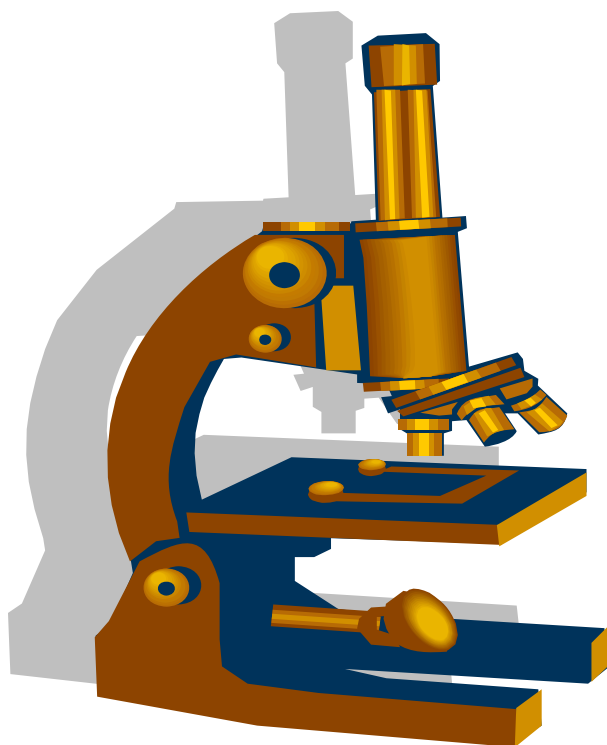


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΚΑΖΑΝΤΖΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Α.Μ.20115

ΤΙΤΛΟΣ

Έλεγχος σε γιαούρτια της ελληνικής αγοράς ως προς τους πληθυσμούς
και την ευαισθησία σε αντιβιοτικά, των οξυγαλακτικών βακτηρίων



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΪΟΣ

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2005

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μία σειρά ανθρώπων χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Κυριακού Α. για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής και την πολύτιμη καθοδήγησή της. Ευχαριστώ, επίσης, τον κύριο Καραθάνο Β. ο οποίος βρήκε δείγματα γιαουρτιού από την Καρδίτσα και έτσι κατέστη δυνατό να έχουμε δείγματα και από τους τέσσερις νομούς της Θεσσαλίας καθώς και την κυρία Αντωνοπούλου Σ.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στην Εύη Μήτσου και Ειρήνη Τσιμπίδη οι οποίες με βοήθησαν καθ'όλη τη διάρκεια του εργαστηριακού μέρους με τις γνώσεις και την εμπειρία τους καθώς και την κυρία Κώτσου Μαρία για τη βοήθειά της στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την καλή μου φίλη και συνάδελφο Βασιλοπούλου Αρχοντία , τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την ηθική τους υποστήριξη .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή	2
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	2
1.2 Γιαούρτι και Υγεία.....	3
1.3 Κριτήρια ορισμού του γιαουρτιού.....	8
1.4 Ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος	10
1.5 Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά οξυγαλακτικών βακτηρίων γιαουρτιού.....	11
1.6 Ζύμωση γιαουρτιού.....	13
1.7 Αντιβιοτικά	15
1.8 Στατιστικά στοιχεία κτηνοτροφικών μονάδων Θεσσαλίας	19
Σκοπός	20
Κεφάλαιο 2 Δείγμα-Υλικά-Μέθοδοι	23
2.1 Το δείγμα	23
2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	23
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα	33
3.1 Αναγραφόμενα χαρακτηριστικά γιαουρτιών.....	33
3.2 Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών	34
3.2.1 Καταμέτρηση πληθυσμού του γένους <i>Streptococcus</i>	34
3.2.2 Καταμέτρηση πληθυσμού του γένους <i>Lactobacillus</i>	36
3.3 Απομόνωση στελεχών	38
3.3.1 Απομόνωση στελεχών του γένους <i>Streptococcus</i>	38
3.3.2 Απομόνωση στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i>	40
3.4 Ταυτοποίηση στελεχών	42
3.4.1 Ταυτοποίηση στελεχών του γένους <i>Streptococcus</i>	42

3.4.2 Ταυτοποίηση στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i>	48
3.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά	49
3.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά του γένους <i>Streptococcus</i>	49
3.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά του γένους <i>Lactobacillus</i>	51
Συμπεράσματα-Συζήτηση	53
Ξένη Βιβλιογραφία	56
Ελληνική Βιβλιογραφία	60
Παράρτημα	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γιαούρτι είναι προϊόν πηγμένου αγελαδινού ή πρόβειου γάλακτος. Για τη ζύμωση του γιαουρτιού απαραίτητη και υποχρεωτική είναι η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* σε πληθυσμό το λιγότερο 10^7 κύτταρα ανά γραμμάριο γιαουρτιού. Σε μερικά γιαούρτια που είναι προβιοτικά προστίθενται και βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το γιαούρτι εμφανίζει ευεργετικές επιδράσεις ως προς τον έλεγχο της καρκινογένεσης, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των διαρροιών ποικίλης αιτιολογίας, την ανοχή στη λακτόζη, την αντιφλεγμονώδη δράση και την αντιμετώπιση της ρινοπάθειας .

Η εργασία αφορά 20 δείγματα γιαουρτιού από τη Θεσσαλία, κατεξοχήν κτηνοτροφική περιοχή. Μετά τις διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος, καταμέτρησης πληθυσμού των γενών *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και απομόνωσης των στελεχών τους, ταυτοποιήθηκαν τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα γένη *Streptococcus* και *Lactobacillus* (*Bifidobacterium* δεν βρέθηκαν) και εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά. Συνολικά εξετάστηκαν για ευαισθησία στα αντιβιοτικά 30 στελέχη για κάθε είδος βακτηρίων. Όσων αφορά τις απομονώσεις του γένους *Streptococcus* βρέθηκε σε ποσοστό 3,33% ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη, ενώ στις απομονώσεις των στελεχών του γένους *Lactobacillus* παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα 3,33% στο Bacitracin, 10% στη Βανκομυκίνη, 33,33% στην Καναμυκίνη, 33,33% στο Amicacin και 90% στο Ciprofloxacin.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το γιαούρτι είναι τρόφιμο το οποίο παράγεται πλέον σε όλο τον κόσμο, μέσω της γαλακτικής ζύμωσης αγελαδινού ή πρόβειου γάλακτος. Κατά την σύγχρονη παραγωγή γιαουρτιού γίνεται προσθήκη πρωτεϊνών γάλακτος, και πολύ συχνά ζάχαρης, και παραγόντων συμπύκνωσης (EI-Zahar K, et al., 2003). Ένα από τα πιο σημαντικά τεχνικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού είναι η υφή του, η οποία εξαρτάται από την θερμοκρασία που εφαρμόζεται και από τις καλλιέργειες εκκίνησης που παίρνουν μέρος στην ζύμωση (Sadini I., et al., 2004).

Στην πορεία του χρόνου, οι λαοί της Μεσογείου προχώρησαν στην εκμάθηση παραγωγής του γιαουρτιού και των συναφών ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος, τροποποιώντας τις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής που κληρονόμησαν από την επαφή τους με τις νομαδικές φυλές. Το αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή ενός προϊόντος αρκετά διαφοροποιημένου από το αρχικό, το οποίο φαίνεται ότι αρχικά κάλυπτε την ανάγκη για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των γαλακτοκομικών προϊόντων στους λαούς αυτούς, με δεδομένο την έλλειψη του ψυγείου και της ανισοκατανομής της παραγωγής γάλακτος μέσα στον χρόνο (Tamine and O'Connor, 1995; Tamine and Robinson, 1999; Tamine and McNulty, 1999).

Η παραδοσιακή μεθοδολογία για την παρασκευή των διαφόρων ζυμωμένων προϊόντων δεν γνωρίζουμε ιστορικά πως και πότε προέκυψε, αλλά σίγουρα είναι μία διαδικασία που στηρίζεται στις συνθήκες περιβάλλοντος που επικρατούν στις εκάστοτε οικογενειακές παραγωγές. Οι συνθήκες αυτές δεν ελέγχονται αυστηρά και κατά συνέπεια η κατεύθυνση της διαδικασίας της ζύμωσης μπορεί να μεταβληθεί, με αποτέλεσμα τα τελικά προϊόντα να μην παρουσιάζουν σταθερότητα στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Οι γνώσεις όμως στην Μικροβιολογία των ζυμώσεων, που ενισχύθηκαν ήδη από το τέλος του 20^{ου} αιώνα, βοήθησε ιδιαίτερα την Βιομηχανία τροφίμων έτσι ώστε να προχωρήσει στην χρήση επιλεγμένων καλλιεργειών εκκίνησης, των οποίων το βιοχημικό προφίλ και τα μεταβολικά προϊόντα μελετήθηκαν ικανοποιητικά, έτσι ώστε να αποδώσουν σταθερά προϊόντα ζύμωσης. Δεν πρέπει μάλιστα να παραγνωρίζουμε ότι η διαδικασία παραγωγής στηρίζεται πλέον σε ασύγκριτα μεγαλύτερους όγκους πρώτης ύλης (γάλα) και ότι ο έλεγχος της ζυμωτικής διαδικασίας είναι απαραίτητος για την ποιότητα και την διατροφική

ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων. Παραμένει όμως το γεγονός ότι στην παράδοση οφείλουμε την βασική αρχική τεχνογνωσία (Robinson R.K., et al.;2002).

