
	0,25-0,50 (17/28)	0,01-1,24
	0,50-0,75 (21/30)	0,01-1,85
	0,75-1,0 (6/11)	0,01-1,17
	>1,0 (15/27)	0,01-0,14
1-Βουτανόλη (69/128)	<0,25 (18/32)	0,02-12,32
	0,25-0,50 (16/28)	0,03-23,14
	0,50-0,75 (14/30)	0,01-6,82
	0,75-1,0 (7/11)	0,02-5,05
	>1,0 (14/27)	0,01-4,15
Μεθυλο-βουτανόλη (44/128)	<0,25 (8/32)	0,01-0,31
	0,25-0,50 (10/28)	0,01-0,27
	0,50-0,75 (10/30)	0,01-0,48
	0,75-1,0 (5/11)	0,01-0,28
	>1,0 (11/27)	0,01-0,24
Ακεταλδεΐδη (109/128)	<0,25 (27/32)	0,06-4,16
	0,25-0,50 (23/28)	0,08-5,98
	0,50-0,75 (26/30)	0,03-7,85
	0,75-1,0 (8/11)	0,14-7,93
	>1,0 (25/27)	0,24-15,61
Ακετόνη (110/128)	<0,25 (29/32)	0,05-9,68
	0,25-0,50 (23/28)	0,03-19,91
	0,50-0,75 (25/30)	0,05-10,18
	0,75-1,0 (8/11)	0,27-2,00
	>1,0 (25/27)	0,07-10,17
Οξικός αιθυλεστέρας (34/128)	<0,25 (6/32)	0,02-0,26
	0,25-0,50 (8/28)	0,02-0,55
	0,50-0,75 (5/30)	0,03-0,41
	0,75-1,0 (3/11)	0,11-1,31
	>1,0 (12/27)	0,02-0,57
Μεθανόλη (54/128)	<0,25 (14/32)	0,11-3,16
	0,25-0,50 (10/28)	0,10-6,84
	0,50-0,75 (8/30)	0,54-6,77

	0,75-1,0 (3/11)	0,43-0,66
	>1,0 (19/27)	0,22-5,17
2-Προπανόλη (99/128)	<0,25 (27/32)	0,02-3,05
	0,25-0,50 (20/28)	0,03-25,38
	0,50-0,75 (22/30)	0,04-4,44
	0,75-1,0 (8/11)	0,05-3,99
	>1,0 (22/27)	0,05-1,83

Το εύρος των συγκεντρώσεων της αιθανόλης στα δείγματα αίματος ήταν 0,10-11,69 g/L. Από τις πτητικές ενώσεις, εκείνες που παράχθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 74**, ήταν η 1-προπανόλη, η 1-βουτανόλη, η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη και η 2-προπανόλη. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνονται τα επίπεδα της αιθανόλης, τόσο αυξάνονται και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης. Η ίδια τάση παρατηρείται και στην ακεταλδεΐδη. Η 1-βουτανόλη παράχθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις όταν τα επίπεδα αιθανόλης κυμαίνονταν μέχρι 0,50 g/L και ήταν πολύ χαμηλότερες σε συγκεντρώσεις αιθανόλης >0,50 g/L. Η ακετόνη παράχθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις σχεδόν για όλα τα εύρη των συγκεντρώσεων αιθανόλης. Εξαιρέση αποτελεί το εύρος 0,75-1,0 g/L αιθανόλης στο οποίο η ακετόνη ήταν πολύ μειωμένη. Η ίδια τάση παρατηρείται και στη μεθανόλη, ωστόσο τα επίπεδά της συγκριτικά με την ακετόνη ήταν αρκετά μικρότερα. Επιπλέον, η 2-προπανόλη παράχθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα για το εύρος αιθανόλης 0,25-0,50 g/L, ενώ στα υπόλοιπα εύρη οι συγκεντρώσεις της είχαν μειωθεί πολύ. Η ισοβουτανόλη παράχθηκε σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις για επίπεδα αιθανόλης έως 1,0 g/L. Σε συγκεντρώσεις αιθανόλης >1,0 g/L, οι συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης ήταν αρκετά μικρότερες. Ο οξικός αιθυλεστέρας παράχθηκε σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις σχεδόν για όλα τα εύρη συγκεντρώσεων της αιθανόλης, με εξαίρεση το εύρος 0,75-1,0 g/L όπου τα επίπεδά του ήταν αυξημένα. Τέλος, η μεθυλο-βουτανόλη παράχθηκε στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις από όλες τις πτητικές ενώσεις που μελετήθηκαν.

Στον **Πίνακα 75** απεικονίζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα περιστατικά των νεκροτομών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τον τρόπο θανάτου, φυσικός (Φ), βίαιος (Β), απροσδιόριστος (Α), των αντίστοιχων περιστατικών.

Πίνακας 75: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τον τρόπο θανάτου σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).

Πτητικά (Δείγματα, v/N)	Τρόπος θανάτου (v/N)	Εύρη συγκεντρώσεων, mg/dL
Αιθανόλη (128/128), g/L	Φ (35/35)	0,11-11,69
	B (36/36)	0,10-4,85
	A (57/57)	0,11-3,72
1-Προπανόλη (125/128)	Φ (35/35)	0,11-12,97
	B (34/36)	0,10-13,62
	A (56/57)	0,13-12,74
Ισοβουτανόλη (71/128)	Φ (15/35)	0,01-0,39
	B (18/36)	0,01-1,04
	A (38/57)	0,01-1,85
1-Βουτανόλη (69/128)	Φ (19/35)	0,01-1,26
	B (20/36)	0,01-6,82
	A (30/57)	0,01-23,14
Μεθυλο-βουτανόλη (44/128)	Φ (11/35)	0,01-0,31
	B (11/36)	0,01-0,06
	A (22/57)	0,01-0,48
Ακεταλδεΐδη (109/128)	Φ (31/35)	0,14-15,61
	B (33/36)	0,03-7,93
	A (45/57)	0,06-5,80
Ακετόνη (110/128)	Φ (32/35)	0,05-12,26
	B (32/36)	0,05-2,00
	A (46/57)	0,03-19,91
Οξικός αιθυλεστέρας (34/128)	Φ (11/35)	0,02-0,41
	B (10/36)	0,03-1,31
	A (13/57)	0,05-0,57
Μεθανόλη (54/128)	Φ (15/35)	0,11-6,77
	B (20/36)	0,11-5,17
	A (19/57)	0,10-6,84
2-Προπανόλη (99/128)	Φ (30/35)	0,02-3,05
	B (28/36)	0,02-1,16
	A (41/57)	0,02-25,38

Σε σύνολο 128 περιστατικών, τα 35 (27%) οφείλονταν σε φυσικό/αιφνίδιο θάνατο, τα 36 (28%) σε βίαιους θανάτους και τα υπόλοιπα 57 (45%) περιστατικά σε θανάτους

απροσδιόριστης αιτίας. Παρατηρούμε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης, όπως και του μεταβολίτη της, της ακεταλδεΐδης, παράχθηκαν σε φυσικούς θανάτους. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της 1-προπανόλης και της μεθανόλης ήταν συγκρίσιμες και στους τρεις τρόπους θανάτου. Τα υψηλότερα επίπεδα της ισοβουτανόλης παρατηρήθηκαν σε περιστατικά βίαιων και απροσδιόριστων θανάτων, σε συγκρίσιμες ποσότητες. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της 1-βουτανόλης και της 2-προπανόλης παράχθηκαν σε περιστατικά απροσδιόριστων θανάτων. Επιπλέον, σε περιστατικά φυσικών και απροσδιόριστων θανάτων προσδιορίστηκαν οι μέγιστες συγκεντρώσεις μεθυλο-βουτανόλης και ακετόνης. Τέλος, η μέγιστη συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα παράχθηκε σε περιστατικά βίαιων θανάτων.

Στον **Πίνακα 76** απεικονίζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα περιστατικά των νεκροτομών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την παρουσία σημείων σήψης, χωρίς σήψη (Χ.Σ.), αρχόμενη σήψη (Α.Σ.), προηγμένη σήψη (Π.Σ.) στα αντίστοιχα περιστατικά.

Πίνακας 76: Εύρη των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την παρουσία σημείων σήψης σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών (N).

Πτητικά (Δείγματα, v/N)	Σημεία σήψης (v/N)	Εύρη συγκεντρώσεων, mg/dL
Αιθανόλη (128/128), g/L	X.Σ. (28/28)	0,11-4,85
	A.Σ. (13/13)	0,10-11,69
	Π.Σ. (87/87)	0,11-4,55
1-Προπανόλη (125/128)	X.Σ. (27/28)	0,10-13,62
	A.Σ. (13/13)	0,11-6,28
	Π.Σ. (85/87)	0,13-13,22
Ισοβουτανόλη (71/128)	X.Σ. (7/28)	0,01-0,08
	A.Σ. (6/13)	0,01-1,12
	Π.Σ. (58/87)	0,01-1,85
1-Βουτανόλη (69/128)	X.Σ. (16/28)	0,01-6,82
	A.Σ. (4/13)	0,04-0,09
	Π.Σ. (49/87)	0,01-23,14
Μεθυλο-βουτανόλη (44/128)	X.Σ. (9/28)	0,01-0,31
	A.Σ. (3/13)	0,01-0,11
	Π.Σ. (32/87)	0,01-0,48
Ακεταλδεΐδη (109/128)	X.Σ. (27/28)	0,08-7,85
	A.Σ. (9/13)	0,20-7,93
	Π.Σ. (73/87)	0,03-15,61
Ακετόνη (110/128)	X.Σ. (27/28)	0,05-10,17
	A.Σ. (10/13)	0,12-9,68
	Π.Σ. (73/87)	0,03-19,91
Οξικός αιθυλεστέρας (34/128)	X.Σ. (13/28)	0,02-1,31
	A.Σ. (3/13)	0,10-0,38
	Π.Σ. (18/87)	0,02-1,16
Μεθανόλη (54/128)	X.Σ. (19/28)	0,11-5,17
	A.Σ. (6/13)	0,46-6,77
	Π.Σ. (29/87)	0,10-6,84
2-Προπανόλη (99/128)	X.Σ. (25/28)	0,02-3,05
	A.Σ. (9/13)	0,08-1,16
	Π.Σ. (65/87)	0,02-25,38

Στο σύνολο των 128 περιστατικών, τα 28 (22%) δεν παρουσίασαν σημεία σήψης, τα 13 (10%) βρίσκονταν σε αρχόμενη σήψη και τα 87 (68%) περιστατικά βρίσκονταν σε

προηγμένη σήψη. Από τον **Πίνακα 76**, παρατηρούμε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων που μελετήθηκαν παράχθηκαν σε νεκροτομικά περιστατικά παρουσία σήψης, αρχόμενης ή προηγμένης. Ωστόσο, οι ενώσεις 1-προπανόλη, μεθυλο-βουτανόλη και οξικός αιθυλεστέρας παρήχθησαν σε εξίσου υψηλές συγκεντρώσεις και σε περιστατικά χωρίς σημεία σήψης.

Γενικά, τα μοντέλα της *K. pneumoniae* είχαν την καλύτερη εφαρμογή από όλα τα μικροβιακά μοντέλα, καθώς ήταν πετυχημένα στο 42% των περιστατικών (54/128) (**Πίνακας 77**). Από τα μοντέλα αυτά, το πιο πετυχημένο ήταν το KP8 καθώς εφαρμόστηκε σε 35/128 (27%) περιστατικά. Το μοντέλο του *E. faecalis* εφαρμόστηκε επιτυχώς σε 32/128 (25%) περιστατικά και εκείνα του *S. aureus* σε 19/128 (15%) περιστατικά. Τέλος, τα μοντέλα της *C. albicans* ήταν τα λιγότερο πετυχημένα, καθώς εφαρμόστηκαν μόνο σε 13/128 (10%) περιστατικά.

Πίνακας 77: Ο αριθμός των δειγμάτων (ν) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξιιώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό πραγματικών περιστατικών νεκροτομών (N). (AA: αερόβια/αναερόβια, Av: αναερόβια επώαση).

Μικροβιακή καλλιέργεια, συνθήκες επώασης	MM	Συνολικά περιστατικά, N=128		
		ν ανά μοντέλο	ν ανά καλλιέργεια	ν ανά μικρόβιο
<i>E. f.</i> , BHI, AA	EF	32	32	32
<i>K. p.</i> , BHI, AA	KP1	21	34	54
	KP2	21		
<i>K. p.</i> , BHI, Av	KP3	23	34	
	KP4	19		
<i>K. p.</i> , γλυ 5 g/L, AA	KP5	25	25	
<i>K. p.</i> , γλυ 5 g/L, Av	KP6	25	25	
<i>K. p.</i> , γλυ 10 g/L, AA	KP7	31	31	
<i>K. p.</i> , γλυ 10 g/L, Av	KP8	35	35	
<i>S. a.</i> , BHI, AA	SA1	15	15	19
<i>S. a.</i> , BHI, Av	SA2	11	11	
<i>C. a.</i> , BHI, AA	CA1	3	3	13
	CA2	1		
	CA3	2		
<i>C. a.</i> , SDB, AA	CA4	10	10	
	CA5	7		
<i>C. a.</i> , SDB, Av	CA6	8	8	
	CA7	8		

Από το σύνολο των περιστατικών ξεχώρισαν 24 (έξι φυσικοί/αιφνίδιοι, έξι βίαιοι και 12 θάνατοι απροσδιόριστης αιτίας) από τα συνολικά 128 που παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα περιστατικά αυτά εφαρμόστηκαν επιτυχώς τα περισσότερα βακτηριακά μοντέλα (6/11). Τα 20 από τα 24 δείγματα αίματος προέρχονταν από περιστατικά με πρώιμα ή προηγμένα σημεία σήψης. Τα επίπεδα αιθανόλης σε αυτά τα περιστατικά κυμαίνονταν από 0,11 έως 2,94 g/L.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τουλάχιστον ένα βακτηριακό μοντέλο και από τα τρία διαφορετικά είδη βακτηρίων εφαρμόστηκε με επιτυχία σε οκτώ από τα προαναφερθέντα 24 περιστατικά. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης σε αυτά τα περιστατικά κυμάνθηκαν από 0,11 έως 1,92 g/L και επτά από αυτά εμφάνισαν πρώιμα ή προχωρημένα σημεία σήψης.

Στον **Πίνακα 78** παρουσιάζεται ο αριθμός των επιτυχημένων εφαρμογών των μικροβιακών μοντέλων σε μεταθανάτια δείγματα αίματος κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την προσδιοριζόμενη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα.

Πίνακας 78: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (ν/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων νεκροτομικών περιστατικών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα.

No	MM	Αιθανόλη, g/L (N)				
		< 0,25 (32)	0,25 - 0,50 (28)	0,50 - 0,75 (30)	0,75 - 1,0 (11)	> 1,0 (27)
1	EF	9/28	6/21	10/33	1/9	6/22
2	KP1	2/6	5/18	8/27	1/9	5/19
3	KP2	6/19	1/4	6/20	2/18	6/22
4	KP3	5/16	3/11	7/23	2/18	6/22
5	KP4	6/19	1/4	5/17	0/0	7/26
6	KP5	4/13	4/14	8/27	2/18	7/26
7	KP6	4/13	4/14	8/27	2/18	7/26
8	KP7	7/22	5/18	9/30	3/27	7/26
9	KP8	8/25	5/18	12/40	3/27	7/26
10	SA1	3/9	2/7	5/17	0/0	5/19
11	SA2	2/6	0/0	3/10	0/0	6/22
12	CA1	0/0	0/0	0/0	1/9	2/7
13	CA2	0/0	0/0	0/0	0/0	1/4
14	CA3	0/0	0/0	0/0	1/9	1/4
15	CA4	0/0	0/0	0/0	0/0	10/37
16	CA5	0/0	0/0	0/0	0/0	7/26
17	CA6	0/0	0/0	0/0	0/0	8/30
18	CA7	0/0	0/0	0/0	0/0	8/30

Παρατηρούμε ότι τα βακτηριακά μοντέλα εφαρμόστηκαν με επιτυχία σε περιστατικά νεκροτομών από όλες τις κατηγορίες συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα. Τα KP μοντέλα ήταν τα πιο επιτυχημένα από όλα τα βακτηριακά μοντέλα, κυρίως σε περιστατικά όπου η συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα ήταν μεγαλύτερη από 0,50 g/L (έως 40% επιτυχία το KP8 μοντέλο). Το EF ήταν πιο πετυχημένο σε περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης που κυμαινόταν από 0,50 g/L έως 0,75 g/L (33% επιτυχία). Επιπλέον, τα SA μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη

από 1 g/L (έως 22% επιτυχία το SA2 μοντέλο). Από την άλλη πλευρά τα CA μοντέλα ήταν πιο επιτυχημένα σε περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 1 g/L (έως 37% επιτυχία το CA4 μοντέλο).

Στον **Πίνακα 79** παρουσιάζεται ο αριθμός των επιτυχημένων εφαρμογών των μικροβιακών μοντέλων σε μεταθανάτια δείγματα αίματος κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τον τρόπο θανάτου.

Πίνακας 79: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (ν/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξιιώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων περιστατικών νεκροτομών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με τον τρόπο θανάτου.

No	MM	Τρόπος θανάτου (N)		
		Φ (35)	B (36)	A (57)
1	EF	10/29	6/17	16/28
2	KP1	5/14	4/11	12/21
3	KP2	6/17	7/19	8/14
4	KP3	8/23	4/11	11/19
5	KP4	5/14	6/17	8/14
6	KP5	6/17	4/11	15/26
7	KP6	6/17	4/11	15/26
8	KP7	8/23	5/14	18/32
9	KP8	9/26	6/17	20/35
10	SA1	5/14	3/8	7/12
11	SA2	3/9	3/8	5/9
12	CA1	0/0	2/6	1/2
13	CA2	0/0	1/3	0/0
14	CA3	0/0	2/6	0/0
15	CA4	4/11	6/17	0/0
16	CA5	4/11	3/8	0/0
17	CA6	3/9	5/14	0/0
18	CA7	3/9	5/14	0/0

Παρατηρούμε ότι τα βακτηριακά μοντέλα ήταν πιο πετυχημένα από τα αντίστοιχα του μύκητα. Τα KP μοντέλα ήταν τα πιο πετυχημένα από τα βακτηριακά μοντέλα (έως 35% επιτυχία το KP8 μοντέλο). Τα KP1 και KP5-8 μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά απροσδιόριστου τρόπου θανάτου. Τα EF, KP3 και SA1 ήταν πιο πετυχημένα

σε περιστατικά φυσικών θανάτων (έως 29% επιτυχία το EF μοντέλο). Τα μοντέλα KP2 και KP4 είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά βίαιων θανάτων (έως 19% το KP2 μοντέλο). Επιπλέον, το μοντέλο SA2 ήταν πιο πετυχημένο τόσο σε περιστατικά φυσικών όσο και σε απροσδιόριστης αιτίας θανάτους (9% επιτυχία). Τα μοντέλα του μύκητα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά φυσικών ή βίαιων θανάτων (έως 17% επιτυχία το CA4 μοντέλο).