1.2 ΓΙΑΟΥΡΤΙ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Οι άνθρωποι σε όλο τον κόσμο καταναλώνουν ζυμωμένα προϊόντα (ΖΠΓ) γάλακτος ως βασικό μέρος της διατροφής τους, εδώ και πολλά χρόνια. Η καταγραφή της κατανάλωσης των ΖΠΓ από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών (IDF), η οποία γίνεται συστηματικά από το 1966, καταδεικνύει μεγάλη αύξηση κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Ιδιαίτερα η κατανάλωση του γιαουρτιού, είναι σε ανοδική πορεία, πιθανόν λόγω των συζητούμενων στο ευρύ καταναλωτικό κοινό, σημαντικών ωφελειών στην υγεία. Η παρουσία και η δράση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB) στη ζύμωση του γιαουρτιού είναι ένας από τους βασικότερους λόγους που το γιαούρτι θεωρείται ωφέλιμο για την υγεία του καταναλωτή (Fernandes C.F et al., 1999)

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και καρκίνος

Στην αρχή του εικοστού αιώνα ο Elie Metschnikoff πρότεινε ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) που βρίσκονται στο γιαούρτι θα ήταν ουσιώδη στην προαγωγή της μακροζωίας του ανθρώπινου γένους αν η χρήση τους ήταν γενική. Στις μέρες μας, ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες της μακροζωίας είναι αυτός που αφορά τον έλεγχο των όγκων.

Το 1959 υπήρξε η ένδειξη ότι το *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* είχε σημαντική δράση ενάντια στους όγκους και έτσι ξεκίνησε η μελέτη των ιδιοτήτων των LAB, που παίρνουν μέρος στις ζυμώσεις των γαλακτοκομικών προϊόντων, απέναντι στον έλεγχο των όγκων (Adachi S., 1999) .

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου γιαυτό και τα τελευταία χρόνια δόθηκε μεγάλη προσοχή στο ρόλο της διατροφής όσων αφορά την αιτιολογία του καρκίνου (Adolfsson O., et al., 2004).

Η λειτουργία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο στηρίζεται στην μετατροπή των προκαρκινικών ενώσεων, σε καρκινικές μέσα από την δράση κάποιων βακτηριακών ενζύμων όπως η β-γλυκουρονιδάση, η γλυκοσιδάση, η νιτρορεδουκτάση κ.α. Τα ένζυμα αυτά περιέχονται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε συγκεκριμένα βακτήρια της

εντερικής μικροχλωρίδας, που ανήκουν στα γένη *Bacteroides*, *Clostridium* κ.α. Αντίθετα η δράση των ενζύμων αυτών στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι ελάχιστη. Έγινε λοιπόν η υπόθεση, ότι εάν μπορούσε να τροποποιηθεί η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας προς την κατεύθυνση των βακτηρίων εκείνων που δεν διαθέτουν αυτού του τύπου τα ένζυμα, τότε θα μπορούσε να ενισχυθεί η καταστολή της δημιουργίας των όγκων. Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί αυτών των φαινομένων δεν είναι γνωστοί, αλλά εικάζεται ότι προς την θετική κατεύθυνση της καταστολής της ογκογένεσης παίρνει μέρος και η αντιγονική διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Adachi S., 1999; Adolfsson O., et al., 2004) .

Οι περισσότερες μελέτες που εστιάζονται σε αυτό το θέμα έχουν γίνει σε ζώα κυρίως σε ποντίκια. Οι επιδημιολογικές έρευνες, καθώς και οι παρεμβατικές έρευνες λόγω της δυσκολίας του θέματος και των θεμάτων βιοηθικής που προκύπτουν για τις δεύτερες είναι πού λίγες.

Σε επιδημιολογική έρευνα που έγινε στην Ινδία για τον καρκίνο του παχέος εντέρου αναφέρεται ότι εμφανίζεται σχετικά χαμηλός αριθμός περιστατικών σε περιοχές όπου η κατανάλωση γαλακτοκομικών ζυμωμένων προϊόντων ήταν άφθονη (Adachi S., 1999).

Επίσης, η Διεθνής Αντιπροσωπεία για την Έρευνα του Καρκίνου (1977) αναφέρει ότι η υψηλή κατανάλωση προϊόντων ζυμωμένου γάλακτος έχει προστατευτική δράση ως προς τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Adachi S., 1999) .

Οι Bogdanov et al.(1975) βρήκαν ότι η δράση του *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* στέλεχος 51 ενάντια στο σάρκωμα -180 στα ποντίκια, οφείλεται σε γλυκοπεπτίδια που απαντώνται στο ακατέργαστο αιώρημα του βακτηρίου. Είναι η πρώτη φορά που εντοπίζεται θετική δράση των γλυκοπεπτιδίων που προέρχονται από το τοίχωμα του βακτηριακού κυττάρου, ενάντια σε κάποιο όγκο (Adachi S., 1999).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και επίπεδα χοληστερόλης

Υπάρχει τις τελευταίες δεκαετίες η αυξανόμενη αντίληψη ότι η χοληστερόλη ορού και η υγεία συσχετίζονται. Υψηλή χοληστερόλη ορού έχει αποδειχθεί ότι έχει αυξήσει τον αριθμό θανάτων από αθηροσκληρωτικές ασθένειες της καρδιάς. Για τον λόγο αυτό έχουν διαμορφωθεί διατροφικά σχήματα με σκοπό τη μείωση της χοληστερόλης.

Τα αποτελέσματα από μελέτες σε ανθρώπους ως προς την κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και συγκέντρωσης της χοληστερόλης ορού είναι αντιφατικά.

Η συσχέτιση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης ορού και της κατανάλωσης ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Μεγάλες ποσότητες κατανάλωσης ζυμωμένου γάλατος αγελάδας (8 λίτρα/μέρα) από πολεμιστές Massai, έχει συνδεθεί με χαμηλές τιμές χοληστερόλης ορού (Fernandes C.F, et al.; 1999).

Ο Mann (1977) παρατήρησε ότι μεγάλες ποσότητες γιαουρτιού στο καθημερινό διαιτολόγιο (2-4 λίτρα /ημέρα) για 12 μέρες μείωσε την χοληστερόλη ορού στα άτομα που συμμετείχαν στην έρευνα. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν αργά και έμεναν σταθερά μετά την διακοπή της κατανάλωσης γιαουρτιού.

Οι Herper et al.(1979) μελέτησαν τα αποτελέσματα της κατανάλωσης ΖΓΠ για 12 εβδομάδες στην χοληστερόλη. Τα άτομα που πήραν μέρος στην έρευνα παρέμειναν σε δίαιτα ελέγχου για 4 εβδομάδες, για τις επόμενες 4 εβδομάδες κατανάλωναν καθημερινά 3 μερίδες των 240γρ. γιαούρτι και τις τελευταίες 4 εβδομάδες κατανάλωναν 2% ξυνόγαλα (butterfat), επίσης 3 μερίδες των 240 γρ. Μετά από την συμπλήρωση μίας εβδομάδας κατανάλωσης γιαουρτιού η χοληστερόλη μειώθηκε από 5 έως 10%. Η χοληστερόλη μειώθηκε επίσης από την κατανάλωση ξυνόγαλου, αλλά σε λιγότερο σημαντικά επίπεδα.

Οι Bazzarre et al.(1983) μελέτησε, επίσης, τα αποτελέσματα της κατανάλωσης γιαουρτιού (3 μερίδες /ημέρα) στα επίπεδα της χοληστερόλης. Παρατηρήθηκε ότι η χοληστερόλη μειώθηκε στο τέλος μίας εβδομάδας σημαντικά στις γυναίκες ενώ η μείωση στους άνδρες δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική. (Fernandes C.F ,et al.; 1999).

Άλλη μία μελέτη έγινε σε γυναίκες ηλικίας 19-56 ετών, οι οποίες κατανάλωναν γιαούρτι το οποίο περιείχε εκτός από *Streptococcus thermophilus* και *L. Lactis*, τα προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus acidophilus* 145 και *Bifidobacterium longum* 913. Η ομάδα εθελοντριών αποτελούνταν από 29 γυναίκες, εκ των οποίων οι 15 ήταν φυσιολογικά χοληστερολαιμικές και οι 14 υπερχοληστερολαιμικές. Τα αποτελέσματα μετά από 21 εβδομάδες κατανάλωσης γιαουρτιού, 300γρ. την ημέρα, ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης της HDL χοληστερόλης κατά 0.3mmol/l. Επίσης το πηλίκο LDL/HDL χοληστερόλης μειώθηκε από 3,24 σε 2,48. (Kiessling G , et al.;2002).