Στον **Πίνακα 80** παρουσιάζεται ο αριθμός των επιτυχημένων εφαρμογών των μικροβιακών μοντέλων σε μεταθανάτια δείγματα αίματος κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την παρουσία σημείων σήψης στο πτώμα.

Πίνακας 80: Ο αριθμός των δειγμάτων ανά ποσοστό επί τοις εκατό (v/%) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) σε δείγματα μεταθανάτιου αίματος αντίστοιχων περιστατικών νεκροτομών (N) κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με την κατάσταση σήψης του πτώματος.

No	MM	Σημεία σήψης (N)		
		Χ.Σ. (28)	Α.Σ. (13)	Π.Χ. (87)
1	EF	3/11	4/31	25/29
2	KP1	3/11	3/23	15/17
3	KP2	8/29	2/15	11/13
4	KP3	4/14	3/23	16/18
5	KP4	7/25	2/15	10/11
6	KP5	1/4	4/31	20/23
7	KP6	1/4	4/31	20/23
8	KP7	1/4	4/31	26/30
9	KP8	2/7	4/31	29/33
10	SA1	3/11	2/15	10/11
11	SA2	4/14	1/8	6/7
12	CA1	0/0	0/0	3/3
13	CA2	0/0	0/0	1/1
14	CA3	0/0	0/0	2/2
15	CA4	6/21	4/31	0/0
16	CA5	4/14	3/23	0/0
17	CA6	5/18	3/23	0/0
18	CA7	5/18	3/23	0/0

Συνολικά, τα βακτηριακά μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή από τα μυκητιακά. Τα μοντέλα EF, KP1, KP3, KP5-8 και SA1 ήταν πιο πετυχημένα σε περιστατικά με σημεία

σήψης, αρχόμενη ή προχωρημένη (έως 33% επιτυχία το KP8 μοντέλο). Τα μοντέλα KP2, KP4 και SA2 είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά χωρίς παρουσία σήψης (έως 29% επιτυχία το KP2 μοντέλο). Τέλος, τα CA μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά με πρώιμα σημεία σήψης (έως 31% επιτυχία το CA4 μοντέλο).

3.5.3.2 Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε διάφορα βιολογικά υλικά από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών

Εκτός από τα δείγματα αίματος, η δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων ελέγχθηκε και σε άλλα βιολογικά υλικά από αντίστοιχα περιστατικά νεκροτομών, τα οποία περιλαμβάναν τέσσερα δείγματα υαλοειδούς υγρού (YY) του οφθαλμού, τέσσερα δείγματα ούρων, δύο δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), ένα δείγμα γαστρικού περιεχομένου κι ένα δείγμα ήπατος. Από τα 12 αυτά δείγματα, πέντε επιλέχθηκαν από την αναδρομική ανασκόπηση των χρωματογραφημάτων του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επτά δείγματα από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Κριτήριο της επιλογής μας αποτέλεσε η συγκέντρωση της αιθανόλης να είναι μεγαλύτερη από 0,1 g/L, με ταυτόχρονη παρουσία τουλάχιστον μίας από τις ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη).

Αξίζει να αναφερθεί ότι από τα 12 βιολογικά υλικά, τα τέσσερα (ένα δείγμα YY, ένα δείγμα ούρων και δύο δείγματα ENY) προέρχονταν από περιστατικά φυσικών θανάτων, ενώ τα υπόλοιπα οκτώ από περιστατικά βίαιων θανάτων. Επίσης, τέσσερα βιολογικά υλικά (δύο δείγματα ούρων, ένα δείγμα γαστρικού περιεχομένου κι ένα δείγμα ήπατος) προέρχονταν από περιστατικά χωρίς σημεία σήψης, τέσσερα (δύο δείγματα YY, ένα δείγμα ούρων κι ένα δείγμα ENY) από περιστατικά σε αρχόμενη σήψη και τα υπόλοιπα τέσσερα (δύο δείγματα YY, ένα δείγμα ούρων κι ένα δείγμα ENY) προέρχονταν από περιστατικά σε προηγμένη σήψη.

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης παράχθηκαν σε δείγματα ούρων και ENY, ενώ στο γαστρικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης (**Πίνακας 81**). Η μέγιστη συγκέντρωση 1-προπανόλης προσδιορίστηκε σε δείγμα YY και η μέγιστη συγκέντρωση 1-βουτανόλης σε δείγμα ENY. Μικρές συγκεντρώσεις μεθυλο-βουτανόλης παράχθηκαν σε δείγματα YY, ούρων και ENY. Επίσης, δεν παράχθηκε

ισοβουτανόλη σε κανένα βιολογικό υλικό, πάρα μόνο σε ένα δείγμα ούρων. Τέλος, τα δείγματα γαστρικού περιεχομένου και ήπατος δεν παρήγαγαν 1-βουτανόλη και μεθυλοβουτανόλη.

Πίνακας 81: Εύρη συγκεντρώσεων των αλκοολών σε βιολογικά υλικά.

Είδος βιολογικού υλικού	Αιθανόλη, g/L	Εύρη συγκεντρώσεων αλκοολών, mg/dL			
		1- Προπανόλη	Ισοβουτανόλη	1- Βουτανόλη	Μεθυλοβουτανόλη
Υαλοειδές υγρό (ΥΥ)	0,17-2,44	0,11-6,63	0	0,10-0,60	0,02-0,06
Ούρα	0,11-3,16	0,10-0,83	0-0,01	0,08-0,28	0-0,05
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)	0,18-3,71	0,01-0,14	0	0-9,79	0-0,01
Γαστρικό περιεχόμενο	0,10	0,24	0	0	0
Ήπαρ	0,22	0,15	0	0	0

Στον **Πίνακα 82**, παρατηρούμε ότι η μέγιστη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης προσδιορίστηκε σε δείγμα ΥΥ. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις ακετόνης, μεθανόλης και 2-προπανόλης παράχθηκαν σε δείγματα ούρων. Επιπλέον, δεν παράχθηκε σε κανένα βιολογικό υλικό οξικός αιθυλεστέρας, παρά μόνο σε ένα δείγμα ΥΥ.

Πίνακας 82: Εύρη συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών σε βιολογικά υλικά.

Είδος βιολογικού υλικού	Εύρη συγκεντρώσεων πτητικών, mg/dL				
	Ακεταλδεΐδη	Ακετόνη	Οξικός αιθυλεστέρας	Μεθανόλη	2- Προπανόλη
Υαλοειδές υγρό (ΥΥ)	0,25-1,31	0,06-0,20	0-0,14	0,58-0,77	0,02-0,20
Ούρα	0,03-0,58	0,37-2,54	0	1,03-1,24	0,07-0,66
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)	0,73-0,92	0,04-0,10	0	0,12-0,44	0,13-0,34
Γαστρικό περιεχόμενο	0,07	0,08	0	0	0,18
Ήπαρ	0,08	0,11	0	0	0

Στον **Πίνακα 83** παρουσιάζεται ο αριθμός των δειγμάτων που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων των βιολογικών υλικών.

Πίνακας 83: Ο αριθμός των δειγμάτων (*n*) που εφαρμόστηκε επιτυχώς κάθε μοντέλο (Εξισώσεις 1-18) ανά συνολικό αριθμό δειγμάτων (*N*) των βιολογικών υλικών.

Μικροβιακές καλλιέργειες		ΥΥ	Ούρα	ΕΝΥ	Γαστρικό περιεχόμενο	Ήπαρ
No	MM					
1	EF	1/4	1/4	0/2	1/1	0/1
2	KP1	1/4	0/4	0/2	0/1	0/1
3	KP2	0/4	0/4	0/2	1/1	0/1
4	KP3	1/4	0/4	0/2	1/1	0/1
5	KP4	0/4	0/4	0/2	0/1	1/1
6	KP5	0/4	0/4	0/2	1/1	0/1
7	KP6	0/4	0/4	0/2	1/1	0/1
8	KP7	0/4	0/4	0/2	0/1	0/1
9	KP8	0/4	0/4	0/2	0/1	0/1
10	SA1	0/4	1/4	0/2	1/1	0/1
11	SA2	0/4	0/4	0/2	1/1	0/1
12	CA1	0/4	0/4	0/2	0/1	0/1
13	CA2	0/4	0/4	0/2	0/1	0/1
14	CA3	0/4	0/4	0/2	0/1	0/1
15	CA4	2/4	2/4	0/2	0/1	0/1
16	CA5	2/4	2/4	0/2	0/1	0/1
17	CA6	2/4	2/4	1/2	0/1	0/1
18	CA7	2/4	2/4	1/2	0/1	0/1

Παρατηρείται ότι τα βακτηριακά μοντέλα (EF, KP2-3, KP5-6 και SA1-2) έχουν καλύτερη εφαρμογή στο δείγμα γαστρικού περιεχομένου, ενώ τα μοντέλα του μύκητα, συγκεκριμένα τα CA4-7, είναι πιο πετυχημένα στα δείγματα ΥΥ, ούρων και ΕΝΥ. Τέλος, στο δείγμα ήπατος εφαρμόζει επιτυχώς το KP4 μοντέλο.

Ωστόσο, επειδή ο αριθμός των δειγμάτων κάθε βιολογικού υλικού είναι πολύ μικρός, δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής των μικροβιακών μοντέλων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο αίμα αποτελεί την πιο συχνή ανάλυση που διενεργείται στα διαπιστευμένα εργαστήρια Δικαστικής Τοξικολογίας, ως μέρος της διαδικασίας διερεύνησης θανάτου, ατυχήματος ή εγκλήματος. Ιδιαίτερα, σε μεταθανάτιες περιπτώσεις, η ανάλυση της αιθανόλης αποτελεί μέρος της έρευνας του θανάτου, καθώς μπορεί να είναι αιτιολογικός παράγοντας. Η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση αιθανόλης μετά τον θάνατο πρέπει να ερμηνεύεται με ακρίβεια, όσον αφορά την προέλευσή της, εξωγενή ή ενδογενή, ή εάν έχει υπερβεί ένα νόμιμο όριο (Wigmore, 2011).

Η προέλευση της αιθανόλης που ανιχνεύτηκε μεταθανάτια θα μπορούσε να είναι είτε η προθανάτια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών είτε η προθανάτια ενδογενής παραγωγή λόγω μικροβιακής ζύμωσης στο έντερο είτε η μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή κατά τη σήψη ή μετά τη δειγματοληψία (Kugelberg & Jones, 2007; Ziavrou et al., 2005). Ωστόσο, η παραγωγή αιθανόλης από μικρόβια, καθώς και η πηγή και η ακεραιότητα των επιλεγμένων δειγμάτων, είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας που θα μπορούσε να περιπλέξει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Ziavrou et al., 2005).

Παράγοντες, όπως η κατάσταση αποσύνθεσης του πτώματος κατά τη νεκροψία, το κλινικό ιστορικό του νεκρού, ο προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης, ο εντοπισμός μικροβίων στο αναλύμενο δείγμα και η αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ της συγκέντρωσης αιθανόλης από διάφορα σημεία δειγματοληψίας και από διαφορετικά δείγματα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της προέλευσης της προσδιοριζόμενης αιθανόλης, στην προσπάθεια να επιτευχθεί εφικτή ακρίβεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης αιθανόλης μετά το θάνατο (Kugelberg & Jones, 2007; Lin et al., 2020; Ziavrou et al., 2005).

Η ανίχνευση ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη και 2-μεθυλο-1-βουτανόλη) σε μεταθανάτια δείγματα ταυτόχρονα με την αιθανόλη έχει συσχετιστεί με τη σήψη και τη μικροβιακή δραστηριότητα (Ziavrou et al., 2005). Παράλληλα, μία ποσοτική σχέση μεταξύ της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών έχει περιγραφεί για τον υπολογισμό της μικροβιακής αιθανόλης με την κατασκευή μαθηματικών μοντέλων (Boumba et al., 2012a, 2013). Η προσέγγιση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη

δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά και για την εκτίμηση της αιθανόλης μεταθανάτια.

Προσδιορισμός αιθανόλης, ανώτερων αλκοολών και άλλων πτητικών ουσιών σε μικροβιακές καλλιέργειες

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και άλλων πτητικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν στις καλλιέργειες των βακτηρίων *K. pneumoniae*, *S. aureus* και *E. faecalis* και του μύκητα *C. albicans* υπό αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες σε διάφορες θερμοκρασίες (37°C, 25°C και 4°C), με διαφορετικά καλλιεργητικά υλικά (Brain Heart Infusion, BHI (με ή χωρίς προσθήκη επιπλέον γλυκόζης) και Sabouraud Dextrose Broth, SDB).

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αιθανόλης και των υπόλοιπων πτητικών ουσιών στις μικροβιακές καλλιέργειες ήταν η αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης με ανιχνευτή ιονισμού φλογός (HS-GC-FID). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, διαχωρίστηκαν πλήρως και προσδιορίστηκαν οι παρακάτω πτητικές ουσίες: αιθανόλη, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη, 2-προπανόλη και ακετονιτρίλιο, ως εσωτερικό πρότυπο. Οι ενώσεις 3-μεθυλο-1-βουτανόλη και 2-μεθυλο-1-βουτανόλη υπολογίστηκαν ως άθροισμα και αναφέρθηκαν ως μεθυλο-βουτανόλη για να υπάρχει συνέπεια με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες (Boumba et al., 2012a, 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύτηκαν ίδιες συγκεντρώσεις 3-μεθυλο-1-βουτανόλης και 2-μεθυλο-1-βουτανόλης. Οι παραπάνω πτητικές ουσίες επιλέχθηκαν για ανάλυση είτε επειδή έχουν αναφερθεί ως προϊόντα σήψης (Boumba, 2022; Corry, 1978; Kugelberg & Jones, 2007; Lewis et al., 2004; Moriya & Hashimoto, 2004; Ziavrou et al., 2005), είτε γιατί αποτελούν προϊόντα φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών (Boumba et al., 2008; Kalapos, 2003; Kugelberg & Jones, 2007; Lin et al., 2020; Ziavrou et al., 2005).

Η *K. pneumoniae*, ο *S. aureus*, ο *E. faecalis* και η *C. albicans* παρήγαγαν αιθανόλη, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 1-βουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη σε ποικίλες συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες με θρεπτικά υλικά BHI (με ή χωρίς προσθήκη γλυκόζης) και SDB στους 25°C και στους 37°C. Η αιθανόλη, όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν η πρώτη ποσοτικά παραγόμενη αλκοόλη, με υψηλό ρυθμό παραγωγής κατά τις πρώτες μέρες

επώασης στους 25°C, εφόσον η γλυκόζη είναι το προτιμότερο και το πιο άφθονο μικροβιακό υπόστρωμα (Boumba et al., 2008; Corry, 1978). Ανάμεσα στις μικροβιακές καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI στους 25°C, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης παράχθηκαν από την *C. albicans* υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης. Ακολούθησαν η *C. albicans* και η *K. pneumoniae* υπό μικτές και αναερόβιες συνθήκες, αντίστοιχα, η *K. pneumoniae* υπό μικτές συνθήκες επώασης, ο *S. aureus* και τέλος, ο *E. faecalis*. Επιπλέον, η *C. albicans* παράγαγε σχεδόν δεκαπλάσιες συγκεντρώσεις αιθανόλης σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό SDB και στις δύο συνθήκες επώασης. Η κύρια διαφορά των δύο θρεπτικών υλικών βρίσκεται στην ποσότητα γλυκόζης που περιέχουν· 2 g/L περιέχει το BHI και 20 g/L το SDB. Γενικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι αυστηρά αναερόβιες συνθήκες επώασης ευνόησαν ελαφρώς την παραγωγή αιθανόλης από όλα τα μικροβιακά στελέχη.

Η *C. albicans*, όπως όλοι οι μύκητες, παράγει αιθανόλη από τη διάσπαση υδατανθράκων, όπως η γλυκόζη, που είναι η προτιμώμενη πηγή άνθρακα και ενέργειας για πολλά μικρόβια. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη οδός για την αποδόμηση της γλυκόζης στους ζυμομύκητες είναι η γλυκολυτική οδός Embden-Meyerhof-Parnas (EMD) η οποία παράγει δύο μόρια πυροσταφυλικού ανά μόριο γλυκόζης πριν αναχθεί σε αιθανόλη (Boumba et al., 2008). Το άθροισμα των αντιδράσεων δημιουργεί δύο μόρια αιθανόλης από ένα μόριο γλυκόζης, που με άλλα λόγια (όταν τα μόρια μετατρέπονται σε μάζες) σημαίνει ότι η ζύμωση της γλυκόζης παράγει αιθανόλη με τη μισή μάζα της ζυμωμένης γλυκόζης. Η ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη από την *C. albicans* στις καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό SDB ήταν πλήρης (απόδοση ~100%) αφού η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης (~10 g/L) ήταν σχεδόν ίδια με τη θεωρητικά υπολογισμένη (10 g/L αιθανόλης από 20 g/L αρχική γλυκόζη). Αντιθέτως, η ζύμωση της γλυκόζης προς αιθανόλη στις καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI ήταν ατελής. Το 61% και το 88% της μέγιστης αναμενόμενης αιθανόλης (1 g/L αιθανόλης από 2 g/L αρχικής γλυκόζης) δημιουργήθηκε υπό μικτές αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική σύνθεση των καλλιεργητικών μέσων και στο γεγονός ότι το SDB προτιμάται για την ανάπτυξη μυκήτων (Sandven & Lassen, 1999).