Άλλες μελέτες δεν υποστηρίζουν τα υποχοληστερολαιμικά οφέλη των ΖΓΠ. Οι

Rossouw et al. (1981), σε μία μελέτη τριών εβδομάδων δεν παρατήρησαν μείωση στην χοληστερόλη ορού σε έφηβους άντρες που κατανάλωναν 2 λίτρα άπαχου γάλακτος, γιαουρτιού ή 20% κρέμα.

Οι Payens et al.(1976) δεν βρήκαν μείωση στα επίπεδα χοληστερόλης σε ανθρώπους που κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες γιαουρτιού ως μέρος της δίαιτάς τους. (Fernandes C.F, et al., 1999).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και δυσανοχή στη λακτόζη

Οφέλη από τα LAB παρατηρήθηκαν και στη βελτίωση της δυσανοχής στη λακτόζη. Η λακτόζη που είναι δισακχαρίτης του γάλακτος, υδρολύεται από τη λακτάση και κατόπιν απορροφάται στο λεπτό έντερο. Ο Alm(1982) παρατήρησε ότι το γιαούρτι και το ξινόγαλα είναι καλύτερα ανεκτά σε άτομα με δυσανοχή από το χαμηλών λιπαρών γάλα, όπως προέκυψε από τη μέτρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Όμως το γιαούρτι και το ξινόγαλα (*acidophilus milk*) περιέχουν μόλις την μισή ποσότητα λακτόζης (2,4-2,6%) σε σχέση με το γάλα χαμηλών λιπαρών (5,0%). Η αύξηση στην ανοχή της λακτόζης αποδόθηκε στα χαμηλά επίπεδα λακτόζης στα ΖΓΠ ή στην αυξημένη απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σωλήνα μέσω των LAB (Fernandes C.F, et al.; 2000).

Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκαν σε δέκα άτομα με πρόβλημα δυσανοχής στη λακτόζη, ισάξιες ποσότητες λακτόζης μέσω γάλακτος(400ml περιέχουν 18γρ. λακτόζης) ή γιαουρτιού(440ml περιέχουν 18γρ. λακτόζης). Κατά την διάρκεια της μελέτης υπολογιζόταν το υδρογόνο της αναπνοής τους κάθε οκτώ ώρες. Η ποσότητα του υδρογόνου που παράχθηκε ήταν σημαντικά χαμηλότερο για το γιαούρτι από το γάλα. Διάρροια και φούσκωμα αναφέρθηκαν στο 80% των ατόμων που κατανάλωσαν γάλα ενώ μόλις το 20% που κατανάλωσαν γιαούρτι ανέφεραν αυτά τα συμπτώματα. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι το γιαούρτι ήταν καλύτερα ανεκτό σε σχέση με το γάλα. (Fernandes C.F, et al.; 2000).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και ανοσοποιητικό σύστημα

Πολλοί είναι εκείνοι οι άνθρωποι οι οποίοι είναι ευαίσθητοι σε ασθένειες λόγω χαμηλής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι είναι σημαντικό για

αυτούς τους ανθρώπους να αποκατασταθεί ή να ενισχυθεί η άμυνα του οργανισμού τους. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την αντίσταση του οργανισμού σε ξενιστές και ειδικά παθογόνους (Kato et al.,1981).Η προστατευτική δράση των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* βασίζεται στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα μακροφάγα κύτταρα του προσβαλλόμενου οργανισμού και έτσι να ενισχύουν το σχηματισμό των μονοκυττάρων του αίματος στο σημείο όπου υπάρχει η προσβολή από τον ξενιστή. Οι Simone et al.(1989) παρατήρησαν μία σημαντική αύξηση της γ-ιντερφερόνης σε εθελοντές οι οποίοι είχαν καταναλώσει ΖΓΠ με βακτήρια του γαλακτικού οξέος. (Tomiooka H., et al.; 1999).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και διάρροια

Η μικροβιακή ισορροπία είναι σημαντικός παράγοντας στην διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης και το γιαούρτι έχει προταθεί για τον έλεγχο της διάρροιας ποικίλης αιτιολογίας. Η επίμονη διάρροια έχει χαρακτηριστεί ως η διάρροια η οποία ξεκινά ως οξεία και διαρκεί για δύο εβδομάδες το λιγότερο. Τα ευεργετικά αποτελέσματα των προϊόντων ζυμωμένου γάλακτος παρατηρήθηκαν σε παιδιά της Αλγερίας με επίμονη διάρροια. Αυτά τα παιδιά είχαν διάρροια για περισσότερο από 13 ημέρες και για 5 ημέρες τους δόθηκε γιαούρτι ή γάλα . Τα κλινικά πλεονεκτήματα της κατανάλωσης γιαουρτιού ήταν πολύ περισσότερα από αυτά του γάλακτος. Οι Bhan et al. 1987, πρότειναν τα ευεργετικά αποτελέσματα του γιαουρτιού σε αντιπαράθεση με το γάλα σε παιδιά με υποθρεψία και οξεία διάρροια. Έχει αναφερθεί ότι τα LAB επιδρούν ενάντια στα τροφογενή παθογόνα βακτήρια και τις τοξίνες που εκκρίνουν με αποτέλεσμα την πρόκληση διάρροιας στον ξενιστή (Heyman M., 2000; Roos N.M.,et al.,2000).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και αντιφλεγμονώδης δράση

Φαίνεται ότι τα ΖΓΠ μπορεί να έχουν κάποιες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τον PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων). Ο PAF είναι ένας από τους πιο δραστικούς φλεγμονώδεις φωσφολιπιδικούς μεσολαβητές και βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι Antonopoulou et al.(1996) μελέτησαν λιπίδια με PAF και anti-PAF δράση σε αγελαδινό γάλα και γιαούρτι και βρέθηκε ότι τα *Streptococcus*

thermophilus και *Lactobacillus bulgaricus* βιοσυνθέτουν σημαντική ποσότητα PAF αναστολέων (Antonopoulou S., et al.,1996; Heyman M., 2000).

Κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και ρινοπάθεια

Μελέτη που έγινε σε ρινοπαθητικούς ασθενείς απέδειξε ότι η κατανάλωση γιαουρτιού βελτιώνει ή προλαμβάνει αλλεργικά συμπτώματα σε αυτούς τους ασθενείς. Η μελέτη έγινε σε 20 εθελοντές οι 7 εκ των οποίων ήταν υγιείς. Χωρίστηκαν σε ομάδες των 6 ή 7 ρινοπαθητικών ασθενών και για τέσσερις μήνες τους δόθηκε 450γρ./ημέρα γιαουρτιού ή περιστασιακά ίδια ποσότητα άπαχου γάλακτος διατηρώντας παράλληλα τις διατροφικές τους συνήθειες. Εξετάζοντας ανοσοποιητικές και κλινικές παραμέτρους βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα ως προς τις ωφέλειες του γιαουρτιού σε αυτούς τους ασθενείς. (Aldinucci C., et al.; 2002)

1.3 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

Σύμφωνα με τους διεθνείς οργανισμούς FAO, WHO και Codex Alimentarius, ορίζεται ότι το γιαούρτι είναι ένα προϊόν πηγμένου γάλακτος το οποίο υπόκειται σε οξυγαλακτική ζύμωση μέσω της δράσης των βακτηρίων *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί στο τελικό προϊόν πρέπει να είναι βιώσιμοι και σε αφθονία (Food Standarts Codex Alimentarius A-11(b), 1976; Sozzi T, Smiley M.B,1980). Η Γαλλική νομοθεσία ορίζει ότι το γιαούρτι θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10^7 βιώσιμα κύτταρα βακτηρίων ανά γραμμάριο του τροφίμου. (Sozzi T., et al.,1980).

Τα γιαούρτια χωρίζονται σύμφωνα με τη χημική τους σύσταση στις παρακάτω τρεις κατηγορίες:

Πλήρες γιαούρτι

Ελάχιστη σύσταση λιπαρών	3,0% m/m
Ελάχιστη σύσταση μη λιπαρών στερεών συστατικών	8,2% m/m

Ημίπαχο γιαούρτι

Μέγιστη σύσταση λιπαρών	<3,0 m/m
Ελάχιστη σύσταση λιπαρών	>0,5% m/m
Ελάχιστη σύσταση μη λιπαρών στερεών συστατικών	8,2% m/m

Άπαχο γιαούρτι

Μέγιστη σύσταση λιπαρών	0,5% m/m
Ελάχιστη σύσταση μη λιπαρών στερεών συστατικών	8,2% m/m

Υπάρχουν ,βέβαια, και γιαούρτια που περιέχουν γλυκαντικές ουσίες και φρούτα.