Ενώ η αυξανόμενη συγκέντρωση γλυκόζης ευνοεί την παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων αιθανόλης στους ζυμομύκητες, δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο για τα βακτήρια. Από τα αποτελέσματα των καλλιεργειών της *K. pneumoniae* σε θρεπτικό υλικό BHI, τελικών συγκεντρώσεων γλυκόζης 2, 5 και 10 g/L, παρατηρήσαμε ότι η επιπλέον προσθήκη γλυκόζης στο καλλιεργητικό μέσο, μείωσε τα επίπεδα της αιθανόλης. Οι

συγκεντρώσεις της αιθανόλης στις καλλιέργειες με τελική συγκέντρωση γλυκόζης 5 και 10 g/L ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με εκείνα των καλλιεργειών της *C. albicans*, στις οποίες η αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο οδήγησε σε αύξηση των συγκεντρώσεων αιθανόλης. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι και ο αριθμός των αποικιών της *K. pneumoniae* ήταν αισθητά μικρότερος στις καλλιέργειες με προσθήκη επιπλέον γλυκόζης και μειωνόταν διαρκώς με το πέρασμα των ημερών. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η δημιουργία υψηλής οσμωτικής πίεσης στο καλλιεργητικό μέσο λόγω της προσθήκης γλυκόζης, η οποία είναι εύκολα διαχειρίσιμη από τους μύκητες, όχι όμως από τα βακτήρια στα οποία προκαλεί χαμηλότερη ανάπτυξη (Reischke et al., 2014).

Οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης τόσο στις καλλιέργειες των βακτηρίων όσο και του μύκητα. Η 1-προπανόλη είναι η δεύτερη σε αφθονία αλκοόλη για δύο από τα τρία βακτήρια, την *K. pneumoniae* και τον *S. aureus*, ενώ παρατηρούνται διαφορές στις συγκεντρώσεις της μεταξύ των αντίστοιχων καλλιεργειών κάθε βακτηρίου. Γενικά, οι παρατηρούμενες διαφορές στα πρότυπα παραγωγής καθεμιάς από τις ανώτερες αλκοόλες θα πρέπει να αποδοθούν στις διαφορές στη μεταβολική δράση των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών στη χρήση των διαθέσιμων υποστρωμάτων. Η μείωση των συγκεντρώσεων της 1-βουτανόλης και στις δύο συνθήκες επώασης στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* και του *S. aureus*, μετά την αρχική αύξηση, θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην εξάντληση της γλυκόζης είτε των αμινοξέων με την πάροδο του χρόνου, καθώς η ζύμωση του πυροσταφυλικού σε 1-βουτανόλη προχωρά με τον παράλληλο σχηματισμό οξικού, γαλακτικού και αιθανόλης και η ροή προς τα κάτω σε κάθε μονοπάτι ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες (όπως το pH και ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών) και την αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών ή την εξάντληση του άνθρακα και τη ροή ηλεκτρονίων (Boumba et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός παραγωγής της 1-βουτανόλης από τον *E. faecalis* ήταν σταθερός σε όλη την περίοδο επώασης και η 1-βουτανόλη ήταν η μεγαλύτερη σε ποσότητα ανώτερη αλκοόλη στις αντίστοιχες καλλιέργειες, υποδεικνύοντας ότι το βιοχημικό μονοπάτι που παράγει 1-βουτανόλη ευνοούταν από τον *E. faecalis*, υπό τις εφαρμοζόμενες πειραματικές συνθήκες.

Σε αντίθεση με τη μείωση των συγκεντρώσεων της 1-βουτανόλης στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* χωρίς προσθήκη γλυκόζης, στις καλλιέργειές της με προσθήκη επιπλέον γλυκόζης, η 1-βουτανόλη παραγόταν με σταθερό ρυθμό κατά τη διάρκεια της επώασης. Από τα αποτελέσματα αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις

γλυκόζης ευνοούν το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής 1-βουτανόλης παρά το μονοπάτι για την παραγωγή αιθανόλης.

Ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών στις καλλιέργειες της *C. albicans* πραγματοποιήθηκε μέσω των βιοσυνθετικών οδών των αμινοξέων, παράλληλα με τον μεταβολισμό της γλυκόζης και την παραγωγή αιθανόλης (Boumba et al., 2008). Η μεθυλοβουτανόλη ήταν η ανώτερη αλκοόλη που παράχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτό το χαρακτηριστικό διαφοροποιεί τις καλλιέργειες των μυκήτων από τις βακτηριακές καλλιέργειες που μελετήθηκαν μέχρι τώρα, όπου η 1-προπανόλη ήταν η κυρίαρχη αλκοόλη (Boumba et al., 2012a, 2013; Velivasi et al., 2021a, 2021b). Η 1-προπανόλη ακολούθησε το ίδιο μοτίβο με την αιθανόλη σε κάθε χωριστή μυκητιακή καλλιέργεια, όπως αναμενόταν, αφού η παραγωγή των δύο αλκοολών ακολουθεί αλληλένδετα μονοπάτια. Οι ποσότητες της 1-προπανόλης και της ισοβουτανόλης ήταν μεγαλύτερες στις καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό SDB σε σύγκριση με καλλιέργειες BHI ενώ τα επίπεδα της μεθυλοβουτανόλης ήταν συγκρίσιμα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκόζη του SDB ευνόησε τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών από άλφα-κετοξέα στις αντίστοιχες καλλιέργειες *C. albicans*. Επίσης, το βιοχημικό μονοπάτι που παράγει 1-βουτανόλη δεν φαίνεται να ευνοεί την *C. albicans*, υπό κάθε συνθήκη επώασης.

Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά στις καλλιέργειες των βακτηρίων, η ακεταλδεΐδη παράχθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες του *S. aureus* και η μεθανόλη στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* και του *E. faecalis*. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης στις καλλιέργειες των *K. pneumoniae* και *E. faecalis* πιθανόν συνδέονται με τον μεγαλύτερο ρυθμό αναγωγής της σε αιθανόλη από την αλκοολική αφυδρογονάση (Boumba et al., 2008). Επιπλέον, η μεθανόλη ήταν η μόνη πτητική ένωση με συνεχή αυξανόμενο ρυθμό παραγωγής σε κάθε βακτηριακή καλλιέργεια, υπό τις εφαρμοζόμενες πειραματικές συνθήκες. Η ακετόνη και η 2-προπανόλη παράγονταν με σταθερό ρυθμό σε κάθε ξεχωριστή καλλιέργεια, ενώ οι ποσότητες του οξικού αιθυλεστέρα ήταν αμελητέες.

Στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, όλα τα πτητικά συστατικά παράγονταν με αυξανόμενο ρυθμό, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες χωρίς επιπλέον γλυκόζη. Οι συγκεντρώσεις τους ήταν ως επί το πλείστον χαμηλότερες στις καλλιέργειες με επιπλέον γλυκόζη, όπως της αιθανόλης και των ανώτερων αλκοολών. Εξάιρεση αποτελούν ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη υπό μικτές συνθήκες επώασης, οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν συγκρίσιμες σε κάθε καλλιέργεια και η 2-προπανόλη,

τα επίπεδα της οποίας ήταν υψηλότερα, πιθανώς επειδή ευνοήθηκε ο σχηματισμός της λόγω της επιπλέον γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό (Boumba et al., 2008).

Αρκετές διαφορές εντοπίστηκαν, επίσης, στην παραγωγή των πτητικών ενώσεων από τις καλλιέργειες της *C. albicans* σε σύγκριση με τις βακτηριακές. Η ένωση που παράχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ακεταλδεΐδη. Στις καλλιέργειες σε BHI, τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης ήταν συγκρίσιμα με εκείνα της *K. pneumoniae*. Στις καλλιέργειες σε SDB, οι συγκεντρώσεις της ήταν πολύ υψηλότερες, όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης. Επιπλέον, η ακετόνη και η 2-προπανόλη κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με εκείνα στις καλλιέργειες των βακτηρίων, ενώ δεν παράχθηκε καθόλου μεθανόλη. Επίσης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε οξικός αιθυλεστέρας στις καλλιέργειες σε BHI, παράχθηκε σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στις SDB καλλιέργειες.

Όσον αφορά τις βακτηριακές καλλιέργειες στους 37°C, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αυξημένη θερμοκρασία επηρέασε διαφορετικά την παραγωγή αλκοολών σε κάθε καλλιέργεια, αν και η επιλεγμένη θερμοκρασία ήταν κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κάθε μικροβίου (Paczkowski & Schütz, 2011). Συγκεκριμένα, η αυξημένη θερμοκρασία δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή όλων των αλκοολών στις καλλιέργειες του *E. faecalis*, επηρέασε αρνητικά την παραγωγή αλκοολών στις καλλιέργειες του *S. aureus*, ενώ στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae*, ευνοήθηκε η παραγωγή της 1-βουτανόλης, επηρεάστηκε αρνητικά η παραγωγή των άλλων ανώτερων αλκοολών, ενώ δεν επηρεάστηκε η παραγωγή αιθανόλης. Προφανώς, η θερμοκρασία επηρέασε τα βιοχημικά μονοπάτια ζύμωσης που ευνοούνται από κάθε είδος. Όπως αναμενόταν, δεν παρήχθησαν αλκοόλες στους 4°C (Jones et al., 1999).

Επιπλέον, η αυξημένη θερμοκρασία είχε διαφορετική επίδραση στα υπόλοιπα πτητικά συστατικά κάθε βακτηρίου. Στις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* επηρεάστηκαν αρνητικά η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη και η μεθανόλη, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας και η 2-προπανόλη έμειναν ανεπηρέαστα. Στις καλλιέργειες του *S. aureus* επηρεάστηκαν αρνητικά η ακεταλδεΐδη και η μεθανόλη, ενώ δεν επηρεάστηκε η παραγωγή της ακετόνης, του οξικού αιθυλεστέρα και της 2-προπανόλης. Επίσης, η αυξημένη θερμοκρασία, επηρέασε θετικά την παραγωγή της ακεταλδεΐδης, αρνητικά την παραγωγή της ακετόνης, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα, της μεθανόλης και της 2-προπανόλης στις καλλιέργειες του *E. faecalis*. Στους 4°C, οι συγκεντρώσεις των πτητικών ενώσεων

διατηρήθηκαν σε σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια της επώασης (συγκρίσιμα με εκείνα που προσδιορίστηκαν την ημέρα 0 της επώασης).

Τα αποτελέσματα από τις καλλιέργειες της *C. albicans* στους 37°C έδειξαν ότι η αυξημένη θερμοκρασία επηρέασε θετικά την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών, αλλά δεν επηρέασε την παραγωγή αιθανόλης. Προφανώς, τα διακριτά βιοχημικά μονοπάτια ζύμωσης που ευνοούνται από την *C. albicans* επηρεάζονται από τη θερμοκρασία (Paczkowski & Schütz, 2011). Δεν παράχθησαν αλκοόλες στους 4°C (Jones et al., 1999).

Η αυξημένη θερμοκρασία επηρέασε αρνητικά την παραγωγή της ακεταλδεΐδης υπό αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης στις BHI καλλιέργειες, αλλά δεν επηρεάστηκε η παραγωγή της ακετόνης και της 2-προπανόλης. Η αύξηση στη θερμοκρασία είχε μεγαλύτερη επίδραση στις SDB καλλιέργειες, όπου μειώθηκαν οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και του οξικού αιθυλεστέρα, χωρίς να επηρεαστεί η παραγωγή της ακετόνης. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν παράχθηκε καθόλου 2-προπανόλη. Στους 4°C, οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης και της ακετόνης διατηρήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ δεν παράχθηκαν τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά.

Μοντελοποίηση της μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης

Τα πειραματικά αποτελέσματα από τις συγκεντρώσεις αλκοολών που παράχθησαν στις μικροβιακές καλλιέργειες αναλύθηκαν στατιστικά με γραμμική πολυπαραγοντική ανάλυση. Αυτή η διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα τη μοντελοποίηση της σχέσης μεταξύ των συγκεντρώσεων αιθανόλης, ως εξαρτημένης μεταβλητής, σε γραμμική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη και 3-μεθυλο-1-βουτανόλη), ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή εισήχθη σταδιακά για την κατασκευή του μοντέλου, εκτιμώντας τη σημασία της για το τελικό μοντέλο και την πιθανή υπάρχουσα συσχέτιση με τις άλλες μεταβλητές. Τα μοντέλα είναι μαθηματικές εξισώσεις πρώτου βαθμού για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε ένα δείγμα, ως συνάρτηση των συγκεντρώσεων των ανώτερων αλκοολών που προσδιορίζονται στο ίδιο δείγμα. Προφανώς, τα μικροβιακά μοντέλα αποτελούν ποσοτικά εργαλεία για την εκτίμηση της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε μεταθανάτια δείγματα.

Στη μοντελοποίηση της αιθανόλης από τις βακτηριακές καλλιέργειες, η 1-προπανόλη έχει αποδειχτεί η πιο σημαντική αλκοόλη, αλλά όχι η μοναδική, και τα

αντίστοιχα μοντέλα θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η 1-προπανόλη δεν ήταν μεταξύ των αλκοολών που ανιχνεύτηκαν κατά την ανάλυση αιθανόλης (Boumba, 2020; Boumba et al., 2012a, 2013, 2019; Velivasi et al., 2021a).

Η μεθυλο-βουτανόλη είναι ο δεύτερος σημαντικός δείκτης μικροβιακής αιθανόλης, μετά την 1-προπανόλη, για τις καλλιέργειες *K. pneumoniae* χωρίς προσθήκη γλυκόζης και η ισοβουτανόλη, ο δεύτερος σημαντικός δείκτης για τις καλλιέργειες της *K. pneumoniae* τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5 και 10 g/L στο καλλιεργητικό μέσο. Είναι ενδιαφέρον ότι από τη γραμμική πολυπαραμετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η μεθυλο-βουτανόλη είχε αρνητική συσχέτιση με την αιθανόλη, καθώς αποδόθηκε από τον αρνητικό συντελεστή στη συγκέντρωση της μεθυλο-βουτανόλης στα αντίστοιχα μοντέλα. Αν και μια εξήγηση για αυτήν την παρατήρηση δεν είναι προφανής, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι όταν ένα περίπλοκο βιολογικό φαινόμενο (όπως είναι η παραγωγή μικροβιακής αιθανόλης σε μια μικροβιακή καλλιέργεια) προσεγγίζεται από μια απλή μαθηματική εξίσωση, οι αρνητικά συσχετιζόμενες μεταβλητές θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως διορθωτικοί παράγοντες για την εκτίμηση της εξαρτημένης μεταβλητής.

Σε αντίθεση με τα βακτηριακά μοντέλα, η μεθυλο-βουτανόλη αποδείχτηκε η πιο σημαντική αλκοόλη στη μοντελοποίηση της παραγωγής αιθανόλης από την *C. albicans*, ακολουθούμενη από την 1-προπανόλη (Velivasi et al., 2021b). Η συσχέτιση μεταξύ ισοβουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης στις καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό BHI, από βιοχημική άποψη, είναι λογική, καθώς και οι δύο αλκοόλες παράγονται από τις ίδιες μεταβολικές οδούς (μονοπάτια Ehrlich). Η συσχέτιση μεταξύ 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης ($p > 0,9$) στις καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό SDB, λαμβάνοντας υπόψη ότι η 1-προπανόλη σχηματίζεται από μια ποικιλία πιθανών υποστρωμάτων και η ισοβουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη παράγονται από αμινοξέα, δείχνει ότι σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε γλυκόζη επιταχύνεται η ζύμωση των ελεύθερων αμινοξέων σε ανώτερες αλκοόλες. Προφανώς, το καλλιεργητικό μέσο είναι κρίσιμης σημασίας για την παραγωγή των αλκοολών μέσω των αντίστοιχων μεταβολικών οδών.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας για τη μοντελοποίηση της αιθανόλης από τα βακτήρια *K. pneumoniae*, *S. aureus*, και *E. faecalis* και τον μύκητα *C. albicans* σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα των ερευνητικών εργασιών της επιβλέπουσας για τη μοντελοποίηση της αιθανόλης από την *E. coli*, το *C. perfringens* και το *C. sporogenes* (Boumba et al., 2012a, 2013) υποδηλώνουν ότι οι τέσσερις αλκοόλες, 1-προπανόλη, 1-

βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη είναι τόσο ποιοτικοί όσο και ποσοτικοί δείκτες της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.

Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C

Παραδόξως, δεν εφαρμόστηκαν όλα τα βακτηριακά μοντέλα με επιτυχία στα δείγματα των αντίστοιχων μικροβιακών BHI καλλιιεργειών στους 37 °C. Τα μοντέλα της *K. pneumoniae* είχαν την καλύτερη εφαρμοσιμότητα από όλα: η πλειοψηφία των μοντέλων (KP1-6 και KP8) εφαρμόστηκαν με επιτυχία στα δείγματα από όλες τις μικροβιακές καλλιέργειες (έως και 100% των δειγμάτων με $E\% \leq 40\%$). Τα μοντέλα του *S. aureus* είχαν τη μεγαλύτερη επιτυχία στις καλλιέργειες του *S. aureus* και της *K. pneumoniae* (6/6 και 6/8 δείγματα, ή 100% και 75% των δειγμάτων με $E\% \leq 40\%$, αντίστοιχα), αλλά συνολικά, ήταν τα λιγότερο επιτυχημένα. Είναι ενδιαφέρον ότι το μοντέλο του *E. faecalis* (με τη μικρότερη γραμμικότητα) εφαρμόστηκε με επιτυχία στα δείγματα από τις καλλιέργειες του *E. faecalis* και του *S. aureus*, αλλά απέτυχε στα δείγματα της *K. pneumoniae*. Προφανείς παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εφαρμογή των μοντέλων σε αυτές τις περιπτώσεις θα μπορούσαν να είναι τα διαφορετικά μοτίβα και συγκεντρώσεις των αλκοολών στις καλλιέργειες στους 37°C, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στους 25°C. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η θερμοκρασία σίγουρα επηρεάζει την παραγωγή αλκοολών (Ahmad et al., 2021; Chang & Kollman, 1989).

Τα μοντέλα της *C. albicans* δεν είχαν καθόλου εφαρμοσιμότητα στα δείγματα των βακτηριακών καλλιιεργειών. Παρατηρήσαμε ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν στις BHI και SDB καλλιέργειες στους 25°C εφαρμόστηκαν με επιτυχία στις αντίστοιχες καλλιέργειες στους 37°C (10/12 και 11/12 δείγματα, ή 83% και 92% των δειγμάτων στις BHI και SDB καλλιέργειες, αντίστοιχα). Αξίζει να αναφέρουμε ότι το τυπικό σφάλμα ήταν μικρότερο από 20% στις περισσότερες καλλιέργειες.

Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C

Το ανθρώπινο μετουσιωμένο αίμα χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο του μεταθανάτιου αίματος, χωρίς μικρόβια και αιθανόλη (Velivasi et al., 2021a, b). Η διαδικασία μετουσίωσης έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των δευτερογενών και τριτοταγών δομών των κυτταρικών δομών και των βιομορίων στο αίμα, επομένως, το μετουσιωμένο αίμα μπορεί να προσομοιάσει με το μεταθανάτιο αίμα. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και οι όξινες συνθήκες ευνοούνται για τη βέλτιστη ανάπτυξη των μυκήτων (Masaphy, 2013; Velivasi et al., 2021b), επομένως εφαρμόστηκαν μόνο για τις καλλιέργειες της *C. albicans*.

Η επικράτηση της 1-προπανόλης μεταξύ των ανώτερων αλκοολών στις βακτηριακές καλλιέργειες μετουσιωμένου αίματος θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη βιοσύνθεσή της από τη ζύμωση της γλυκόζης (Boumba et al., 2008). Το γεγονός ότι η παραγωγή ανώτερων αλκοολών δεν ευνοείται στις βακτηριακές καλλιέργειες μετουσιωμένου αίματος θα μπορούσε να οφείλεται στην έλλειψη επαρκών αμινοξέων στο μέσο. Προφανώς, η θερμότητα καταστρέφει τη δομή των πρωτεϊνών, αλλά δεν προκαλεί αποδόμησή τους, η οποία θα απέδιδε ελεύθερα αμινοξέα στο καλλιεργητικό μέσο και θα παρήγαγε ανώτερες αλκοόλες. Επιπλέον, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πιθανή έλλειψη ελεύθερων αμινοξέων στο μετουσιωμένο αίμα το διαφοροποιεί από το μεταθανάτιο αίμα, στο οποίο η υδρόλυση και η αποδόμηση των πρωτεϊνών μετά τον θάνατο (Vazquez & Larson, 2013) θα μπορούσε να παράγει ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία με τη σειρά τους θα μπορούσαν να μεταβολιστούν σε ανώτερες αλκοόλες. Τα πιο επιτυχημένα μοντέλα ήταν της *K. pneumoniae*, και συγκεκριμένα τα KP1 και KP5-8. Παραδόξως, τα KP1, KP5-6 και KP8 εφαρμόστηκαν ικανοποιητικά στα μετουσιωμένα δείγματα των καλλιεργειών της *C. albicans* (έως και 88% των δειγμάτων με $E\% \leq 40\%$), ενώ το KP7 είχε έως 100% εφαρμογή στα μετουσιωμένα δείγματα των καλλιεργειών του *S. aureus*. Επιπλέον, το SA2 μοντέλο του *S. aureus* είχε, επίσης, ικανοποιητική εφαρμογή στα μετουσιωμένα δείγματα της *C. albicans* (έως και 75% των δειγμάτων με $E\% \leq 40\%$), ενώ το μοντέλο του *E. faecalis* απέτυχε να εφαρμοστεί στις μικροβιακές καλλιέργειες.

Η παραγωγή αιθανόλης, 1-προπανόλης, ισοβουτανόλης και μεθυλο-βουτανόλης στα όξινα και ουδέτερα δείγματα μετουσιωμένου αίματος στις καλλιέργειες της *C. albicans* αυξήθηκε παρουσία της προστιθέμενης γλυκόζης στο καλλιεργητικό μέσο, και η παραγωγή αιθανόλης ήταν ανάλογη με την περιεκτικότητα του αίματος σε γλυκόζη. Οι μέγιστες

συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ήταν συγκρίσιμες μεταξύ όξινων και ουδέτερων δειγμάτων μετουσιωμένου αίματος. Η 1-βουτανόλη δεν παρήχθη σε καμία από τις μυκητιακές καλλιέργειες μετουσιωμένου αίματος. Τα BHI μοντέλα (CA1-3) ήταν επιτυχημένα όταν εφαρμόστηκαν σε δείγματα αίματος με χαμηλές συγκεντρώσεις προστιθέμενης γλυκόζης (1 και 3 g/L). Καθώς η περιεκτικότητα σε γλυκόζη αυξανόταν, τα SDB μοντέλα (CA4-7) γίνονταν πιο επιτυχημένα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η παραγωγή αλκοολών από την *C. albicans* στο μετουσιωμένο αίμα ευνοείται όταν οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένες πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με μία μελέτη που ανέφερε παραγωγή αιθανόλης σε ανθρώπινο αίμα ενοφθαλμισμένο με *C. albicans* μετά τη δεύτερη ημέρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου και μόνο με την παρουσία προστιθέμενης γλυκόζης (Yajima et al., 2006). Συμπεραίνουμε, επίσης, ότι το μετουσιωμένο, φυσιολογικό αίμα στους 25°C δεν είναι ευνοϊκό θρεπτικό μέσο για γρήγορη ανάπτυξη ζυμομυκήτων και επακόλουθη παραγωγή αιθανόλης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή άλλων αλκοολών ήταν παρόμοια σε όξινες και ουδέτερες καλλιέργειες μετουσιωμένου αίματος.

Εφαρμοσιμότητα των μοντέλων σε βιολογικά δείγματα από περιστατικά νεκροτομών

Από τα 128 νεκροτομικά περιστατικά που ελέγχθηκαν, παρατηρήσαμε ότι δεν παράχθηκαν σε όλα τα δείγματα 1-προπανόλη και 1-βουτανόλη, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι αλκοόλες δεν θα μπορούσαν πάντα να είναι μεταξύ των μικροβιακά παραγόμενων ανώτερων αλκοολών. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι οι αλκοόλες αυτές δεν ανιχνεύονται σε όλες τις μεταθανάτιες περιπτώσεις με μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης μετά τον θάνατο (Boumba, 2020, 2022; Ceciliason et al., 2021; Liang et al., 2016). Επιπλέον, αυτό το αποτέλεσμα ενισχύει την προηγούμενη πρότασή μας ότι οι πέντε ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη) είναι εξίσου σημαντικοί βιοδείκτες της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης σε μεταθανάτιες περιπτώσεις (Boumba, 2022).

Τα μοντέλα της *K. pneumoniae* είχαν την καλύτερη εφαρμοσιμότητα από όλα τα βακτηριακά και μυκητιακά μοντέλα, με επιτυχία 42% στο σύνολο των περιστατικών (54/128) και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μεγαλύτερη από 0,50 g/L (έως 40% επιτυχία το KP8 μοντέλο). Η πλειοψηφία των KP μοντέλων (KP1 και KP5-8) είχαν μεγαλύτερη επιτυχία σε περιστατικά θανάτου απροσδιόριστης αιτίας (21%

των δειγμάτων το KP1 και 26-35% των δειγμάτων τα KP5-8) με παρουσία σημείων σήψης, πρώιμης ή προηγμένης (23-33% των περιπτώσεων). Τα KP μοντέλα ακολουθούν ως προς την εφαρμοσιμότητά τους τα μοντέλα της *E. coli* (έως 45% επιτυχία) (Boumba et al., 2012a, 2013), του *C. sporogenes* (45% επιτυχία) και του *C. perfringens* (68% επιτυχία) (Boumba et al., 2012a). Το μοντέλο του *E. faecalis* εφαρμόστηκε με επιτυχία στο 25% των περιστατικών (32/128) με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μικρότερη από 0,75 g/L (33% επιτυχία), κυρίως σε περιστατικά αιφνίδιων θανάτων (29% επιτυχία) με σημεία σήψης (29-31% των περιπτώσεων). Από τα βακτηριακά μοντέλα, λιγότερο επιτυχημένα ήταν του *S. aureus* (19/128, 15% των περιστατικών). Είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 1 g/L (19-22% των δειγμάτων), σε αιφνίδιους και θανάτους απροσδιόριστης αιτίας (9-14% των δειγμάτων) με πρώιμη σήψη (15% για το SA1) και χωρίς σημεία σήψης (14% για το SA2). Τέλος, τα μοντέλα της *C. albicans* είχαν τη χαμηλότερη δυνατότητα εφαρμογής με ποσοστό επιτυχίας μόλις 10% (13/128 περιστατικά). Είχαν καλύτερη εφαρμογή σε περιστατικά με συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη από 1 g/L (έως 37% επιτυχία το CA4 μοντέλο), σε περιστατικά φυσικών (έως 11% επιτυχία το CA5 μοντέλο) ή βίαιων θανάτων (έως 17% επιτυχία το CA4 μοντέλο) με πρώιμα σημεία σήψης (έως 31% των δειγμάτων). Προφανώς, η εφαρμοσιμότητα των μικροβιακών μοντέλων στην πρόβλεψη της μικροβιακής αιθανόλης σε πραγματικά περιστατικά διαφέρει, κυρίως, λόγω των διαφορών στη σύσταση των βιολογικών υλικών, τη θερμοκρασία και, το πιο σημαντικό, τη μεταβαλλόμενη διαδοχή των μικροβίων σε ένα πραγματικό περιστατικό (Bos et al., 2013; Ceciliason et al., 2021; Jones et al., 1999).

Ένας ενδεδειγμένος έλεγχος στα αποτελέσματά μας σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων σε πραγματικά περιστατικά νεκροτομών αποκάλυψε ότι 24 (έξι φυσικοί/αιφνίδιοι, έξι βίαιοι και 12 θάνατοι απροσδιόριστης αιτίας) από τα 128 περιστατικά (19%) είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα περιστατικά αυτά εφαρμόστηκαν με επιτυχία τα περισσότερα βακτηριακά μοντέλα (6/11). Τα περισσότερα από αυτά τα δείγματα προέρχονταν από περιπτώσεις με πρώιμη ή προχωρημένη σήψη κατά την αυτοψία (20 από τις 24 περιπτώσεις). Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης για 18 από αυτές τις περιπτώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 0,11-0,81 g/L. Αυτά τα επίπεδα θεωρούνται πιθανό να είναι μικροβιακής προέλευσης, όπως έχει αναφερθεί (Kugelberg & Jones, 2007; Ziavrou et al., 2005). Έξι περιστατικά είχαν αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης (1,08-2,94 g/L), αλλά επειδή αντιστοιχούν σε περιπτώσεις σήψης, η προέλευση της αιθανόλης θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι, εν μέρει, η προθανάτια κατανάλωση και, εν μέρει, ο μεταθανάτιος

σχηματισμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι τέσσερα από τα 24 περιστατικά ήταν ένας αιφνίδιος και τρεις βίαιοι θάνατοι χωρίς σημεία σήψης κατά την αυτοψία, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή μικροβιακής αιθανόλης θα μπορούσε να είχε συμβεί πριν από την εμφάνιση προχωρημένης σήψης, ειδικά σε περιπτώσεις με ανοιχτά τραύματα στο πτώμα (Boumba et al., 2019).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τουλάχιστον ένα βακτηριακό μοντέλο και από τα τρία διαφορετικά είδη βακτηρίων εφαρμόστηκε με επιτυχία σε οκτώ από τα προαναφερθέντα 24 περιστατικά. Τα επτά περιστατικά είχαν εύρος συγκεντρώσεων αιθανόλης από 0,11-0,71 g/L, ένα χωρίς σημεία σήψης και τα υπόλοιπα με αρχόμενη ή προχωρημένη σήψη και ένα περιστατικό 1,92 g/L αιθανόλη με προηγμένη σήψη. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω συγκεντρώσεις και τα φαινόμενα σήψης, είναι πιθανό η αιθανόλη αυτών των δειγμάτων να είναι μικροβιακής προέλευσης. Συνεπώς, θα μπορούσε να προταθεί ότι όταν σε ένα συγκεκριμένο δείγμα εφαρμόζονται είτε τα περισσότερα βακτηριακά μοντέλα είτε τουλάχιστον ένα μοντέλο από κάθε είδος βακτηρίου, τότε η προέλευση αιθανόλης στο δείγμα θα πρέπει πιθανότατα να είναι μικροβιακή.

Συμπερασματικά, όλα τα μοντέλα θα μπορούσαν και θα έπρεπε να εφαρμόζονται σε κάθε περίπτωση νεκροψίας, όπου στο δείγμα έχουν ανιχνευθεί ταυτόχρονα αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες. Η μόνη προϋπόθεση για την εφαρμογή των μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακής αιθανόλης σε ένα ύποπτο δείγμα αίματος μετά θάνατον είναι να έχουν καταγραφεί οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στο δείγμα. Στη συνέχεια, οι υπολογισμοί θα δείξουν το εύρος της αιθανόλης που θα μπορούσε να είχε παραχθεί. Ωστόσο, η αξιολόγηση της μεταθανάτιας συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα παραμένει μια πολύπλοκη διαδικασία. Πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες σχετικά με τα επίπεδα των ανώτερων αλκοολών σε προθανάτιες και μεταθανάτιες περιπτώσεις, για να τεκμηριωθεί η έκταση εφαρμογής των προτεινόμενων μοντέλων, να επιτευχθεί ακρίβεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης αιθανόλης και να εκτιμηθεί η προέλευση της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε μεταθανάτια δείγματα με αυξημένη βεβαιότητα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλοβουτανόλη) και άλλων πτητικών ουσιών (ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη) με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας υπερκείμενης φάσης με ανιχνευτή ιονισμού φλογός (HS-GC-FID) στις καλλιέργειες των βακτηρίων *K. pneumoniae*, *S. aureus* και *E. faecalis* και του μύκητα *C. albicans* σε διαφορετικές θερμοκρασίες και καλλιεργητικά μέσα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:
 - i. Η *C. albicans* ήταν ο καλύτερος αιθανολοπαραγωγός, ακολουθούμενη από την *K. pneumoniae*, τον *S. aureus* και τον *E. faecalis*.
 - ii. Οι ανώτερες αλκοόλες και οι υπόλοιπες πτητικές ενώσεις παράχθηκαν σε ποικίλες συγκεντρώσεις, ανάλογα με το είδος του μικροβίου, τη θερμοκρασία και τη σύσταση των θρεπτικών υλικών.
2. Η 1-προπανόλη, η 1-βουτανόλη, η ισοβουτανόλη, η 2-μεθυλο-1-βουτανόλη και η 3-μεθυλο-1-βουτανόλη αποτελούν τοξικολογικούς δείκτες της μεταθανάτιας μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
3. Η σύσταση του καλλιεργητικού μέσου αποτελεί τοξικολογικό δείκτη μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
4. Η θερμοκρασία αποτελεί τοξικολογικό δείκτη μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
5. Το pH αποτελεί τοξικολογικό δείκτη μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
6. Η περιεκτικότητα σε γλυκόζη αποτελεί τοξικολογικό δείκτη μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
7. Οι πτητικές ενώσεις ακεταλδεΐδη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη και 2-προπανόλη δεν αποτελούν τοξικολογικούς δείκτες μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης.
8. Η 1-προπανόλη ήταν η αλκοόλη που παράχθηκε συχνότερα μετά την αιθανόλη.
9. Η 1-προπανόλη ήταν η πιο σημαντική αλκοόλη στη μοντελοποίηση της βακτηριακής παραγωγής αιθανόλης.
10. Η μεθυλο-βουτανόλη ήταν η πιο σημαντική αλκοόλη στη μοντελοποίηση της μυκητιακής παραγωγής αιθανόλης.