Κριτήρια έχουν οριστεί και ως προς την ετικέτα της συσκευασίας του γιαουρτιού, δηλαδή την σήμανση του προϊόντος και αφορά τα εξής χαρακτηριστικά: (Food Standards Codex Alimentarius A-11(b)-1976; Μπόσκου Γ., 2005)

Όνομα προϊόντος

Το όνομα του γιαουρτιού ορίζεται σύμφωνα με την παραπάνω κατηγοριοποίηση σε πλήρες , ημίπαχο , άπαχο και φρουτώδες .Επίσης πρέπει να αναγράφεται και η περιεκτικότητα σε λίπος. Υποχρεωτική είναι και η αναγραφή της ζωϊκής προέλευσης του γάλακτος που χρησιμοποιείται (αγελαδινό , πρόβειο).

Λίστα συστατικών

Σε αυτή τη λίστα θα πρέπει να αναγράφονται τα συστατικά που περιέχει συγκεκριμένη μερίδα του γιαουρτιού(π.χ. υδατάνθρακες , πρωτεΐνες , λίπη, ιχνοστοιχεία , βιταμίνες κ.λ.π.).

Βάρος προϊόντος

Στην ετικέτα πρέπει να αναγράφεται το καθαρό βάρος του γιαουρτιού που περιέχεται στην συγκεκριμένη συσκευασία. Οι μονάδες μέτρησης θα πρέπει να ακολουθούν το Διεθνές Σύστημα (U.S.) ή Βρετανικές μονάδες .

Όνομα και διεύθυνση

Θα πρέπει να αναφέρεται το όνομα , η διεύθυνση και κάποιες φορές το τηλέφωνο του παρασκευαστή ή του αποκλειστικού αντιπροσώπου διανομής.

Χώρα παραγωγής

Η χώρα παραγωγής πρέπει να αναγράφεται σε περιπτώσεις εξαγωγής του προϊόντος .

Ημερομηνία

Υποχρεωτική είναι η αναγραφή της ημερομηνίας παρασκευής καθώς και η ημερομηνία λήξης του γιαουρτιού για μεγαλύτερη ασφάλεια του καταναλωτή.

Συνολική ταυτότητα

Κάθε εμπορευματοκιβώτιο πρέπει να φέρει έναν κωδικό που υποδηλώνει την ταυτότητα του εργοστασίου παραγωγής καθώς και τον κωδικό της παρτίδας (barcode).

Η εξουσιοδοτημένη αρχή στην Ελλάδα αναφέρει ότι ένας ξεκάθαρος ορισμός του γιαουρτιού δίνεται μόνο σε προϊόντα που περιέχουν ζωντανά , ενεργά και σε αφθονία κύτταρα των βακτηρίων *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Επίσης μόνο φυσικά υλικά πρέπει να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γιαουρτιού δηλαδή όχι άλλα υλικά εκτός του γάλακτος.(FAO:AGENTA ITEM 5)

1.4 ΖΥΜΩΜΕΝΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η σύγχρονη παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος, στηρίζεται στην πλειοψηφία της, σε εμβολιασμό με καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων (καλλιέργειες εκκίνησης), για την διεξαγωγή της γαλακτικής ζύμωσης.

Η προσεκτική επιλογή των ειδών είναι σημαντική για τη διατήρηση της ταυτότητας του κάθε προϊόντος. Η εκδήλωση των επιθυμητών χαρακτηριστικών εξαρτάται από την παροχή των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης για τους μικροοργανισμούς και μια από τις πιο σημαντικές είναι η θερμοκρασία.

Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των προϊόντων γάλακτος είναι αποτέλεσμα των εξής παραγόντων:

- Τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό (στέλεχος) που θα χρησιμοποιηθεί ως καλλιέργεια εκκίνησης.
- Τις ακριβείς συνθήκες που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

- Τη σύσταση και την επεξεργασία του γάλακτος (Robinson R.K., Tamine A.Y., et al.; 2002).

Οι σημαντικότερες λειτουργίες των μικροβιακών καλλιιεργειών στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι (Tamine A.Y.; 2002):

- Να προστατεύσουν από πιθανόν παθογόνους μικροοργανισμούς το προϊόν μέσω της ζύμωσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ενίσχυση της ασφάλειας του προϊόντος.
- Να ενισχύουν τα διακριτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος με την παραγωγή οργανικών οξέων και την μερική υδρόλυση των πρωτεϊνών και των λιπών.
- Να βελτιώνουν το χρώμα και την παραγωγή αερίου σε ορισμένες περιπτώσεις.
- Να συνεισφέρουν στις διατροφικές ιδιότητες κάποιων προϊόντων με την χρήση προβιοτικών στελεχών.

1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

Για την παραγωγή του παραδοσιακού γιαουρτιού χρησιμοποιούνται βακτήρια του γαλακτικού οξέος που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και *Streptococcus*.

Το 1910 για πρώτη φορά ο Metchnikoff έθεσε ως δεδομένο ότι η προέλευση του γιαουρτιού εξαρτάται από την παρουσία ενός συγκεκριμένου βακτηρίου, του *Bulgarian bacillus*. Ο ίδιος μικροοργανισμός μετονομάστηκε σε *Thermobacterium bulgaricus* από την Orla-Jensen (1931) και έχει αναγνωριστεί ως *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Robinson R.K., et al.; 2002).

Παρόλο που η χρήση του *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, ως καλλιέργεια εκκίνησης για την παραγωγή γιαουρτιού, είναι σχεδόν υποχρεωτική παρατηρείται η περιστασιακή χρήση του *L. delbrueckii subsp. lactis* πιθανόν επειδή η ταξινομική σχέση των δύο μικροοργανισμών είναι πολύ κοντινή.

Οι οργανισμοί όμως που σχετίζονται με την παραγωγή γιαουρτιού είναι περιοριστικά τα *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* και *Strep. thermophilus*.

Ο τελευταίος έχει ταξινομηθεί ως *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* επειδή η ομολογία του DNA ανάμεσα στα είδη *S. salivarius* και *S. thermophilus* έχει βρεθεί σε ποσοστό 75-97% (Kilpper-Balz et al., 1982; Farrow and Collins, 1984). Ωστόσο αυτά τα γενετικά δεδομένα δεν υποστηρίχτηκαν από μεγάλο αριθμό ταξινομικών μελετών και έτσι οι περισσότερες πηγές έχουν επιστρέψει στην παλιά ονοματολογία του *S. thermophilus* (Bridge and Sneath , 1983; Hardie and Wiley , 1995).

Το *S. thermophilus* είναι Gram- θετικό βακτήριο με σφαιρικό/ωοειδές κύτταρο 0,7-0,9μm διάμετρο. Εμφανίζεται στο γάλα σε μακριές αλυσίδες των 10-20 κύτταρων και με τη ζύμωση της λακτόζης δίνει L(+) γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν σε ποσότητα 10g για κάθε λίτρο του γιαουρτιού. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37⁰C αερόβια. (Robinson R.K., et al.;2002).

Το *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* είναι επίσης Gram- θετικό βακτήριο αλλά στο γάλα εμφανίζεται σε αλυσίδες των τριών με τεσσάρων ραβδίων (βάκιλλοι) με στρογγυλό τελείωμα και διαστάσεις 0,5-0,8*2,9-9,0 μm. Το προϊόν του βασικού μεταβολισμού του είναι το D(-)γαλακτικό οξύ σε ποσότητα περίπου 18g για κάθε λίτρο του γιαουρτιού. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 45⁰C αναερόβια. Σε ορισμένα γιαούρτια μαζί με τους παραπάνω δύο μικροοργανισμούς προσθέτονται και βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* για τη δημιουργία των λεγόμενων βιολογικών – προβιοτικών γιαουρτιών.

Η ταξινομική κατάσταση και η ονοματολογία αυτών των βακτηρίων έχει μεταβληθεί με την βοήθεια των νέων ταξινομικών μοριακών εργαλείων. Ενώ, λοιπόν, ήταν ταξινομημένα ως *Lactobacillus* spp. στην τελευταία έκδοση του Bergey's Manual οι ίδιοι οργανισμοί συγκεντρώνονται σε ξεχωριστό γένος , το γένος *Bifidobacterium*. Παρότι απομονώθηκαν 30 διαφορετικά είδη του γένους *Bifidobacterium* μόνο έξι παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis* , *B. lactis* , *B. longum*.