11. Η 1-προπανόλη και η 1-βουτανόλη δεν ανιχνεύθηκαν από κοινού μεταξύ των μικροβιακά παραγόμενων ανώτερων αλκοολών.
12. Τα μοντέλα της *K. pneumoniae* είχαν την καλύτερη εφαρμοσιμότητα από όλα τα βακτηριακά και μυκητιακά μοντέλα.
13. Τα μοντέλα της *C. albicans* θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε περιορισμένα, ειδικά νεκροτομικά περιστατικά με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης.
14. Τα βακτηριακά μοντέλα θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε μεταθανάτια δείγματα ανεξαρτήτως των μικροβίων που πιθανώς ενεργοποιήθηκαν στο δείγμα.
15. Η καλύτερη εφαρμοσιμότητα των βακτηριακών μοντέλων παρατηρείται σε μεταθανάτια δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μεγαλύτερη από 0,50 g/L, σε περιστατικά απροσδιόριστου τρόπου θανάτου παρουσία σήψης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αιθανόλη είναι το βασικό δραστικό συστατικό των αλκοολούχων ποτών και αποτελεί την ευρύτερη νομίμως χρησιμοποιούμενη «ευφοριστική» τοξική ουσία, που χαρακτηρίζεται μάλιστα και από εξαρτησιογόνο δράση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα από νεκροτομικό υλικό αποτελεί μέρος της διαδικασίας διερεύνησης των αιτίων θανάτου, δεδομένου ότι η αιθανόλη μπορεί να αποτελεί αιτιώδη παράγοντα που συνέβαλε στον μηχανισμό του θανάτου ενός συγκεκριμένου περιστατικού. Καθίσταται προφανές ότι αν υπάρχει υποψία μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης ή αν η προέλευση της προσδιορισθείσας αιθανόλης σε νεκροτομικό υλικό τίθεται υπό αμφισβήτηση (κατάποση «εν ζωή» ή μεταθανάτια μικροβιακή παραγωγή), η ακριβής επιστημονική ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης αιθανόλης αποτελεί πρόβλημα κεφαλαιώδους σπουδαιότητας στην Δικαστική Τοξικολογία. Η αιθανόλη μπορεί να βιοσυντεθεί μεταθανάτια από πολλούς μικροοργανισμούς, από όλα τα διαθέσιμα υποστρώματα. Ταυτόχρονα με την αιθανόλη βιοσυντίθενται και άλλες πτητικές ενώσεις, οι λεγόμενες ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη (d-αμυλική αλκοόλη) και 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη)). Σε προηγούμενες μελέτες της επιβλέπουσας της παρούσας διδακτορικής διατριβής, προτάθηκε η διαμόρφωση μαθηματικών μοντέλων για τον υπολογισμό της μικροβιακά παραγόμενης αιθανόλης σε καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, και *Clostridium sporogenes* στους 25°C σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των αλκοολών 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη και μεθυλο-βουτανόλη (άθροισμα d-αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκαν υγρές αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες καλλιέργειες, χωριστά, επιλεγμένων μικροβιακών στελεχών (των βακτηρίων *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* και του μύκητα *Candida albicans*) σε διάφορες θερμοκρασίες (37°C, 25°C και 4°C), με διαφορετικά καλλιεργητικά υλικά (Brain Heart Infusion, BHI (με ή χωρίς προσθήκη επιπλέον γλυκόζης) και Sabouraud Dextrose Broth, SDB), καθώς και αερόβιες/αναερόβιες και αυστηρά αναερόβιες μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο ανθρώπινο φυσιολογικό αίμα στους 25°C, σε όξινες ή ουδέτερες συνθήκες pH, με ή χωρίς προσθήκη επιπλέον γλυκόζης. Οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης, των ανώτερων αλκοολών και άλλων πτητικών συστατικών που υπάρχουν φυσιολογικά στο ανθρώπινο αίμα ή

παράγονται μικροβιακά προσδιορίστηκαν, σε ημερήσια βάση, με αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης φάσης και ανιχνευτή ιονισμού φλογός (head space-gas chromatography-flame ionization detector, HS-GC-FID). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με μεθόδους πολυπαραμετρικής ανάλυσης (multiple linear regression) και η συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των παραγόμενων αλκοολών στις μικροβιακές καλλιέργειες στους 25°C περιγράφηκαν από μαθηματικά μοντέλα. Η εφαρμοσιμότητα των εξαχθέντων μοντέλων ελέγχθηκε στις μικροβιακές καλλιέργειες στους 37°C, στις μικροβιακές καλλιέργειες μετουσιωμένου ανθρώπινου φυσιολογικού αίματος και σε βιολογικά υλικά από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών.

Η *C. albicans* παράγαγε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης στους 25°C και στους 37°C, ακολουθούμενη από την *K. pneumoniae*, τον *S. aureus* και τον *E. faecalis*. Επίσης, παράχθηκαν ανώτερες αλκοόλες και άλλες πτητικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις που ποίκιλαν ανάλογα με τις διαφορετικές μικροβιακές καλλιέργειες, τη θερμοκρασία και τη σύσταση των θρεπτικών υλικών. Στις βακτηριακές καλλιέργειες σε ανθρώπινο μετουσιωμένο αίμα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης παράχθηκαν από την *K. pneumoniae* μαζί με τον *S. aureus* και ακολούθως, τον *E. faecalis*. Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης που παρήχθησαν από την *C. albicans* ήταν ανάλογες της συγκέντρωσης της προστιθέμενης γλυκόζης. Οι ανώτερες αλκοόλες δεν παράχθηκαν από όλες τις μικροβιακές καλλιέργειες σε μετουσιωμένο αίμα.

Η 1-προπανόλη, η 1-βουτανόλη, η ισοβουτανόλη και η μεθυλο-βουτανόλη αποτελούν τόσο ποιοτικούς όσο και ποσοτικούς δείκτες της μικροβιακής παραγωγής αιθανόλης. Η 1-προπανόλη ήταν η πιο σημαντική αλκοόλη στη μοντελοποίηση της βακτηριακής παραγωγής αιθανόλης, ενώ η μεθυλο-βουτανόλη η πιο σημαντική αλκοόλη στη μοντελοποίηση της μυκητιακής παραγωγής αιθανόλης.

Τα βακτηριακά μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε δείγματα βακτηριακών καλλιιεργειών σε σχέση με τις μυκητιακές καλλιέργειες στους 37°C. Αντιστοίχως, τα μυκητιακά μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε δείγματα από καλλιέργειες της *C. albicans*. Τα μοντέλα των βακτηρίων εφαρμόστηκαν με μεγαλύτερη επιτυχία από τα μοντέλα των μυκήτων σε μικροβιακά δείγματα μετουσιωμένου φυσιολογικού αίματος. Αντιθέτως, τα μοντέλα της *C. albicans* εφαρμόστηκαν κυρίως σε δείγματα από καλλιέργειες μυκήτων σε ανθρώπινο μετουσιωμένο αίμα. Γενικά, τα μοντέλα της *K. pneumoniae* είχαν την καλύτερη εφαρμογή από όλα τα μικροβιακά μοντέλα, σε δείγματα αίματος από πραγματικά περιστατικά νεκροτομών. Ακολούθησε το μοντέλο του *E. faecalis* και εκείνα

του *S. aureus*. Τα λιγότερα επιτυχημένα μοντέλα ήταν της *C. albicans*. Παρατηρήθηκε ότι τα βακτηριακά μοντέλα είχαν καλύτερη εφαρμογή σε μεταθανάτια δείγματα με συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα μεγαλύτερη από 0,50 g/L, σε περιστατικά απροσδιόριστου τρόπου θανάτου παρουσία σήψης. Συνολικά, τα βακτηριακά μοντέλα θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε μεταθανάτια δείγματα ανεξάρτητα από τα μικρόβια που πιθανώς δραστηριοποιούνται στο δείγμα.

SUMMARY

“Toxicological indicators of microbial ethanol production: experimental study and multivariate evaluation in microbial cultures and real postmortem cases”

Glykeria A. Velivasi, Chemist M.Sc.

Ethanol is the most widely and legally used toxic substance, characterized by addictive effects. The determination of postmortem blood ethanol concentration is part of the death investigation process, since ethanol might be a causal or contributory factor to the manner of death. The accurate scientific interpretation of the results of the ethanol analysis is of vital importance in forensic toxicology in cases where microbial ethanol production is suspected, or the origin of postmortem ethanol (ante-mortem ingestion or microbial production) is questioned. Ethanol can be formed postmortem by many microorganisms from all available substrates. Among others, other volatile compounds, the so-called higher alcohols (1-propanol, 1-butanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol (d-amyl alcohol) and 3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)) might be co-detected. In previous studies from our research team, mathematical models were proposed to calculate microbially produced ethanol in cultures of the bacterial strains *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, and *Clostridium sporogenes* at 25°C as a function of the concentrations of the higher alcohols 1-propanol, 1-butanol, isobutanol, and methyl-butanol (sum of d-amyl and isoamyl alcohol).

In this contribution, liquid aerobic/anaerobic and strictly anaerobic cultures of selected microbial strains (the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and the fungus *Candida albicans*) were prepared separately at different temperatures (37°C, 25°C and 4°C), in different culture media (Brain Heart Infusion, BHI (with or without additional glucose) and Sabouraud Dextrose Broth, SDB), as well as aerobic/anaerobic and strictly anaerobic microbial cultures in denatured human blood, acidic or neutral, at 25°C, with or without additional glucose. The concentrations of ethanol, higher alcohols, and other volatile compounds, naturally present in human blood or microbially produced, were determined by head space-gas chromatography-flame ionization detector (HS-GC-FID). The results were analyzed by multiple linear regression analysis and simple mathematical models were developed describing the correlation between ethanol concentration and the higher alcohols' concentrations. The applicability of the models was

tested in microbial cultures at 37°C, in microbial cultures of denatured human blood and in postmortem samples from autopsy cases.

The higher ethanol concentrations, at 25°C and 37°C, were produced by *C. albicans*, followed by *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *E. faecalis*. The patterns and concentrations of the higher alcohols and the other volatile compounds varied among the different microbial cultures, temperature and composition of the culture media. The higher ethanol concentrations in bacterial cultures of human denatured blood were produced by *K. pneumoniae* along with *S. aureus*, followed by *E. faecalis*. The ethanol concentrations produced by *C. albicans* were proportional to the additional glucose concentrations. Higher alcohols were not produced by all microbial denatured blood cultures.

1-Propanol, 1-butanol, isobutanol and methyl-butanol are indicators of microbial ethanol production, in qualitative and quantitative terms. 1-Propanol was the most significant alcohol in modelling bacterial ethanol production, while methyl-butanol was the most significant alcohol in modelling fungal ethanol production.

The bacterial models applied better in samples from bacterial cultures than from fungal cultures at 37°C, while the fungal models applied to fungal samples and failed to apply to the samples from bacterial cultures. The bacterial models applied more successfully to microbial samples from denatured normal blood than the fungal models. On the contrary, the *C. albicans* models were applied better in samples from fungal denatured blood cultures. In general, the *K. pneumoniae* models showed the best applicability of all microbial models in postmortem samples from autopsy cases, followed by the *E. faecalis* model and the *S. aureus* models. The *C. albicans* models were the least successful. The best applicability of the bacterial models was observed in autopsy cases with blood ethanol concentration greater than 0.50 g/L, in cases of undetermined cause of death and in cases with putrefaction. Overall, the bacterial models could apply in postmortem samples where microbial ethanol production could have taken place, irrespectively of the microbes that were possibly activated in the sample.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά:

- Velivasi, G., Sakkas, H., Kourkoumelis, N., Boumba V.A. (2021) ‘Modeling postmortem ethanol production by *C. albicans*: Experimental study and multivariate evaluation’, *Forensic Science International*, 324, p. 110809. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.110809.

Forensic Science International 324 (2021) 110809



Modeling postmortem ethanol production by *C. albicans*: Experimental study and multivariate evaluation



Glykeria Velivasi^a, Hercules Sakkas^b, Nikolaos Kourkoumelis^c, Vassiliki A. Boumba^{a,*}

^a Department of Forensic Medicine & Toxicology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^b Department of Microbiology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^c Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2021

Received in revised form 16 April 2021

Accepted 21 April 2021

Available online 1 May 2021

Keywords:

Postmortem ethanol

1-propanol

Higher alcohols

Autopsy blood

C. albicans

Modeling

ABSTRACT

In previous research, we modeled the ethanol production by certain bacteria under controlled experimental conditions in an attempt to quantify the production of microbial postmortem ethanol in cases where other alcohols were co-detected. This contribution on the modeling of postmortem ethanol production by *Candida albicans* is complementary to these previous studies. This work aimed to study ethanol, higher alcohols (1-propanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol), and 1-butanol production by *Candida albicans*: (i) in different culture media (Brain Heart Infusion, BHI and Sabouraud Dextrose Broth, SDB), (ii) under mixed aerobic/anaerobic or strict anaerobic conditions, and (iii) at different temperatures (37 °C, 25 °C and, 4 °C), and develop simple mathematical models, resulted from fungal cultures at 25 °C, to predict the microbially produced ethanol in correlation with the other alcohols. The applicability of the models was tested in the *C. albicans* cultures in BHI and SDB media at 37 °C, in denatured human blood at 25 °C, acidic and neutral with different concentrations of additional glucose, in acidic denatured blood diluted with dextrose solution and in blood from autopsy cases. The received results indicated that the *C. albicans* models could apply in cases where yeasts have been activated in blood with elevated glucose levels. Overall, the in vitro ethanol production by *C. albicans* in blood depended on temperature, time, glucose (or carbohydrate) content, pH of the medium and endogenous changes in the medium composition through time. Our results showed that methyl-butanol is the most significant indicator of fungal ethanol production, followed by the equally important isobutanol and 1-propanol in qualitative and quantitative terms.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

- Velivasi, G., Kourkoumelis, N., Sakkas, I., Boumba V.A. (2021) ‘Modeling microbial ethanol production by *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis* under aerobic/anaerobic conditions — applicability to laboratory cultures and real postmortem cases’, *International Journal of Legal Medicine*, 135(6), pp. 2555–2565. doi: 10.1007/s00414-021-02638-4.

International Journal of Legal Medicine
<https://doi.org/10.1007/s00414-021-02638-4>

ORIGINAL ARTICLE



Modeling microbial ethanol production by *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis* under aerobic/anaerobic conditions — applicability to laboratory cultures and real postmortem cases

Glykeria Velivasi¹ · Nikolaos Kourkoumelis² · Iraklis Sakkas³ · Vassiliki A. Boumba^{1,4}

Received: 25 January 2021 / Accepted: 11 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

A quite intriguing subject being intensively researched in the forensic toxicology field is the source of postmortem determined blood ethanol concentration: antemortem ingestion or postmortem microbial production. Our previous research on microbial ethanol production has reported a quantitative relationship between the ethanol and the higher alcohols and 1-butanol produced by *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, and *Clostridium sporogenes*. In this contribution, we continue our research reporting on the following: (i) the patterns of ethanol, higher alcohols, and 1-butanol production by the microbes *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* (all being aerobic/facultative anaerobic species, common corpse's colonizers, and ethanol producers), under controlled laboratory conditions, (ii) the mathematical modeling, with simple mathematical equations, of the correlation between ethanol concentration and the other studied alcohols' concentrations, by performing multiple linear regression analysis of the results, and (iii) the applicability of the constructed models in microbial cultures developed under different temperature than that used to build the models, in denatured blood cultures and in real postmortem cases. The aforementioned alcohols were proved to be all indicators of ethanol production, both in qualitative and quantitative terms. 1-Propanol was the most significant alcohol in modeling microbial ethanol production, followed by methyl-butanol. The *K. pneumoniae*'s models achieved the best scoring in applicability ($E < 40\%$) compared to the *S. aureus* and *E. faecalis* models, both at laboratory microbial cultures at 37 °C and real postmortem cases. Overall, a noteworthy accuracy in estimating the microbial ethanol in cultures and autopsy blood is achieved by the employed simple linear models.

Keywords Ethanol · Postmortem blood · Volatiles · Fermentation · Biomarkers · Microbial ethanol

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmad, S., Aamir, M., Kirmani, S. I., Haroon, Z. H., Bibi, A., & Khalid, U. Bin. (2021). Effect of Temperature and Preservative on Neo-ethanol Formation in Postmortem Whole Blood Samples. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, *31*(10), 1159–1162. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2021.10.1159>
- Akbaba, M. (2020). A medicolegal approach to the very rare Auto-Brewery (endogenous alcohol fermentation) syndrome. *Traffic Injury Prevention*, *21*(5), 295–297. <https://doi.org/10.1080/15389588.2020.1740688>
- Al-Awadhi, A., Wasfi, I. A., Al Reyami, F., & Al-Hatali, Z. (2004). Autobrewing revisited: Endogenous concentrations of blood ethanol in residents of the United Arab Emirates. *Science & Justice*, *44*(3), 149–152. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(04\)71707-4](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(04)71707-4)
- Albermann, M. E., Musshoff, F., & Madea, B. (2010). A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(7), 2441–2447. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3388-2>
- Alling, C., Gustavsson, L., Månsson, J.-E., Benthin, G., & Änggård, E. (1984). Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *793*(1), 119–122. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(84\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(84)90060-2)
- Allison, C., & Macfarlane, G. T. (1998). Effect of Nitrate on Methane Production and Fermentation by Slurries of Human Faecal Bacteria. *Microbiology*, *134*(6), 1397–1405. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-6-1397>
- Alsayed, S. N., Alharbi, A. G., Alhejaili, A. S., Aljukhlub, R. J., Al-Amoudi, D. H., Ashankyty, A. I., Alzahrani, M. A., Zughaihi, T. A., Alharbi, O. A., Kheyami, A. M., Helmi, N. M., Tobaiqy, M. A., Hershan, A. A., Watson, D. G., & Al-Asmari, A. I. (2021). Ethyl glucuronide and ethyl sulfate: a review of their roles in forensic toxicology analysis of alcohol postmortem. *Forensic Toxicology*, *40*(1), 19–48. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00588-5>
- Altaras, N. E., & Cameron, D. C. (1999). Metabolic Engineering of a 1,2-Propanediol

Pathway in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1180–1185.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1180-1185.1999>

Andréasson, R., & Jones, A. W. (1996). The Life and Work of Erik M. P. Widmark. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 17(3), 177–190.
<https://doi.org/10.1097/00000433-199609000-00001>

Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., & Sterneck, M. (2018). Alcohol biomarkers in clinical and forensic contexts. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(18), 309–315. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0309>

Aradottir, S., & Olsson, B. L. (2005). Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochemistry*, 6(1), 18.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-18>

Aradottir, S., Seidl, S., Wurst, F. M., Jonsson, B. A. G., & Alling, C. (2004). Phosphatidylethanol in Human Organs and Blood: A Study on Autopsy Material and Influences by Storage Conditions. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 28(11), 1718–1723. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000145687.41646.E5>

Auwärter, V., Sporkert, F., Hartwig, S., Pragst, F., Vater, H., & Diefenbacher, A. (2001). Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clinical Chemistry*, 47(12), 2114–2123.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719475>

Backer, R. C., Pisano, R. V., & Sopher, I. M. (1980). The comparison of alcohol concentrations in postmortem fluids and tissues. *Journal of Forensic Sciences*, 25(2), 327–331. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7391795>

Bagramyan, K., & Trchounian, A. (2003). Structural and Functional Features of Formate Hydrogen Lyase, an Enzyme of Mixed-Acid Fermentation from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)*, 68(11), 1159–1170.
<https://doi.org/10.1023/B:BIRY.00000009129.18714.a4>

Baranowski, S., Serr, A., Thierauf, A., Weinmann, W., Große Perdekamp, M., Wurst, F. M., & Halter, C. C. (2008). In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. *International Journal of Legal Medicine*, 122(5), 389–393.

<https://doi.org/10.1007/s00414-008-0229-3>

Bean, P., Harasymiw, J., Peterson, C. M., & Javors, M. (2001). Innovative Technologies for the Diagnosis of Alcohol Abuse and Monitoring Abstinence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(2), 309–316. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02214.x>

Beck, O., Stephanson, N., Bottcher, M., Dahmen, N., Fehr, C., & Helander, A. (2007). Biomarkers to disclose recent intake of alcohol: potential of 5-hydroxytryptophol glucuronide testing using new direct UPLC-tandem MS and ELISA methods. *Alcohol and Alcoholism*, 42(4), 321–325. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agm039>

Beck, Olof, & Helander, A. (2003). 5-Hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake. *Addiction*, 98, 63–72. <https://doi.org/10.1046/j.1359-6357.2003.00583.x>

Bernhardt, T. G., Cannistraro, P. A., Bird, D. A., Doyle, K. M., & Laposata, M. (1996). Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 675(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00387-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00387-8)

Bévalot, F., Cartiser, N., Bottinelli, C., Guitton, J., & Fanton, L. (2016). State of the art in bile analysis in forensic toxicology. *Forensic Science International*, 259, 133–154. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.10.034>

Biasotti, A. A., & Valentine, T. E. (1985). Blood alcohol concentration determined from urine samples as a practical equivalent or alternative to blood and breath alcohol tests. *Journal of Forensic Sciences*, 30(1), 194–207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981109>

Bicker, W., Lämmerhofer, M., Keller, T., Schuhmacher, R., Krska, R., & Lindner, W. (2006). Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulfate in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(16), 5884–5892. <https://doi.org/10.1021/ac060680+>

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.-P., & Deckwer, W.-D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s002530051523>

- Biebl, H., Zeng, A.-P., Menzel, K., & Deckwer, W.-D. (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(1), 24–29. <https://doi.org/10.1007/s002530051251>
- Biondi, A., Freni, F., Carelli, C., Moretti, M., & Morini, L. (2019). Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic Science International*, *300*, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>
- Bonnichsen, R. K., & Theorell, H. (1951). An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *3*(1), 58–62. <https://doi.org/10.3109/00365515109060572>
- Bonte, W. (1987). Begleitstoffe alkoholischer Getränke. In *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Bd 17*. Schmidt-Römhild.
- Bonte, W., & Hey, F. (1983). Concerning storage alterations of the congener content of blood and urine samples. *Blutalkohol*, *20*, 109–122.
- Borucki, K., Dierkes, J., Wartberg, J., Westphal, S., Genz, A., & Luley, C. (2007). In Heavy Drinkers, Fatty Acid Ethyl Esters Remain Elevated for Up to 99 Hours. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *31*(3), 423–427. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00323.x>
- Bos, L. D. J., Sterk, P. J., & Schultz, M. J. (2013). Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review. *PLoS Pathogens*, *9*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003311>
- Boscolo-Berto, R., Favretto, D., Cecchetto, G., Vincenti, M., Kronstrand, R., Ferrara, S. D., & Viel, G. (2014). Sensitivity and Specificity of EtG in Hair as a Marker of Chronic Excessive Drinking. *Therapeutic Drug Monitoring*, *36*(5), 560–575. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000063>
- Boumba, V. A. (2020). Commentary on the article of Wang H, Li J, Huang Z, Wang F, Zhang Y, Chang J, Rao Y (2020) Assessment of the role played by n-propanol in distinction of ethanol source in postmortem blood with the assistance of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Forensi. Forensic Toxicology*, *38*(2), 529–530. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00520-y>

- Boumba, V. A. (2022). Modeling Postmortem Ethanol Production/Insights into the Origin of Higher Alcohols. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030700>
- Boumba, V. A., Economou, V., Kourkoumelis, N., Gousia, P., Papadopoulou, C., & Vougiouklakis, T. (2012a). Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International*, 215(1–3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.003>
- Boumba, V. A., Kourkoumelis, N., Gousia, P., Economou, V., Papadopoulou, C., & Vougiouklakis, T. (2013). Modeling microbial ethanol production by *E. coli* under aerobic/anaerobic conditions: Applicability to real postmortem cases and to postmortem blood derived microbial cultures. *Forensic Science International*, 232(1–3), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.021>
- Boumba, V. A., Kourkoumelis, N., Ziavrou, K., Fragkouli, K., & Vougiouklakis, T. (2012b). Patterns of the most abundant volatiles detected in post-mortem blood. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 20(2), 147–154. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2012.147>
- Boumba, V. A., Kourkoumelis, N., Ziavrou, K., & Vougiouklakis, T. (2019). Estimating a reliable cutoff point of 1-propanol in postmortem blood as marker of microbial ethanol production. *Journal of Forensic Science and Medicine*, 5(3), 141–146. https://doi.org/10.4103/jfsm.jfsm_8_19
- Boumba, V. A., Ziavrou, K. S., & Vougiouklakis, T. (2008). Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Science International*, 174(2–3), 133–151. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.018>
- Briglia, E. J., Bidanset, J. H., & Dal Cortivo, L. A. (1992). The distribution of ethanol in postmortem blood specimens. *Journal of Forensic Sciences*, 37(4), 991–998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506840>
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2013). *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology* (26th ed.). Mc Graw-Hill Education.
- Brown, D. J. (1985). The pharmacokinetics of alcohol excretion in human perspiration. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol*, 7, 539.

- Bruckner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11123.x>
- Budd, R. (1982). Ethanol levels in postmortem body fluids. *J. Chromatogr.*, 252, 315–318.
- Buono, M. J. (1999). Sweat ethanol concentrations are highly correlated with co-existing blood values in humans. *Experimental Physiology*, 84(2), 401–404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226180>
- Cabarcos, P., Ángel Cocho, J., Moreda, A., Míguez, M., Jesús Tabernero, M., Fernández, P., & María Bermejo, A. (2013). Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of phosphatidylethanol in blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 111, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.008>
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry Of Oxygen Toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 79–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>
- Cameron, D. C., Altaras, N. E., Hoffman, M. L., & Shaw, A. J. (1998). Metabolic Engineering of Propanediol Pathways. *Biotechnology Progress*, 14(1), 116–125. <https://doi.org/10.1021/bp9701325>
- Canfield, D. V., Kupiec, T., & Huffine, E. (1993). Postmortem alcohol production in fatal aircraft accidents. *Journal of Forensic Sciences*, 38(4), 914–917. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8355006>
- Caplan, Y. H., & Levine, B. (1990). Vitreous Humor in the Evaluation of Postmortem Blood Ethanol Concentrations*. *Journal of Analytical Toxicology*, 14(5), 305–307. <https://doi.org/10.1093/jat/14.5.305>
- Carlini, E. J., Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Jin, F., Zheng, W., Rebbeck, T. R., & Weinshilboum, R. M. (2001). Sulfation pharmacogenetics:SULT1A1 and SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects. *Pharmacogenetics*, 11(1), 57–68. <https://doi.org/10.1097/00008571-200102000-00007>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>

Caughlin, J. D. (1994). An unusual source for postmortem findings of methyl ethyl ketone and methanol in two homicide victims. *Forensic Science International*, *67*(1), 27–31. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)90408-1](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)90408-1)

Ceciliason, A. S., Andersson, M. G., Lundin, E., & Sandler, H. (2021). Microbial neoformation of volatiles: implications for the estimation of post-mortem interval in decomposed human remains in an indoor setting. *International Journal of Legal Medicine*, *135*(1), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02436-4>

Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, *16*(4), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>

Chang, J., & Kollman, S. E. (1989). The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood. *Journal of Forensic Sciences*, *34*(1), 105–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2645380>

Chang, W., Waltenbaugh, C., & Borensztajn, J. (1997). Fatty acid ethyl ester synthesis by the isolated perfused rat heart. *Metabolism*, *46*(8), 926–929. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90081-0](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90081-0)

Charlebois, R. C., Corbett, M. R., & Wigmore, J. G. (1996). Comparison of Ethanol Concentrations in Blood, Serum, and Blood Cells for Forensic Application*. *Journal of Analytical Toxicology*, *20*(3), 171–178. <https://doi.org/10.1093/jat/20.3.171>

Chen, E. C.-H. (1978). The Relative Contribution of Ehrlich and Biosynthetic Pathways to the Formation of Fusel Alcohols. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *36*(1), 39–43. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-36-0039>

Chipman, D. M., Duggleby, R. G., & Tittmann, K. (2005). Mechanisms of acetoxyacid synthases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *9*(5), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.07.002>

Christopoulos, G., Kirch, E. R., & E., G. J. (1973). Determination of ethanol in fresh and putrefied postmortem tissues. *J. Chromatogr.*, *87*, 455–472.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, *148*(6), 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard* (7th ed.). National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeast. In *Clinical Laboratory Standards Institute* (2nd ed., Vol. 32, Issue December). National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Cooper, R. A. (1984). Metabolism Of Methylglyoxal In Microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 49–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.000405>

Corry, J. E. L. (1978). Possible Sources of Ethanol Ante- and Post-mortem: its Relationship to the Biochemistry and Microbiology of Decomposition. *Journal of Applied Bacteriology*, 44(1), 1–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1978.tb00776.x>

Crabb, D W. (1995). Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. *Progress in Liver Diseases*, 13, 151–172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224501>

Crabb, David W., Matsumoto, M., Chang, D., & You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(1), 49–63. <https://doi.org/10.1079/PNS2003327>

Crunelle, C. L., Yegles, M., Nuijs, A. L. N. van, Covaci, A., De Doncker, M., Maudens, K. E., Sabbe, B., Dom, G., Lambert, W. E., Michielsens, P., & Neels, H. (2014). Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art. *Drug and Alcohol Dependence*, 134, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.10.008>

Dainty, R. H. (1970). Purification and properties of threonine aldolase from *Clostridium pasterianum*. *Biochemical Journal*, 117(3), 585–592. <https://doi.org/10.1042/bj1170585>

Dasgupta, A. (2015). *Alcohol and its Biomarkers*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18538-8>

Dent, B. B., Forbes, S. L., & Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, 45(4), 576–585. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0913->

z

Dettmeyer, R. B., Verhoff, M. A., & Schütz, H. F. (2014). Forensic Alcoholology. In *Forensic Medicine* (pp. 467–494). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38818-7_29

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., & Hewlins, M. J. E. (2000). An Investigation of the Metabolism of Isoleucine to Active Amyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10937–10942. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10937>

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., & Hewlins, M. J. E. (1998). An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25751–25756. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25751>

Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., & Hewlins, M. J. E. (1997). A ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Metabolism of Leucine to Isoamyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26871–26878. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.26871>

Dickinson, J. R., & Norte, V. (1993). A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 326(1–3), 29–32. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81754-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81754-N)

Dinis-Oliveira, R. J. (2016). Oxidative and Non-Oxidative Metabolomics of Ethanol. *Current Drug Metabolism*, 17(4), 327–335. <https://doi.org/10.2174/1389200217666160125113806>

Dinis-Oliveira, R. J. (2021). The auto-brewery syndrome: A perfect metabolic “storm” with clinical and forensic implications. *Journal of Clinical Medicine*, 10(20). <https://doi.org/10.3390/jcm10204637>

Dinis-Oliveira, R. J., Vieira, D. N., & Magalhães, T. (2016). Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. *Forensic Sciences Research*, 1(1), 42–51. <https://doi.org/10.1080/20961790.2016.1271098>

Dinis-Oliveira, R. J., Vieira, D. N., & Magalhães, T. (2016). Guidelines for Collection of

Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis. *Forensic Sciences Research*, 1(1), 42–51. <https://doi.org/10.1080/20961790.2016.1271098>

Doyle, K. M., Bird, D. A., Al-Salihi, S., Hallaq, Y., Cluette-Brown, J. E., Goss, K. A., & Laposata, M. (1994). Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *Journal of Lipid Research*, 35(3), 428–437. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8014578>

Doyle, K. M., Cluette-Brown, J. E., Dube, D. M., Bernhardt, T. G., Morse, C. R., & Laposata, M. (1996). Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA*, 276(14), 1152–1156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827968>

Drummer, O. H. (2014). Alcohol: Pharmacology and Disposition. *Academic Forensic Pathology*, 4(2), 128–137. <https://doi.org/10.23907/2014.022>

Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 639–648. <https://doi.org/10.1007/s002530051226>

Edenberg, H. J. (2000). *Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes* (pp. 295–341). [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(00\)64008-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(00)64008-4)

Edenberg, H. J. (2007). The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 30(1), 5–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718394>

Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027–1047. <https://doi.org/10.1002/cber.190704001156>

Eng, M. Y., Luczak, S. E., & Wall, T. L. (2007). ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 30(1), 22–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718397>

Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef.

Applied and Environmental Microbiology, 75(7), 1990–2001.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>

Fell, J. C., & Voas, R. B. (2014). The effectiveness of a 0.05 blood alcohol concentration (BAC) limit for driving in the United States. *Addiction*, 109(6), 869–874.
<https://doi.org/10.1111/add.12365>

Felson, R. B., & Staff, J. (2010). The effects of alcohol intoxication on violent versus other offending. *Criminal Justice and Behavior*, 37(12), 1343–1360.
<https://doi.org/10.1177/0093854810382003>

Fine, J. (1965). Glucose Content of Normal Urine. *BMJ*, 1(5444), 1209–1214.
<https://doi.org/10.1136/bmj.1.5444.1209>

Flanagan, R. J., & Connally, G. (2005). Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. *Toxicological Reviews*, 24(1), 51–62. <https://doi.org/10.2165/00139709-200524010-00004>

Forage, R. G., & Foster, M. A. (1982). Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of Bacteriology*, 149(2), 413–419. <https://doi.org/10.1128/jb.149.2.413-419.1982>

Foti, R. S., & Fisher, M. B. (2005). Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Science International*, 153(2–3), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.003>

Fraser, A. G. (1998). Is there an Interaction Between H2-Antagonists and Alcohol? *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 14(3). <https://doi.org/10.1515/DMDI.1998.14.3.123>

Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1581–1590. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1581-1590.2005>

Garriott, J. C. (1991). Skeletal muscle as an alternative specimen for alcohol and drug analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 36(1), 60–69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007881>

Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, 44(1), 106–139. <https://doi.org/10.1128/mr.44.1.106-139.1980>

- Geertinger, P., Bodenhoff, J., Helweg-Larsen, K., & Lund, A. (1982). Endogenous alcohol production by intestinal fermentation in sudden infant death. *Zeitschrift Für Rechtsmedizin*, *89*(3), 167–172. <https://doi.org/10.1007/BF01873798>
- Geppert, B., Tezyk, A., & Zaba, C. (2012). Biochemical markers for acute and chronic alcohol consumption. *Przegląd Lekarski*, *69*(10), 1163–1167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23421117>
- Geypens, B., Claus, D., Evenepoel, P., Hiele, M., Maes, B., Peeters, M., Rutgeerts, P., & Ghoo, Y. (1997). Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*, *41*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1136/gut.41.1.70>
- Gibson, G. R., Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (1993). Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiology Ecology*, *12*(2), 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1993.tb00023.x>
- Gilliland, M. G., & Bost, R. O. (1993). Alcohol in decomposed bodies: postmortem synthesis and distribution. *Journal of Forensic Sciences*, *38*(6), 1266–1274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8263473>
- Goll, D. E., Otsuka, Y., Nagainis, P. A., Shannon, J. D., Sathe, S. K., & Muguruma, M. (1983). Role Of Muscle Proteinases In Maintenance Of Muscle Integrity And Mass. *Journal of Food Biochemistry*, *7*(3), 137–177. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1983.tb00795.x>
- Goll, M., Schmitt, G., Ganßmann, B., & Aderjan, R. E. (2002). Excretion Profiles of Ethyl Glucuronide in Human Urine after Internal Dilution. *Journal of Analytical Toxicology*, *26*(5), 262–266. <https://doi.org/10.1093/jat/26.5.262>
- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6>
- Gray, J. R., Alson, J. A. (1989). The case for methanol. *Scientific American*, *261*, 108–114.
- Gubala, W. (1990). n-Butanol in blood as the indicator of how long a dead body lay in water. *Forensic Science International*, *46*(1–2), 127–128. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90149-S](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90149-S)
- Gustavsson, L. (1995). Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated

via phospholipase D. *Alcohol and Alcoholism*, 30(4), 391–406.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045750>

Hackett, M. A., Gorczynski, L. Y., & Martin, T. L. (2017). The effect of non-alcoholic food and beverage consumption on preliminary breath alcohol testing by the Dräger Alcotest 6810 and Alco-Sensor FST. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 50(3), 131–145.
<https://doi.org/10.1080/00085030.2017.1328160>

Hadley, J. A., & Smith, G. S. (2003). Evidence for an early onset of endogenous alcohol production in bodies recovered from the water: implications for studying alcohol and drowning. *Accident Analysis & Prevention*, 35(5), 763–769. [https://doi.org/10.1016/S0001-4575\(02\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0001-4575(02)00079-9)

Hafez, E., Hamad, M., Fouad, M., & Abdel-Lateff, A. (2017). Auto-brewery syndrome: Ethanol pseudo-toxicity in diabetic and hepatic patients. *Human & Experimental Toxicology*, 36(5), 445–450. <https://doi.org/10.1177/0960327116661400>

Haffner, H.-T., Besserer, K., Graw, M., & Voges, S. (1997a). Methanol elimination in non-alcoholics: inter- and intraindividual variation. *Forensic Science International*, 86(1–2), 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(97\)02119-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(97)02119-1)

Haffner, H. T., Banger, M., Graw, M., Besserer, K., & Brink, T. (1997b). The kinetics of methanol elimination in alcoholics and the influence of ethanol. *Forensic Science International*, 89(1–2), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(97\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(97)00122-9)

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

Halter, C. C., Dresen, S., Auwaerter, V., Wurst, F. M., & Weinmann, W. (2008). Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *International Journal of Legal Medicine*, 122(2), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0180-8>

Han, T. L., Cannon, R. D., & Villas-Bôas, S. G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, 48(8), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.002>

Hansson, P., Caron, M., Johnson, G., Gustavsson, L., & Alling, C. (1997). Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 21(1), 108–110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046381>

Hanzlick, R. L. (2014). Postmortem Ethanol Concentrations and Postmortem Ethanol Production. *Academic Forensic Pathology*, 4(2), 156–160. <https://doi.org/10.23907/2014.025>

Harper, D. R. (1989). A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Science International*, 43(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(89\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0379-0738(89)90120-5)

Helander, A., Beck, O., & Jones, A. W. (1995). Distinguishing ingested ethanol from microbial formation by analysis of urinary 5-hydroxytryptophol and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Journal of Forensic Sciences*, 40(1), 95–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533206>

Helander, Anders, & Beck, O. (2004). Mass Spectrometric Identification of Ethyl Sulfate as an Ethanol Metabolite in Humans. *Clinical Chemistry*, 50(5), 936–937. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031252>

Helander, Anders, Beck, O., & Wayne Jones, A. (1992). Urinary 5HTOL/5HIAA as biochemical marker of postmortem ethanol synthesis. *The Lancet*, 340(8828), 1159. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93184-O](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)93184-O)

Helander, Anders, & Dahl, H. (2005). Urinary Tract Infection: A Risk Factor for False-Negative Urinary Ethyl Glucuronide but Not Ethyl Sulfate in the Detection of Recent Alcohol Consumption. *Clinical Chemistry*, 51(9), 1728–1730. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051565>

Helander, Anders, Olsson, I., & Dahl, H. (2007). Postcollection Synthesis of Ethyl Glucuronide by Bacteria in Urine May Cause False Identification of Alcohol Consumption. *Clinical Chemistry*, 53(10), 1855–1857. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.089482>

Himmi, E. H., Bories, A., Boussaid, A., & Hassani, L. (2000). Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4), 435–440.