Τα βακτήρια αυτά είναι Gram- θετικοί, υποχρεωτικά αναερόβιοι μη σπορογόνοι πλειομορφικοί βάκιλλοι με διαστάσεις των κυττάρων 0,5-1,5*1,5-8μm. Οι βάκιλλοι αυτοί παρουσιάζουν πολύ χαρακτηριστικό σχήμα V ή Y ή X, γεγονός στο οποίο οφείλουν το όνομά τους (δισχιδή βακτήρια) (Tamine A.Y., et al.;2002).

1.6 ΖΥΜΩΣΗ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

Η συνεργιστική αλληλεπίδραση των δυο μικροοργανισμών ως καλλιέργειες ζύμωσης στο γιαούρτι είναι σημαντική και δίνει στο γιαούρτι έναν διακριτό χαρακτήρα. Έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή του γαλακτικού οξέος από την μικτή καλλιέργεια των δύο ειδών είναι σημαντικά μεγαλύτερη από το άθροισμα των παραγωγών του κάθε είδους χωριστά (Tamine and Robinson ,1999). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε τους Pette and Lolkema (1950a,b) να θέσει ως δεδομένο τη συνεργιστική σχέση μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Έτσι είναι ευρύτατα αποδεκτό ότι (Robinson R.K., et al.; 2002):

- Η πρωτεολυτική δράση του *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* απελευθερώνει πεπτίδια και σε μικρότερο ποσοστό, αμινοξέα που μπορούν να μεταβολιστούν από το *S.thermophilus*.
- Οι πεπτιδάσες του *S.thermophilus* δρουν στα πεπτίδια και απελευθερώνουν αμινοξέα που χρησιμοποιούνται από το *L.delbrueckii subsp.bulgaricus*.

Μερικές αλλαγές που εμφανίζονται κατά την παραγωγή γιαουρτιού ως αποτέλεσμα της δράσης των καλλιιεργειών που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι (Robinson R.K., et al.; 2002):

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ: Η λακτόζη υδρολύεται μέσα στο βακτηριακό κύτταρο από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Το τελευταίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή των D(-) και L(+) γαλακτικού οξέος. Το σύμπλεγμα του ασβεστίου-φωσφόρου σταθεροποιείται από το γαλακτικό οξύ και αυτό οδηγεί στην πήξη του γιαουρτιού. Η γεύση και οσμή του γιαουρτιού προέρχονται από προϊόντα ζύμωσης των σακχάρων του γάλακτος όπως ακεταλδεύδη , ακετόνη , ακετοίνη και διακετύλιο σε συγκέντρωση $2,4-41\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $1,0-4,0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $2,5-4,0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,4-13,0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ αντίστοιχα.

ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ: Οι καλλιέργειες των γιαουρτιών είναι ελάχιστα πρωτεολυτικές και τα πεπτίδια και τα αμινοξέα που παράγονται δρουν ως πρόδρομοι για τις ενζυμικές και χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στις παραπάνω αρωματικές ενώσεις. Τα ελεύθερα αμινοξέα στο γιαούρτι ποικίλουν σε συγκέντρωση από 23,6 με 70mg 100ml⁻¹.

ΛΙΠΟΛΥΣΗ Η λιπόλυση γίνεται σε κάποιο βαθμό από τα βακτήρια των καλλιιεργειών και τα τελικά προϊόντα συμβάλουν σημαντικά στη γεύση και οσμή του

γιαουρτιού. Οι λιπάσες των καλλιεργειών δρουν κυρίως στα τριγλυκερίδια μικρής αλύσου.

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ Η οξύτητα στο γιαούρτι μπορεί να φτάσει τα $7,5 \text{ meq Kg}^{-1}$ κυρίως ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του *L.delbrueckii subsp.bulgaricus* . Επίσης έχουμε αύξηση στη νιασίνη και το φολικό οξύ κατά τη ζύμωση ενώ τα επίπεδα των βιταμινών B12 , θειαμίνης , ριβοφλαβίνης και παντοθενικού οξέος μειώνονται.

ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Γενικά τα στάδια παραγωγής του γιαουρτιού αποτελούνται από την προκαταρτική επεξεργασία του γάλακτος (τυποποίηση των λιπών και ενίσχυση των στερεών μη λιπών<SNF>), την ομογενοποίηση, τη θερμική επεξεργασία, τη ψύξη, τη ζύμωση, τη ψύξη ξανά, την προσθήκη φρούτων (σε γιαούρτια με φρούτα), συσκευασία και αποθήκευση σε κρύο περιβάλλον (Robinson R.K., et al.; 2002).

Μετά την ψύξη του επεξεργασμένου γάλακτος στους 30°C με 40°C γίνεται εμβολιασμός με τις καλλιέργειες εκκίνησης για να ζυμώσουν το γάλα. Η ζύμωση γίνεται σε βιοαντιδραστήρες που αποτελούνται από μεγάλες δεξαμενές σε $\text{pH}>5,7$. Πριν όμως τον εμβολιασμό πρέπει να γίνει ο απαραίτητος έλεγχος των καλλιεργειών. Αυτό περιλαμβάνει την επώαση σε εκλεκτικά υλικά , απομόνωση και παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών τους. Επίσης γίνεται έλεγχος απουσίας επιμόλυνσης με τη δοκιμή της αντίδρασης της καταλάσης. Η παρουσία φυσαλίδων αερίου είναι ένδειξη επιμόλυνσης. Η εξέταση για επιμόλυνση αφορά τόσο την προστασία των καταναλωτών από παθογόνα είδη βακτηρίων όσο και την σιγουριά ότι τα υλικά δεν θα αλλοιωθούν κατά τη διάρκεια της προβλέψιμης ημερομηνίας ζωής .Αυτά τα ζητήματα είναι ζωτικής σημασίας για κάθε εταιρεία. (Robinson R.K., et al.; 2002).

1.7 ANTIBIOTIKA

ΙΣΤΟΡΙΚΑ

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που παράγονται από μικροοργανισμούς, κυρίως μύκητες, αλλά και ορισμένα βακτήρια. Ανακαλύφθηκαν το 1929 όταν ένας Άγγλος γιατρός ο Alexander Fleming, παρατήρησε ότι ένας μύκητας του γένους *Penicillium*, ο οποίος είχε επιμολύνει μία βακτηριακή καλλιέργεια παρουσίαζε ζώνη παρεμπόδισης της βακτηριακής αύξησης. Η ανακάλυψη της ουσίας με την αντιμικροβιακή δράση, του πρώτου δηλαδή, αντιβιοτικού που ονομάστηκε πενικιλίνη, έφερε επανάσταση στον αγώνα για την καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων. Η τοξική δράση των αντιβιοτικών οφείλεται στην ικανότητά τους να εμποδίζουν κάποια ειδική βιοχημική αντίδραση του βακτηριακού κυττάρου. Η πενικιλίνη για παράδειγμα εμποδίζει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. (Αργύρης Ι., και συν. 1992)

ΧΡΗΣΗ ANTIBIOTIKΩN

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σήμερα στην ιατρική και κτηνιατρική για τη θεραπεία και πρόληψη ασθενειών. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης, για την προώθηση της γεωργικής παραγωγής και την ανάπτυξη των ζώων κτηνοτροφίας. Η τελευταία αυτή χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία πιστεύεται ότι συμβάλλει στην εμφάνιση και εξάπλωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων στελεχών, από τα γένη *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Campylobacter* και *Clostridium* από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας ή άμεσης επαφής. (Sorum H., L'Abée-Lund T.M. , 2002).

Οι κτηνοτροφικές μονάδες αποτελούν το χώρο όπου η χρήση των αντιβιοτικών είναι σύνηθες φαινόμενο. Σε αυτές εμφανίζονται βακτήρια του γαλακτικού οξέος με επίκτητη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικούς παράγοντες. Αυτά μεταφέρονται μέσω των πρώτων υλών (γάλα, κρέας) στα προϊόντα ζύμωσης (γιαούρτι, τυρί, αλλαντικά) και τελικά στην εντερική μικροχλωρίδα των καταναλωτών. Το γεγονός αυτό συνιστά ένα μείζον θέμα ασφάλειας τροφίμων. Επίσης, η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στα νοσοκομεία συμβάλλει στην εμφάνιση οξυγαλακτικών βακτηρίων με επίκτητη

ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά όπως στελέχη του γένους *Enterococcus* (Teuder M., 1999).

Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών τα τελευταία 50 χρόνια έχει οδηγήσει σε οικολογική ανησυχία με την εμφάνιση και διάδοση ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά που μπορεί να είναι παθογόνα και μη παθογόνα (Teuder M., et al.; 1999). Τα τρόφιμα είναι το σημαντικότερο μέσο με το οποίο τα παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια εισβάλλουν στον οργανισμό. Έντονο είναι λοιπόν το ενδιαφέρον, ως προς τη μελέτη της ανθεκτικότητας – ευαισθησίας στα αντιβιοτικά μη παθογόνων στελεχών όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκινητές για τη ζύμωση προϊόντων γάλακτος όπως είναι το γιαούρτι και το τυρί (Sorum H., L’Abee-Lund T.M. , 2002).

ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικούς παράγοντες μπορεί να είναι ενδογενής ή επίκτητη. Η ενδογενής ανθεκτικότητα εντοπίζεται στο κομμάτι του γενετικού υλικού που έχει αποδειχτεί ότι δεν μεταφέρεται σε άλλα βακτήρια, ενώ αντίθετα η επίκτητη ανθεκτικότητα εντοπίζεται στο κομμάτι του γενετικού υλικού που μπορεί να μεταφερθεί σε παθογόνα και μη βακτήρια μέσω της οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Franz C.M.A.P., et al., 1999).

Οι κυριότεροι μηχανισμοί μεταφοράς ανθεκτικότητας που έχουν περιγραφεί είναι: μετατόπιση γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαφορετική θέση του ίδιου βακτηριακού γονιδιώματος, οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας τόσο ανάμεσα σε βακτήρια του ίδιου είδους όσο και ανάμεσα σε είδη και γένη π.χ. μέσω σύζευξης με την οποία ανταλλάσσεται μέσω των βακτηριακών κυττάρων γενετικό υλικό, με τη μορφή πλασμιδίων, μεταθετών στοιχείων DNA και εσονίων (Sorum H., L’Abee-Lund T.M., 2002; Barton M.D., 2000).

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, θεωρούνται ομάδα που δεν περιέχει σημαντικά παθογόνα, αλλά αντίθετα περιέχει βακτηριακά είδη τα οποία χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στην Βιομηχανία Τροφίμων (ζυμώσεις) Επίσης αποτελούν μέλη της

φυσικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην άμυνα του (Madigan M. Et al., 1997)

Από την στιγμή που έγινε κατανοητό, ότι μπορεί να επιτευχθεί οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού το οποίο κωδικοποιεί τις πληροφορίες για την εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι σε κάποια αντιβιοτική ουσία, τέθηκαν στο μικροσκόπιο τα βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα, ως πιθανοί φορείς τέτοιων μορφών εξωχρωμοσωμικού κυρίως υλικού. Είναι γνωστό ότι την μεγαλύτερη ποσότητα μικροοργανισμών την δεχόμαστε μέσω των τροφίμων. Ιδιαίτερα τα ζυμωμένα τρόφιμα διαθέτουν μικροβιακούς πληθυσμούς που ξεπερνούν τα 10^7 - 10^8 κύτταρα ανά γραμμάριο τροφίμου. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίρνουν μέρος σε ζυμώσεις πολύ διαδεδομένων τροφίμων όπως είναι γαλακτοκομικά, αλλαντικά και φυτικά προϊόντα. Η υπόθεση λοιπόν της εμφάνισης κάποιων γονιδίων ανθεκτικότητας στα βακτήρια αυτά, τα οποία δεχόμαστε σε πολύ μεγάλες ποσότητες μέσω των τροφίμων και η συνύπαρξή τους με κάποια παθογόνα στο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα, μπορεί να διευκολύνει την μεταφορά των πληροφοριών αυτών στα παθογόνα στελέχη. Ιδιαίτερη σημασία εμφανίζει το φαινόμενο αυτό, όταν αφορά ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες, όπως είναι οι ηλικιωμένοι, τα παιδιά ή οι άνθρωποι που παρουσιάζουν μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος.

Το τελευταίο διάστημα ξεκίνησε έρευνα σε διεθνές επίπεδο για τον έλεγχο της συμπεριφοράς απέναντι στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών που παίρνουν μέρος στις ζυμώσεις των τροφίμων.

Σε έλεγχο 55 ευρωπαϊκών προβιοτικών προϊόντων έγινε ταυτοποίηση και έλεγχος ως προς την ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν. Απομονώθηκαν συνολικά 187 στελέχη και μελετήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε έξι αντιβιοτικά: kanamycin(30μg), vancomycin(30μg), erythromycin(10μg), tetracycline(30μg), chloramphenicol(30μg) και penicillinG(10μg). Υψηλή ανθεκτικότητα εμφάνισαν στην kanamycin(79%) και την vancomycin(65%). Τα περισσότερα στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην kanamycin ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και στο γένος *Enterococcus* (Temmerman R., et al.; 2002).

Οι εντερόκοκκοι οι οποίοι αποτελούν μέλη της φυσικής μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου, παίρνουν μέρος σε ζυμώσεις τροφίμων, αλλά είναι επίσης ευκαιριακά παθογόνα, τα οποία απομονώνονται από νοσοκομειακές λοιμώξεις. Έχει παρατηρηθεί ότι οι εντερόκοκκοι τόσο ενδογενή ανθεκτικότητα σε κάποια αντιβιοτικά, όπως μεταξύ άλλων και στις σουλφοναμίδες, β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες. Παρουσιάζουν

όμως και επίκτητη ανθεκτικότητα σε αρκετά αντιβιοτικά, όπως είναι τα γλυκοπεπτίδια (Franz CMAP et al.;1999).

Επίσης υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι στελέχη του γένους *Lactobacillus* είναι ενδογενώς ανθεκτικά στην vancomycin (Nelson, 1999). Μάλιστα, κάποιοι ερευνητές θεωρούν ότι το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με το είδος των λακτοβακίλλων (Hamilton-Miller JMT and Shah S, 1998).

Σε άλλη έρευνα εξετάστηκαν 29 στελέχη *Lactobacillus bulgaricus* και 15 στελέχη *Streptococcus thermophilus*, που απομονώθηκαν από γιαούρτια, για ανθεκτικότητα σε 35 αντιμικροβιακούς παράγοντες (Sozzi T. and Smiley M.B.; 1980). Τα περισσότερα στελέχη των *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* ήταν ανθεκτικά στην neomycin(5μg) και polymyxin B(300U) τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της μαστίτιδας στα ζώα. Αναλυτικότερα, για το *Streptococcus thermophilus* ένας μεγάλος αριθμός στελεχών εμφάνισε ανθεκτικότητα στα εξής αντιβιοτικά τα οποία επίσης χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μαστίτιδας: dihydrostreptomycin, fyradantin, novobiocin, cloxacillin, oleandomycin, oxacillin. Για τα στελέχη του *Lactobacillus bulgaricus* η μελέτη έδειξε ότι στα περισσότερα στελέχη ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στα εξής αντιβιοτικά: neomycin(5, 30μg), polymyxin B(300U), novobiocin, lincomycin και doxycycline. Με εξαίρεση το τελευταίο όλα τα υπόλοιπα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της μαστίτιδας.

Σε μελέτη που περιελάμβανε 46 στελέχη του γένους *Lactobacillus*, τα οποία απομονώθηκαν από το γαστρεντερικό σωλήνα ανθρώπων και από γαλακτοκομικά προϊόντα, εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους απέναντι σε 44 αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα εξής αντιβιοτικά: cefoxitin(30μg), aztreonam(30μg), amikacin(30μg), gentamicin(10μg), kanamycin(30μg), streptomycin(10μg), norfloxacin(30μg), nalidixin acid(30μg), sulphamethoxazole(100μg), trimethoprim(5μg), co-trimoxazole(5μg), metronidazole(5μg), polymyxin B(300μg) και colistin sulphate(10μg) (Charteris W.P, et al.; 1998).

Αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα μελετήθηκε σε βακτήρια του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από ένα είδος Ισπανικού τυριού. Συνολικά απομονώθηκαν 146 στελέχη που ανήκουν στα γένη: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* και *Leuconostoc*. Όλοι τα στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ήταν ανθεκτικά σε υψηλά επίπεδα βανκομυκίνης. Επίσης κάποια στελέχη *Lactococcus*

lactis, *Enterococcus* spp. και *Lactobacillus* spp. ήταν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά : erythromycin, chloramphenicol, clindamycin ή tetracycline (Florez A.B., et al.; 2005). Ανθεκτικότητα βρέθηκε και σε στελέχη των *Bifidobacterium longum* και *L. diacetylactis* που απομονώθηκαν από προβιοτικά προϊόντα. Συγκεκριμένα για το *B. longum* βρέθηκε ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ampicillin, bacitracin, erythromycin, neomycin, penicillin, vancomycin και chloramphenicol ενώ για το *L. diacetylactis* στα αντιβιοτικά ampicillin, bacitracin, neomycin, penicillin, vancomycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, polymyxin B, chloramphenicol και gentamycin. (Doleyres Y., et al. ; 2003).