<https://doi.org/10.1007/s002530051638>

Høiseth, G., Bernard, J. P., Karinen, R., Johnsen, L., Helander, A., Christophersen, A. S., & Mørland, J. (2007). A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: Applications to forensic toxicology. *Forensic Science International*, *172*(2–3), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.01.005>

Høiseth, G., Morini, L., Poletini, A., Christophersen, A., & Mørland, J. (2009). Ethyl Glucuronide in Hair Compared With Traditional Alcohol Biomarkers-A Pilot Study of Heavy Drinkers Referred to an Alcohol Detoxification Unit. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *33*(5), 812–816. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00900.x>

Holmgren, A., & Jones, A. W. (2010). Demographics of suicide victims in Sweden in relation to their blood-alcohol concentration and the circumstances and manner of death. *Forensic Science International*, *198*(1–3), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.015>

Huang, H., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (2002). Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *98–100*, 687–698.

Hunsaker, J. C., Shields, L. B. E., Frost, B. E., & Dukes, G. D. (2016). Alcohol: Blood and Body Fluid Analysis. In *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine* (pp. 108–118). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00012-4>

Isenberg, H. D. (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (2nd ed.). American Society for Microbiology, ASM Press.

James, R. A., Hoadley, P. A., & Sampson, B. G. (1997). Determination of Postmortem Interval by Sampling Vitreous Humour. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, *18*(2), 158–162. <https://doi.org/10.1097/00000433-199706000-00010>

Janssen, P. H. (2004). Propanol as an end product of threonine fermentation. *Archives of Microbiology*, *182*(6), 482–486. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0732-y>

Johnson, R. D., Lewis, R. J., Canfield, D. V, Dubowski, K. M., & Blank, C. L. (2005). Utilizing the urinary 5-HTOL/5-HIAA ratio to determine ethanol origin in civil aviation accident victims. *Journal of Forensic Sciences*, *50*(3), 670–675. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932105>

Jones, A. W. (2015). Alcohol: Acute and Chronic Use and Postmortem Findings. In *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine: Second Edition* (Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00013-6>

Jones, A. W., Andersson, R., Sakshaug, J., & Morland, J. (1991). Possible Formation of Ethanol in Postmortem Blood Specimens after Antemortem Treatment with Mannitol. *Journal of Analytical Toxicology*, *15*(3), 157–158. <https://doi.org/10.1093/jat/15.3.157>

Jones, A. W., Hylén, L., Svensson, E., & Helander, A. (1999). Storage of specimens at 4°C or addition of sodium fluoride (1%) prevents formation of ethanol in urine inoculated with *Candida albicans*. *Journal of Analytical Toxicology*, *23*(5), 333–336. <https://doi.org/10.1093/jat/23.5.333>

Jones, A. W. (1990). Excretion of alcohol in urine and diuresis in healthy men in relation to their age, the dose administered and the time after drinking. *Forensic Science International*, *45*(3), 217–224. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90177-Z](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90177-Z)

Jones, A. W., & Holmgren, P. (2003). Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. *Forensic Science International*, *135*(3), 206–212. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00213-5)

Jones, A. W., Ostrovsky, Y. M., Wallin, A., & Midtvedt, T. (1984). Lack of differences in blood and tissue concentrations of endogenous ethanol in conventional and germfree rats. *Alcohol*, *1*(5), 393–396. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(84\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0741-8329(84)90009-0)

Jones, A. W. (1994). Concentration of endogenous ethanol in blood and CSF. *Acta Neurologica Scandinavica*, *89*(2), 149–150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8191880>

Jones, A. W. (2011). Pharmacokinetics of Ethanol - Issues of Forensic Importance. *Forensic Science Review*, *23*(2), 91–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231237>

Jones, A. W., & Jönsson, K. A. (1994). Food-induced lowering of blood-ethanol profiles and increased rate of elimination immediately after a meal. *Journal of Forensic Sciences*, *39*(4), 1084–1093. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8064267>

Jones, A. W., Jönsson, K. A., & Jorfeldt, L. (1989). Differences between capillary and venous blood-alcohol concentrations as a function of time after drinking, with emphasis on sampling variations in left vs right arm. *Clinical Chemistry*, *35*(3), 400–404.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2920406>

Jones, A. W. (2019). Alcohol, its analysis in blood and breath for forensic purposes, impairment effects, and acute toxicity. *WIREs Forensic Science*, 1(6), 1–32. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1353>

Jones, A. W. (2006). Urine as a Biological Specimen for Forensic Analysis of Alcohol and Variability in the Urine-to-Blood Relationship. *Toxicological Reviews*, 25(1), 15–35. <https://doi.org/10.2165/00139709-200625010-00002>

Jones, A. W. (2010). Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. *Forensic Science International*, 200(1–3), 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2010.02.021>

Jones, A. W., Lindberg, L., & Olsson, S.-G. (2004). Magnitude and Time-Course of Arterio-Venous Differences in Blood-Alcohol Concentration in Healthy Men. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(15), 1157–1166. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443150-00006>

Jung, B., Caslavská, J., & Thormann, W. (2008). Determination of ethyl sulfate in human serum and urine by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1206(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.086>

Jungmann, L., Große Perdekamp, M., Bohnert, M., Auwärter, V., & Pollak, S. (2011). Complex suicide by ethanol intoxication and inhalation of fire fumes in an old lady: Interdisciplinary elucidation including post-mortem analysis of congener alcohols. *Forensic Science International*, 209(1–3), e11–e15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.024>

Kaji, H., Asanuma, Y., Yahara, O., Shibue, H., Hisamura, M., Saito, N., Kawakami, Y., & Murao, M. (1984). Intragastrointestinal Alcohol Fermentation Syndrome: Report of Two Cases and Review of the Literature. *Journal of the Forensic Science Society*, 24(5), 461–471. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(84\)72325-5](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(84)72325-5)

Kalant, H. (1996). Pharmacokinetics of ethanol: Absorption, distribution, and elimination. In K. B. Beglieter H. (Ed.), *The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence* (p. 15). Oxford University Press.

Kalapos, M. P. (2003). On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical

implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1621(2), 122–139. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00051-5)

Kaphalia, B. S., Cai, P., Khan, M. F., Okorodudu, A. O., & Ansari, G. A. S. (2004). Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol*, 34(2–3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.013>

Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daepfen, J. B., Augsburger, M., Mangin, P., Staub, C., & Sporkert, F. (2012). Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *International Journal of Legal Medicine*, 126(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0619-9>

Koohmaraie, M. (1992). The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74(3), 239–245. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90122-U](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90122-U)

Křivánková, L., Caslavská, J., Maláškova, H., Gebauer, P., & Thormann, W. (2005). Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *Journal of Chromatography A*, 1081(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.099>

Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2007). Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International*, 165(1), 10–29. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.004>

Kuhlman, J. J., Levine, B., Smith, M. L., & Hordinsky, J. R. (1991). Toxicological findings in Federal Aviation Administration general aviation accidents. *Journal of Forensic Sciences*, 36(4), 1121–1128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1919471>

Kulig, C. C., Beresford, T. P., & Everson, G. T. (2006). Rapid, accurate, and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147(3), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.11.006>

Kumar, M., & Sarin, S. K. (2010). Biomarkers of diseases in medicine. *Current Trends in Science*, 15, 403–4017.

Ladkin, R. G., & Davies, J. N. P. (1948). Rupture of Stomach in African Child. *BMJ*, *1*(4552), 644–644. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4552.644>

Laposata, M. (1997). Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. *Clinical Chemistry*, *43*(8 Pt 2), 1527–1534. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265904>

Le Daré, B., Lagente, V., & Gicquel, T. (2019). Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metabolism Reviews*, *51*(4), 545–561. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1679169>

Lemos, N. P. (2014). Ethanol Analysis in Postmortem and Human Performance Forensic Toxicology Cases. *Academic Forensic Pathology*, *4*(2), 138–145. <https://doi.org/10.23907/2014.023>

Levine, B., & Smialek, J. E. (2000). Status of alcohol absorption in drinking drivers killed in traffic accidents. *Journal of Forensic Sciences*, *45*(1), 3–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641911>

Levitt, M. D., & Levitt, D. G. (2000). Appropriate use and misuse of blood concentration measurements to quantitate first-pass metabolism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *136*(4), 275–280. <https://doi.org/10.1067/mlc.2000.109100>

Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K., & Vu, N. T. (2004). Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Science International*, *146*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.015>

Liang, H., Kuang, S., Guo, L., Yu, T., & Rao, Y. (2016). Assessment of the Role Played by N-propanol Found in Postmortem Blood in the Discrimination Between Antemortem Consumption and Postmortem Formation of Ethanol Using Rats. *Journal of Forensic Sciences*, *61*(1), 122–126. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12921>

Lieber, C. S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta*, *257*(1), 59–84. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(96\)06434-0](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06434-0)

Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 744–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744->

753.2000

Lima, I. V. De, & Midio, A. F. (1999). *Origin of blood ethanol in decomposed bodies*. 106, 157–162.

Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>

Lin, Z., Wang, H., Jones, A. W., Wang, F., Zhang, Y., & Rao, Y. (2020). Evaluation and review of ways to differentiate sources of ethanol in postmortem blood. *International Journal of Legal Medicine*, 134(6), 2081–2093. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02415-9>

Logan, B. K., & Jones, A. W. (2000). Endogenous ethanol “auto-brewery syndrome” as a drunk-driving defence challenge. *Medicine, Science and the Law*, 40(3), 206–215. <https://doi.org/10.1177/002580240004000304>

Lucey, M. R., Mathurin, P., & Morgan, T. R. (2009). Alcoholic Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 360(26), 2758–2769. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0805786>

Maenhout, T. M., De Buyzere, M. L., & Delanghe, J. R. (2013). Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clinica Chimica Acta*, 415, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.014>

Marques, P. R., & McKnight, A. S. (2009). Field and Laboratory Alcohol Detection With 2 Types of Transdermal Devices. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(4), 703–711. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00887.x>

Martin, E., Moll, W., Schmid, P., & Dettli, L. (1984). The pharmacokinetics of alcohol in human breath, venous and arterial blood after oral ingestion. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 26(5), 619–626. <https://doi.org/10.1007/BF00543496>

Masaphy, S. (2013). Development of Media for Growth and Enumeration of Fungi from Water. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 201–209). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_14

Maudens, K. E., Patteet, L., van Nuijs, A. L. N., Van Broekhoven, C., Covaci, A., & Neels, H. (2014). The influence of the body mass index (BMI) on the volume of distribution of

ethanol. *Forensic Science International*, 243, 74–78.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.036>

Mayes, R., Levine, B., Smith, M. L., Wagner, G. N., & Froede, R. (1992). Toxicologic findings in the USS Iowa disaster. *Journal of Forensic Sciences*, 37(5), 1352–1357.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402759>

Melchiorson, C. R., Jensen, N. B. S., Christensen, B., Vaever Jokumsen, K., & Villadsen, J. (2001). Dynamics of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), 271–279. <https://doi.org/10.1002/bit.1117>

Miller, W. C., Palmer, W. K., Arnall, D. A., & Oscai, L. B. (1987). Characterization of the triacylglycerol lipase activity in three types of rat skeletal muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(3), 317–322. <https://doi.org/10.1139/y87-055>

Mitchell, M. C., Teigen, E. L., & Ramchandani, V. A. (2014). Absorption and Peak Blood Alcohol Concentration After Drinking Beer, Wine, or Spirits. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(5), 1200–1204. <https://doi.org/10.1111/acer.12355>

Mitchell, W. J. (1997). *Physiology of Carbohydrate to Solvent Conversion by Clostridia* (pp. 31–130). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60015-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60015-6)

Moore, W. E. C., & Holdeman, L. V. (1974). Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27(5), 961–979.
<https://doi.org/10.1128/am.27.5.961-979.1974>

Moriya, F. (2004). Forensic Sciences - Alcohol in Body Fluids. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition, 2000*, 358–365. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00196-5>

Moriya, Fumio, & Hashimoto, Y. (2004). Postmortem production of ethanol and n-propanol in the brain of drowned persons. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 25(2), 131–133. <https://doi.org/10.1097/01.paf.0000127402.97576.42>

Mukherjee, P. K., Sendid, B., Hoarau, G., Colombel, J.-F., Poulain, D., & Ghannoum, M. A. (2015). Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(2), 77–87. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.188>

Mulla, A., Massey, K. L., & Kalra, J. (2005). Vitreous humor biochemical constituents: evaluation of between-eye differences. *The American Journal of Forensic Medicine and*

Pathology, 26(2), 146–149. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894848>

Nalesso, A., Viel, G., Cecchetto, G., Frison, G., & Ferrara, S. D. (2010). Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS. *ELECTROPHORESIS*, 31(7), 1227–1233. <https://doi.org/10.1002/elps.200900430>

Nanikawa, R., Moriya, F., & Hashimoto, Y. (1988). Experimental studies on the mechanism of ethanol formation in corpses. *Zeitschrift Für Rechtsmedizin*, 101(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00205320>

Nanikawa, Ryo, Ameno, K., Hashimoto, Y., & Hamada, K. (1982). Medicolegal studies on alcohol detected in dead bodies — alcohol levels in skeletal muscle. *Forensic Science International*, 20(2), 133–140. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(82\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(82)90138-4)

Nanikawa, Ryo, & Kotoku, S. (1974). Medicolegal observations on a dead body drawn up from the sea bed, with special reference to ethanol and diatoms. *Forensic Science*, 3, 225–232. [https://doi.org/10.1016/0300-9432\(74\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0300-9432(74)90033-8)

Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2239–2243. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>

Negre, A. E., Salvayre, R. S., Dagan, A., & Gatt, S. (1985). New fluorometric assay of lysosomal acid lipase and its application to the diagnosis of wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, 149(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(85\)90276-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(85)90276-1)

Niemelä, O. (2007). *Acetaldehyde Adducts in Circulation* (pp. 183–197). <https://doi.org/10.1002/9780470511848.ch13>

Niemelä, O., & Alatalo, P. (2010). Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 70(5), 305–312. <https://doi.org/10.3109/00365513.2010.486442>

Nissinen, A. E., Laitinen, L. M., Kakko, S., Helander, A., Savolainen, M. J., & Hörkkö, S. (2012). Low plasma antibodies specific for phosphatidylethanol in alcohol abusers and patients with alcoholic pancreatitis. *Addiction Biology*, 17(6), 1057–1067.

<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00279.x>

Nissinen, A. E., Mäkelä, S. M., Vuoristo, J. T., Liisanantti, M. K., Hannuksela, M. L., Hörkkö, S., & Savolainen, M. J. (2008). Immunological Detection of in Vitro Formed Phosphatidylethanol—An Alcohol Biomarker—With Monoclonal Antibodies. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(6), 921–928. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00656.x>

O’Neal, C. L., & Poklis, A. (1996). Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A critical review. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 17(1), 8–20. <https://doi.org/10.1097/00000433-199603000-00002>

Oberrauch, W., Bergman, A.-C., & Helander, A. (2008). HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica Chimica Acta*, 395(1–2), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.06.001>

Ostrovsky, Y. M. (1986). Endogenous ethanol—Its metabolic, behavioral and biomedical significance. *Alcohol*, 3(4), 239–247. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(86\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0741-8329(86)90032-7)

Otsuka, M., Harada, N., Itabashi, T., & Ohmori, S. (1999). Blood and Urinary Levels of Ethanol, Acetaldehyde, and C4 Compounds Such as Diacetyl, Acetoin, and 2,3-Butanediol in Normal Male Students After Ethanol Ingestion. *Alcohol*, 17(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(98\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(98)00042-1)

Paczkowski, S., & Schütz, S. (2011). Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 917–935. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3417-x>

Palm, E. (1946). On the penetration of various substances from the blood to central nervous system and the eye. *Acta Ophthalmol.*, 24, 189–198.

Parsons, M. A., Start, R. D., & Forrest, A. R. W. (2003). Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. *Journal of Clinical Pathology*, 56(9), 720. <https://doi.org/10.1136/jcp.56.9.720-a>

Pawan, G. L. S., & Grice, K. (1968). Distribution of alcohol in urine and sweat after drinking. *The Lancet*, 292(7576), 1016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)91302-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)91302-0)

- Pélissier-Alicot, A.-L., Fornaris, M., Bartoli, C., Piercecchi-Marti, M.-D., Sanvoisin, A., & Leonetti, G. (2005). An unusual case of post-mortem redistribution of ethanol. *Forensic Science International*, *150*(1), 81–83. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.021>
- Petković, S., Savić, S., Zgonjanin, D., & Samojlik, I. (2008). Ethanol Concentrations in Antemortem Blood Samples Under Controlled Conditions. *Alcohol and Alcoholism*, *43*(6), 658–660. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn072>
- Phillips, M. (1984). Sweat-Patch Testing Detects Inaccurate Self-Reports of Alcohol Consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *8*(1), 51–53. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1984.tb05032.x>
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, *22*(4), 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Plueckhahn, V. D., & Ballard, B. (1967). Diffusion of stomach alcohol and heart blood alcohol concentration at autopsy. *Journal of Forensic Sciences*, *12*(4), 463–470. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6081915>
- Plueckhahn, V. D. (1967). The significance of blood alcohol levels at autopsy. *Medical Journal of Australia*, *2*(3), 118–124. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1967.tb73918.x>
- Plueckhahn, V. D., & Ballard, B. (1968). Factors influencing the significance of alcohol concentrations in autopsy blood samples. *The Medical Journal of Australia*, *1*(22), 939–943. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654811>
- Pounder, D J, Stevenson, R. J., & Taylor, K. K. (1998). Alcoholic ketoacidosis at autopsy. *Journal of Forensic Sciences*, *43*(4), 812–816. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9670504>
- Pounder, Derrick J, & Yonemitsu, K. (1991). Postmortem absorption of drugs and ethanol from aspirated vomitus — An experimental model. *Forensic Science International*, *51*(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(91\)90185-L](https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90185-L)
- Pragst, F. (2014). Toxicological Markers of Chronic Alcohol Abuse. In *Handbook of Forensic Medicine* (pp. 1099–1107). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118570654.ch61>

Quertemont, E., & Didone, V. (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 29(4), 258–265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718404>

Ragab, A. R. (2015). Endogenous Ethanol Production Levels in Saudi Arabia Residents. *Journal of Alcoholism & Drug Dependence*, 03(03). <https://doi.org/10.4172/2329-6488.1000211>

Ramdzan, A. N., Mornane, P. J., McCullough, M. J., Mazurek, W., & Kolev, S. D. (2013). Determination of acetaldehyde in saliva by gas-diffusion flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 786, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.021>

Ramsey, M., Hartke, A., & Huycke, M. (2014). The Physiology and Metabolism of *Enterococci*. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* (pp. 1–55). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649507>

Reazin, G., Scales, H., & Andreasen, A. (1973). Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentations of different types of grain mash. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(1), 50–54. <https://doi.org/10.1021/jf60185a003>

Refaai, M. A., Nguyen, P. N., Steffensen, T. S., Evans, R. J., Cluette-Brown, J. E., & Laposata, M. (2002). Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake. *Clinical Chemistry*, 48(1), 77–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751541>

Reischke, S., Rousk, J., & Bååth, E. (2014). The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.011>

Richette, P., & Bardin, T. (2010). Gout. *The Lancet*, 375(9711), 318–328. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60883-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60883-7)

Rodda, L. N., Beyer, J., Gerostamoulos, D., & Drummer, O. H. (2013). Alcohol congener analysis and the source of alcohol: A review. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 9(2), 194–207. <https://doi.org/10.1007/S12024-013-9411-0>

Rogers, P. L., Goodman, A. E., & Heyes, R. H. (1984). *Zymomonas* ethanol fermentations.

- Microbiological Sciences*, 1(6), 133–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6444136>
- Room, R., Babor, T., & Rehm, J. (2005). Alcohol and public health. *The Lancet*, 365(9458), 519–530. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17870-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17870-2)
- Rosano, T. G., & Lin, J. (2008). Ethyl Glucuronide Excretion in Humans Following Oral Administration of and Dermal Exposure to Ethanol. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(8), 594–600. <https://doi.org/10.1093/jat/32.8.594>
- Ryan, K. J., & Ray, G. C. (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). Mc Graw-Hill Education.
- Saghir, M., Blodget, E., & Laposata, M. (1999). The Hydrolysis of Fatty Acid Ethyl Esters in Low-Density Lipoproteins by Red Blood Cells, White Blood Cells and Platelets. *Alcohol*, 19(2), 163–168. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00035-X)
- Saier, M. H. (1998). Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(2–3), 170–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980420\)58:2/3<170::AID-BIT9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980420)58:2/3<170::AID-BIT9>3.0.CO;2-I)
- Salaspuro, V., & Salaspuro, M. (2004). Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *International Journal of Cancer*, 111(4), 480–483. <https://doi.org/10.1002/ijc.20293>
- Salem, R. O., Cluette-Brown, J. E., & Laposata, M. (2005). Fatty acid ethyl esters, nonoxidative ethanol metabolites, synthesis, uptake, and hydrolysis by human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1–3), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.10.009>
- Sandven, P., & Lassen, J. (1999). Importance of Selective Media for Recovery of Yeasts from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3731–3732. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3731-3732.1999>
- Sarkola, T., & Eriksson, C. J. (2001). Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 25(4), 513–516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329490>
- Saukko, P., & Knight, B. (2004). Knight's Forensic Pathology, 3Ed. In *Antimicrobial agents and chemotherapy* (3rd ed., Vol. 58, Issue 12). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13642>

Schloegl, H., Dresen, S., Spaczynski, K., Stoertzel, M., Wurst, F. M., & Weinmann, W. (2006). Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *International Journal of Legal Medicine*, *120*(2), 83–88. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0012-7>

Schmitt, G., Aderjan, R., Keller, T., & Wu, M. (1995). Ethyl Glucuronide: An Unusual Ethanol Metabolite in Humans. Synthesis, Analytical Data, and Determination in Serum and Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, *19*(2), 91–94. <https://doi.org/10.1093/jat/19.2.91>

Scott-Ham, M., & Burton, F. C. (2005). Toxicological findings in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, *12*(4), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.jcfm.2005.03.009>

Shepherd, M. F., Lake, K. D., & Kamps, M. A. (1992). Postmortem Changes and Pharmacokinetics: Review of the Literature and Case Report. *Annals of Pharmacotherapy*, *26*(4), 510–514. <https://doi.org/10.1177/106002809202600412>

Sherrington, S. L., Sorsby, E., Mahtey, N., Kumwenda, P., Lenardon, M. D., Brown, I., Ballou, E. R., MacCallum, D. M., & Hall, R. A. (2017). Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLOS Pathogens*, *13*(5), e1006403. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006403>

Siegel, J. A., & Saukko, P. J. (2012). Encyclopedia of forensic sciences: Second edition. In *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition* (Issue c).

Skipper, G. E., Weinmann, W., Thierauf, A., Schaefer, P., Wiesbeck, G., Allen, J. P., Miller, M., & Wurst, F. M. (2004). Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. *Alcohol and Alcoholism*, *39*(5), 445–449. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh078>

Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, *142*(2–3), 75–100. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.012>

Skopp, G., Schmitt, G., Potsch, L., Dronner, P., Aderjan, R., & Mattern, R. (2000). Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol and Alcoholism*, *35*(3), 283–285. <https://doi.org/10.1093/alcalc/35.3.283>

Skopp, Gisela. (2010). Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*,

6(4), 314–325. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9150-4>

Smialek, J. E., & Levine, B. (1998). Diabetes and Decomposition. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 19(1), 98–101. <https://doi.org/10.1097/00000433-199803000-00019>

Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., & Agapiou, A. (2005). A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic Science International*, 153(2–3), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.08.015>

Steinert, R. E., Rehman, A., Souto Lima, E. J., Agamennone, V., Schuren, F. H. J., Gero, D., Schreiner, P., Vonlanthen, R., Ismaeil, A., Tzafos, S., Hosa, H., Vetter, D., Misselwitz, B., & Bueter, M. (2020). Roux-en-Y gastric bypass surgery changes fungal and bacterial microbiota in morbidly obese patients—A pilot study. *PLOS ONE*, 15(7), e0236936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236936>

Stewart, S. H., Koch, D. G., Willner, I. R., Anton, R. F., & Reuben, A. (2014). Validation of Blood Phosphatidylethanol as an Alcohol Consumption Biomarker in Patients with Chronic Liver Disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(6), 1706–1711. <https://doi.org/10.1111/acer.12442>

Stöhlmacher, P. (1996). Formation of so-called byproducts (propanols, butanols et al.) from ethanol by microorganisms. *Blutalkohol*, 33(3), 113–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8737567>

Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>

Sturner, W. Q., & Coumbis, R. J. (1966). The Quantitation of Ethyl Alcohol in Vitreous Humor and Blood by Gas Chromatography. *American Journal of Clinical Pathology*, 46(3), 349–351. <https://doi.org/10.1093/ajcp/46.3.349>

Sulkowski, H. A., Wu, A. H., & McCarter, Y. S. (1995). In-vitro production of ethanol in urine by fermentation. *Journal of Forensic Sciences*, 40(6), 990–993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522931>

Sundström, M., Jones, A. W., & Ojanperä, I. (2014). Utility of urinary ethyl glucuronide

analysis in post-mortem toxicology when investigating alcohol-related deaths. *Forensic Science International*, 241, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.05.022>

Swift, R. (2000). Transdermal alcohol measurement for estimation of blood alcohol concentration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(4), 422–423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798575>

Sylvester, P. A., Wong, N. A., Warren, B. F., & Ranson, D. L. (1998). Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 51(3), 250–252. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.3.250>

Syu, M.-J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s002530000486>

Tagliaro, F., Lubli, G., Ghielmi, S., Franchi, D., & Marigo, M. (1992). Chromatographic methods for blood alcohol determination. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 580(1–2), 161–190. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80534-W](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80534-W)

Takahashi, G., Hoshikawa, K., Kan, S., Akimaru, R., Kodama, Y., Sato, T., Kakisaka, K., & Yamada, Y. (2021). Auto-brewery syndrome caused by oral fungi and periodontal disease bacteria. *Acute Medicine & Surgery*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/ams2.652>

Tameez Ud Din, A., Alam, F., Tameez-ud-din, A., & Chaudhary, F. M. D. (2020). Auto-Brewery Syndrome: A Clinical Dilemma. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.10983>

Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., & Shankar, N. (2003). Pathogenic *enterococci*: New developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(12), 2622–2636. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3138-0>

Thierauf, A., Wohlfarth, A., Auwärter, V., Perdekamp, M. G., Wurst, F. M., & Weinmann, W. (2010). Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulfate after the consumption of yeast and sugar. *Forensic Science International*, 202(1–3), e45–e47. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.06.028>

Tomaszewski, M., & Buchowicz, J. (1972). Alcoholysis of the endogenous phosphate esters in rats treated with large doses of ethanol. *Biochemical Journal*, 129(1), 183–186. <https://doi.org/10.1042/bj1290183>

- Tran-Din, K., & Gottschalk, G. (1985). Formation of d(-)-1,2-propanediol and d(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation. *Archives of Microbiology*, 142(1), 87–92. <https://doi.org/10.1007/BF00409243>
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001). Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s002530100760>
- Van Ende, M., Wijnants, S., & Van Dijck, P. (2019). Sugar sensing and signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00099>
- Varga, A., Hansson, P., Lundqvist, C., & Alling, C. (1998). Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(8), 1832–1837. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835304>
- Varga, Arthur, & Nilsson, S. (2008). Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol. *ELECTROPHORESIS*, 29(8), 1667–1671. <https://doi.org/10.1002/elps.200700548>
- Vazquez, R., & Larson, D. F. (2013). Plasma protein denaturation with graded heat exposure. *Perfusion (United Kingdom)*, 28(6), 557–559. <https://doi.org/10.1177/0267659113498921>
- Velivasi, G., Kourkoumelis, N., Sakkas, H., & Boumba, V. A. (2021a). Modeling microbial ethanol production by *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis* under aerobic/anaerobic conditions — applicability to laboratory cultures and real postmortem cases. *International Journal of Legal Medicine*, 135(6), 2555–2565. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02638-4>
- Velivasi, G., Sakkas, H., Kourkoumelis, N., & Boumba, V. A. (2021b). Modeling postmortem ethanol production by *C. albicans*: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Science International*, 324, 110809. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110809>
- Voas, R. B., Torres, P., Romano, E., & Lacey, J. H. (2012). Alcohol-Related Risk of Driver Fatalities: An Update Using 2007 Data. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 73(3),

341–350. <https://doi.org/10.15288/jsad.2012.73.341>

Voltaire, A., Beck, O., & Borg, S. (1992). Urinary 5-Hydroxytryptophol: A Possible Marker of Recent Alcohol Consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *16*(2), 281–285. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01377.x>

Wachholz, P., Skowronek, R., & Pawlas, N. (2021). Cerebrospinal fluid in forensic toxicology: Current status and future perspectives. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, *82*(August). <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102231>

Wagner, K. (1936). Über die Veränderlichkeit des Alkoholgehaltes von Leichenblut und nicht steril aufbewahrten Blutproben. *Deutsche Zeitschrift Für Die Gesamte Gerichtliche Medizin*, *26*(1–3), 276–292. <https://doi.org/10.1007/BF01749283>

Walsham, N. E., & Sherwood, R. A. (2012). Ethyl glucuronide. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, *49*(2), 110–117. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011115>

Wang, H., Li, J., Huang, Z., Wang, F., Zhang, Y., Chang, J., & Rao, Y. (2020). Assessment of the role played by n-propanol in distinction of ethanol source in postmortem blood with the assistance of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Forensic Toxicology*, *38*(1), 195–202. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00507-9>

Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., & Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation. *Biotechnology Advances*, *19*(3), 201–223. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X)

Watts, M. T., & McDonald, O. L. (1990). The Effect of Sodium Chloride Concentration, Water Content, and Protein on the Gas Chromatographic Headspace Analysis of Ethanol in Plasma. *American Journal of Clinical Pathology*, *93*(3), 357–362. <https://doi.org/10.1093/ajcp/93.3.357>

Welch, B. T., Coelho Prabhu, N., Walkoff, L., & Trenkner, S. W. (2016). Auto-brewery Syndrome in the Setting of Long-standing Crohn's Disease: A Case Report and Review of the Literature. *Journal of Crohn's and Colitis*, *10*(12), 1448–1450. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw098>

WHO. (2018). *Global status report on alcohol and health 2018*.

Wigmore, J. G. (2011). *Wigmore on Alcohol: Courtroom Alcohol Toxicology for the Medicolegal Professional* (1st ed.). Irwin Law Inc.

Winek, C. L., & Esposito, F. M. (1981). Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Science International*, *17*(1), 27–36. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(81\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0379-0738(81)90185-7)

Winek, C. L., & Jones, T. (1980). Blood Versus bone marrow ethanol concentrations in rabbits and humans. *Forensic Science International*, *16*(2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(80\)90162-0](https://doi.org/10.1016/0379-0738(80)90162-0)

Winek, C. L., Matejczyk, R. J., & Buddie, E. G. (1983). Blood, bone marrow and eye fluid ethanol concentrations in putrefied rabbits. *Forensic Science International*, *22*(2–3), 151–159. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(83\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0379-0738(83)90008-7)

Winek, C. L., Winek, C. L., & Wahba, W. W. (1995). The role of trauma in postmortem blood alcohol determination. *Forensic Science International*, *71*(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)01569-Q](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)01569-Q)

Wolfe, A. J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *69*(1), 12–50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.12-50.2005>

Wood, H. G. (1981). *Metabolic Cycles in the Fermentation by Propionic Acid Bacteria* (pp. 255–287). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152818-8.50021-9>

Woźniak, M. K., Wiergowski, M., Namieśnik, J., & Biziuk, M. (2018). Biomarkers of Alcohol Consumption in Body Fluids - Possibilities and Limitations of Application in Toxicological Analysis. *Current Medicinal Chemistry*, *26*(1), 177–196. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171005111911>

Wunder, C., Hain, S., Koelzer, S. C., Paulke, A., Verhoff, M. A., & Toennes, S. W. (2017). Lack of effects of a “sobering” product, “Eezup!”, on the blood ethanol and congener alcohol concentration. *Forensic Science International*, *278*, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.024>

Wunder, C., Weber, C., Paulke, A., Koelzer, S. C., Holz, F., & Toennes, S. W. (2021). Endogenous formation of 1-propanol and methanol after consumption of alcoholic beverages. *Forensic Science International*, *325*, 110905.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110905>

Wurst, F. M., Dresen, S., Allen, J. P., Wiesbeck, G., Graf, M., & Weinmann, W. (2006). Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption. *Addiction*, *101*(2), 204–211. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2005.01245.x>

Wurst, F. M., Metzger, J., Jachau, K., Seidl, S., Pridzun, L., Janda, I., & Alt, A. (2001). The direct ethanol metabolite ethyl glucuronide: A specific marker of recent alcohol consumption. In *New and Upcoming Markers of Alcohol Consumption* (pp. 62–74). Steinkopff. https://doi.org/10.1007/978-3-642-96008-6_5

Wurst, F. M., Thon, N., Aradottir, S., Hartmann, S., Wiesbeck, G. A., Lesch, O., Skala, K., Wolfersdorf, M., Weinmann, W., & Alling, C. (2010). Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. *Addiction Biology*, *15*(1), 88–95. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00185.x>

Yajima, D., Motani, H., Kamei, K., Sato, Y., Hayakawa, M., & Iwase, H. (2006). Ethanol production by *Candida albicans* in postmortem human blood samples: Effects of blood glucose level and dilution. *Forensic Science International*, *164*(2–3), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.12.009>

Yan, F., McNally, R., Kontanis, E. J., & Sadik, O. A. (2001). Preliminary quantitative investigation of postmortem adipocere formation. *Journal of Forensic Sciences*, *46*(3), 609–614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372998>

You, M., & Crabb, D. W. (2004). Recent Advances in Alcoholic Liver Disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *287*(1), G1–G6. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2004>

Yuan, J., Chen, C., Cui, J., Lu, J., Yan, C., Wei, X., Zhao, X., Li, N., Li, S., Xue, G., Cheng, W., Li, B., Li, H., Lin, W., Tian, C., Zhao, J., Han, J., An, D., Zhang, Q., ... Liu, D. (2019). Fatty Liver Disease Caused by High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Metabolism*, *30*(4), 675–688.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.018>

Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, *29*(4), 245–254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718403>

Ziavrou, K., Boumba, V. A., & Vougiouklakis, T. G. (2005). Insights into the origin of postmortem ethanol. *International Journal of Toxicology*, 24(2), 69–77. <https://doi.org/10.1080/10915810590936391>

Zumwalt, R. E., Bost, R. O., & Sunshine, I. (1982). Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies. *Journal of Forensic Sciences*, 27(3), 549–554. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7119711>

Κουπάρης, Μ. Α. (2015). *Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας – Διαπίστευση*. Πρώτη Έκδοση, Εθνικών Και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών. <http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM102>

Κουτσελίνης, Α. Σ. (2000). *Ιατροδικαστική*. Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος.

Χατζιωάννου, Θ. Π., & Κουπάρης, Μ. Α. (2005). *Ενόργανη Ανάλυση* (Έκτη έκδοση).