1.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Η Θεσσαλία θεωρείται μία από τις κυριότερες κτηνοτροφικές περιοχές της χώρας μας. Τα στατιστικά στοιχεία που ακολουθούν αφορούν το χρονικό έτος 2004 και παρουσιάζονται στους Πίνακες που ακολουθούν για κάθε νομό του διαμερίσματος. Τα ζώα παραγωγής γάλακτος είναι τα βοοειδή, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την ηλικία των ζώων (>12 μηνών και <12 μηνών), οι αμιγείς εκτροφές προβάτων, οι αμιγείς εκτροφές αιγών και οι μικτές εκτροφές αιγοπροβάτων. Τα στοιχεία προέρχονται από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων- Παραγωγικοί Κλάδοι (<http://www.ypge.gr/scripts/zoa-nomo.pl.cgi?nomos=26>).

ΝΟΜΟΣ ΛΑΡΙΣΗΣ

Είδος Ζώου	Κατηγορία Ζώου	Μονάδες Εκμετάλλευσης (εκτροφές)	Αριθμός Ζώων
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	255	10628
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	(συμπεριλαμβάνεται στις παραπάνω μονάδες)	2437
Πρόβατα		3430	467827
Αίγες		1032	183018
Αιγοπρόβατα		558	138794

ΝΟΜΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ

Είδος Ζώου	Κατηγορία Ζώου	Μονάδες Εκμετάλλευσης (εκτροφές)	Αριθμός Ζώων
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	98	1991
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	(συμπεριλαμβάνεται στις παραπάνω μονάδες)	602
Πρόβατα		558	64632
Αίγες		539	86112
Αιγοπρόβατα		447	61935

ΝΟΜΟΣ ΤΡΙΚΑΛΩΝ

Είδος Ζώου	Κατηγορία Ζώου	Μονάδες Εκμετάλλευσης (εκτροφές)	Αριθμός Ζώων
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	99	2325
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	0 (συμπεριλαμβάνεται στις παραπάνω μονάδες)	781
Πρόβατα		1815	161760
Αίγες		467	65840
Αιγοπρόβατα		760	87860

ΝΟΜΟΣ ΚΑΡΑΙΤΣΑΣ

Είδος Ζώου	Κατηγορία Ζώου	Μονάδες Εκμετάλλευσης (εκτροφές)	Αριθμός Ζώων
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	380	2412
Βοοειδή γαλακτοπαραγωγής	Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής>12μηνών	(συμπεριλαμβάνεται στις παραπάνω μονάδες)	742
Πρόβατα		2333	142259
Αίγες		566	22388
Αιγοπρόβατα		741	80883

ΣΚΟΠΟΣ

Το γιαούρτι κατέχει υψηλή θέση κατανάλωσης στον Ελληνικό πληθυσμό. Σκοπός της παρούσης εργαστηριακής εργασίας είναι ο έλεγχος ως προς τα οξυγαλακτικά βακτήρια (είδη, πληθυσμοί) γιαουρτιών από μικρές παραγωγές του Διαμερίσματος της Θεσσαλίας, περιοχής κατεξοχήν κτηνοτροφικής. Επίσης τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε αντιβιοτικούς παράγοντες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΔΕΙΓΜΑ- ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα της εργαστηριακής εργασίας για την ανθεκτικότητα των γαλακτικών βακτηρίων σε αντιβιοτικά αποτελείται από είκοσι γιαούρτια από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Θεσσαλίας(Λάρισα, Βόλος , Καρδίτσα , Τρίκαλα).Η προμήθεια των δειγμάτων έγινε ύστερα από έρευνα στην τοπική αγορά της Θεσσαλίας και τις πληροφορίες που μας έδωσε το Επιμελητήριο Λάρισας ως προς τις τοπικές παραγωγές γιαουρτιού.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προετοιμασία δείγματος

Όλα τα δείγματα ελέγχονται και αναλύονται πριν από την ημερομηνία λήξης. Η μεταφορά των δειγμάτων γίνεται πάντα σε συνθήκες ψύξης, έτσι ώστε να μην υπάρχουν αλλοιώσεις των δειγμάτων.

Για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών ακολουθείται η μέθοδος της επίστρωσης σε εκλεκτικά υποστρώματα γνωστού όγκου του δείγματος, το οποίο έχει υποστεί διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε κατάλληλο μέσο. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Ζυγίζεται 1γρ. του προϊόντος και εάν το γιαούρτι είναι πρόβειο, πριν ζυγίσουμε αφαιρούμε την πέτσα και κατόπιν παίρνουμε δείγμα. Η διαδικασία γίνεται γρήγορα με καθαρή σπάτουλα η οποία έχει περαστεί με οινόπνευμα. Το δείγμα γιαουρτιού τοποθετείται σε φιαλίδιο Mc-Cartney με 9 ml αποστειρωμένο διάλυμα PPS (10^{-1}). Αναδεύουμε προσεκτικά το φιαλίδιο ώστε να διαλυθεί το δείγμα και ακολουθούν δεκαδικές αραιώσεις μέχρι την αραιώση 10^{-6} υπό ασηπτικές συνθήκες. Το μέσο αραιώσης είναι το υλικό PPS (H₂O απιονισμένο, 0,1% bacteriological peptone, 0,85% κ.β. NaCl).

Καταμέτρηση πληθυσμού *Streptococcus* spp. , *Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp.

A) *Streptococcus* spp

Από τις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} μεταφέρουμε με αυτόματο σιφώνιο όγκο 0,1ml και κάνουμε επίστρωση σε τρυβλία με εκλεκτικό υλικό M17 AGAR (OXOID) (Manopoulou E., et al.; 2002). Για κάθε αραιώση γίνονται 3 επαναλήψεις. Στην συνέχεια με ειδικά διαμορφωμένη γυάλινη ράβδο επιστρώνουμε τον όγκο του δείγματος, έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του τρυβλίου. Για την παρασκευή του υλικού διαλύουμε 48,25g M17 σε 950ml απιονισμένο νερό και αποστειρώνουμε σε 121°C για 15 min. Μετά από την αποστείρωση και αφού η θερμοκρασία του διαλύματος είναι περίπου $45-50^{\circ}\text{C}$, προσθέτουμε 50 ml διαλύματος λακτόζης 10% κ.β., το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση, διότι είναι θερμοευαίσθητο. Στην συνέχεια μοιράζουμε το υλικό στα τρυβλία. Τα τρυβλία επωάζονται για 48ώρες στους 30°C αερόβια. Μετά την επώαση παρατηρούμε τις αποικίες στο στερεοσκόπιο και καταγράφουμε τη μορφή της κάθε διαφορετικής αποικίας που εμφανίστηκε. Ο χαρακτηρισμός των αποικιών σύμφωνα με τη μορφολογία τους παρουσιάζεται στην αντίστοιχη Εικόνα στο Παράρτημα. Οι διαφορετικοί τύποι αποικιών ελέγχονται ως προς την δοκιμή της καταλάσης και στην συνέχεια γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram. Οι στρεπτόκοκκοι πρέπει να είναι αρνητικοί ως προς την καταλάση και η μορφολογία των κυττάρων τους είναι: κόκκοι σε ζεύγη ή/και σε αλυσίδες, Gram θετικοί. Στο τέλος γίνεται καταμέτρηση των αποικιών που παρουσιάζουν αυτά τα χαρακτηριστικά.

B) *Lactobacillus* spp

Αντίστοιχα για το γένος *Lactobacillus*, μεταφέρουμε με αυτόματο σιφώνιο όγκο 0,1ml από τις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} και κάνουμε επίστρωση σε τρυβλία με εκλεκτικό υλικό MRS AGAR (OXOID) (Manopoulou E., et al.; 2002). Για κάθε αραιώση γίνονται 3 επαναλήψεις. Στην συνέχεια με ειδικά διαμορφωμένη γυάλινη ράβδο επιστρώνουμε τον όγκο του δείγματος, έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του τρυβλίου. Για την παρασκευή του υλικού διαλύουμε 62g MRS σε 1000ml απιονισμένο νερό και αποστειρώνουμε σε 121°C για 15 min. Στην συνέχεια μοιράζουμε το υλικό στα τρυβλία. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C

για 48 ώρες, αναερόβια. Μετά την επώαση παρατηρούμε τις αποικίες στο στερεοσκόπιο και καταγράφουμε τη μορφή της κάθε διαφορετικής αποικίας που εμφανίστηκε. Οι διαφορετικοί τύποι αποικιών ελέγχονται ως προς την δοκιμή της καταλάσης και στην συνέχεια γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram. Οι λακτοβάκιλλοι πρέπει να είναι αρνητικοί ως προς την καταλάση και η μορφολογία των κυττάρων τους είναι: βάκιλλοι ή κοκκο-βάκιλλοι διαφορετικού μήκους, Gram θετικοί. Στο τέλος γίνεται καταμέτρηση των αποικιών που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Γ) *Bifidobacterium* spp.

Όμοια για το γένος *Bifidobacterium*, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το εκλεκτικό υλικό είναι το modified MRS AGAR (OXOID) (Temmerman R., et al.;2002). Για την παρασκευή του υλικού διαλύουμε 62g MRS και 0,05% κ.β. υδροχλωρική κυστεΐνη σε 1000ml απιονισμένο νερό και στην συνέχεια αποστειρώνουμε στους 121 °C για 15 min. Η υδροχλωρική κυστεΐνη χρησιμοποιείται ως αναγωγικός παράγοντας στο υπόστρωμα, διότι τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι υποχρεωτικά αναερόβια. Επίσης το υπόστρωμα αυτό παρασκευάζεται μέχρι 24 ώρες πριν από τον εμβολιασμό έτσι ώστε να είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών. Η επώαση γίνεται στους 37°C αναερόβια για 72 ώρες. Μετά την επώαση παρατηρούμε τις αποικίες στο στερεοσκόπιο και καταγράφουμε τη μορφή της κάθε διαφορετικής αποικίας που εμφανίστηκε. Οι διαφορετικοί τύποι αποικιών ελέγχονται ως προς την δοκιμή της καταλάσης και στην συνέχεια γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram. Τα μπιφιδοβακτήρια πρέπει να είναι αρνητικά ως προς την καταλάση και η μορφολογία των κυττάρων τους είναι: βάκιλλοι πλειομορφικοί ή κοκκο-βάκιλλοι διαφορετικού μήκους, με το χαρακτηριστικό δισχιδές σχήμα Y ή X και Gram θετικοί. Στο τέλος γίνεται καταμέτρηση των αποικιών που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Απομόνωση και συντήρηση των στελεχών

A) *Streptococcus* spp

Για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας απομονώνονται 6 αποικίες οι οποίες μεταφέρονται με γραμμική διασπορά σε τρυβλία με υπόστρωμα M17. Με την γραμμική διασπορά απομονώνουμε καθαρά στελέχη διότι έχουμε την δυνατότητα εμφάνισης μεμονωμένων αποικιών. Τα τρυβλία επωάζονται για 48 ώρες στους 30°C αερόβια. Στην συνέχεια γίνεται παρατήρηση στο στερεοσκόπιο της μορφολογίας των αποικιών, γίνεται η δοκιμή της καταλάσης, χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η καθαρότητα των καλλιιεργειών.

Ακολουθεί εμβολιασμός σε σωλήνες με υγρό υπόστρωμα M17 BROTH (OXOID). Σε κάθε σωλήνα εμβολιάζεται από μία μεμονωμένη αποικία. Οι σωλήνες επωάζονται για 48 ώρες στους 30°C αερόβια. Το υγρό υπόστρωμα παρασκευάζεται ως εξής: 37,25g M17 broth διαλύονται σε 950ml απιονισμένο νερό και μοιράζονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες (2,85ml ανά δοκιμαστικό σωλήνα). Οι σωλήνες αποστειρώνονται και στην συνέχεια αφού κρυώσει το υλικό προστίθεται σε κάθε σωλήνα 0,15ml διαλύματος λακτόζης 10% κ.β., τα οποία έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Μετά από την επώαση και αφού διαπιστωθεί η πλούσια ανάπτυξη των καλλιιεργειών μεταφέρεται όγκος 0,90ml από την κάθε υγρή καλλιέργεια σε αποστειρωμένο eppendorf. Προσθέτουμε επίσης 0,40ml αποστειρωμένης γλυκερόλης και αναδεύουμε με το σιφόνιο προσεκτικά έτσι ώστε να αναμειχθεί πλήρως η γλυκερόλη με την υγρή καλλιέργεια. Για κάθε στέλεχος δημιουργούμε 2 eppendorf (stock καλλιέργειες) τα οποία τοποθετούμε στους -80°C για να διατηρηθούν.

B) *Lactobacillus* spp

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα στελέχη *Lactobacillus* spp. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την γραμμική διασπορά είναι το MRS AGAR (LABM) και για τις υγρές καλλιέργειες το MRS BROTH (LABM). Για το MRS agar διαλύουμε 70g MRS σε απιονισμένο νερό και αποστειρώνουμε (121°C για 15 min). Για το MRS broth διαλύουμε 55g MRS σε απιονισμένο νερό, μοιράζουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (7ml) και αποστειρώνουμε (121°C για 15 min). Στον κάθε σωλήνα τοποθετείται και ένας μικρός σωλήνας Durham, ο οποίος επιτρέπει την δέσμευση αερίου που τυχόν παράγεται κατά την ζύμωση των σακχάρων του υποστρώματος από

τον μικροοργανισμό. Οι συνθήκες επώασης είναι 37°C αναερόβια για 48 ώρες. Η συντήρηση των λακτοβακίλλων γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα γλυκερόλης, στους -80°C.

Γ) *Bifidobacterium* spp.

Ομοίως και για τα στελέχη *Bifidobacterium* ακολουθείται η ίδια διαδικασία απομόνωσης με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται το modified MRS AGAR (LABM). Για την παρασκευή του υλικού διαλύουμε 70g MRS και 0,05% κ.β. υδροχλωρική κυστεΐνη σε 1000ml απιονισμένο νερό και στην συνέχεια αποστειρώνουμε στους 121°C για 15 min. Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιείται το modified MRS BROTH (LABM), το οποίο παρασκευάζεται ανάλογα (55g MRS broth και 0,05% υδροχλωρική κυστεΐνη σε 1000ml απιονισμένο νερό, διανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστείρωση).

Ταυτοποίηση στελεχών

A) *Streptococcus* spp

Για την ταυτοποίηση των στελεχών του *Streptococcus* spp αναβιώνουμε τα στελέχη από τους -80°C. Για τον σκοπό αυτό μεταφέρουμε 50μl από το αιώρημα γλυκερόλης σε τρυβλίο με υπόστρωμα ST AGAR και κάνουμε γραμμική διασπορά. Το υπόστρωμα *Streptococcus thermophilus* agar (ST agar) παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύουμε σε 1l απιονισμένου νερού: 10g tryptone, 10g sucrose, 5g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 12g agar και στην συνέχεια αποστειρώνουμε σε 121°C για 15 min (Sozzi T., 1980). Μετά από την επώαση (24-48 ώρες στους 37°C αερόβια), γίνεται έλεγχος καθαρότητας (μορφολογία αποικιών, δοκιμή καταλάσης, χρώση Gram, μικροσκοπική παρατήρηση) και στην συνέχεια ακολουθεί ο έλεγχος των 4 δοκιμών για την ταυτοποίηση των στελεχών.

Οι 4 δοκιμές περιλαμβάνουν: 1) τον έλεγχο ανάπτυξης του στελέχους σε 10°C, 2) τον έλεγχο ανάπτυξης του στελέχους σε 45°C, 3) την δοκιμή ανθεκτικότητας σε υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (6,5% NaCl), 4) την δοκιμή παραγωγής αερίου κατά την ζύμωση των σακχάρων.

Για την πρώτη και την δεύτερη δοκιμή εμβολιάζονται σωλήνες με υπόστρωμα M17 broth (3ml) για κάθε ένα στέλεχος και επωάζονται αερόβια στους 10⁰C, για 5 ημέρες και στους 45⁰C για 2 ημέρες αντίστοιχα.

Για την τρίτη δοκιμή εμβολιάζονται σωλήνες με υπόστρωμα M17 και 6,5%NaCl (3ml) και επωάζονται στους 30⁰ C για 2 ημέρες αερόβια.

Για την τέταρτη δοκιμή εμβολιάζονται σωλήνες με υπόστρωμα MRS broth (7ml), στους οποίους έχει προστεθεί και ένας σωληνίσκος durham για την δέσμευση τυχόν παραγόμενου αερίου. Η επώαση γίνεται στους 30⁰ C για 2 ημέρες.(Collee J.G., 1996). Με τις 4 αυτές δοκιμές σε συνδυασμό με τις μορφολογικές παρατηρήσεις μπορούμε να κάνουμε μία πρώτη ταυτοποίηση των κόκκων που απομονώνονται από το γιαούρτι και είναι Gram θετικοί και αρνητικοί ως προς την καταλάση.

Γένος	Ανάπτυξη σε 10 ⁰ C	Ανάπτυξη σε 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα σε NaCl	Παραγωγή αερίου
<i>Lactococcus</i>	+	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	+	+	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	+	-	-
<i>Leuconostoc</i>	+	-	-	+

Η τελική ταυτοποίηση των στελεχών όμως γίνεται με το σύστημα API RAPID ID 32 STREP (BIOMERIEUX), το οποίο περιλαμβάνει μια σειρά 32 βιοχημικών αντιδράσεων .Για να ελεγχθεί ένα στέλεχος με το σύστημα αυτό, θα πρέπει να έχει πρώτα ελεγχθεί ως προς την καθαρότητά του μικροσκοπικά και στην συνέχεια να οδηγηθεί προς 2 συνεχείς ανακαλλιέργειες έτσι ώστε ο πληθυσμός των κυττάρων να φθάσει βαθμό θολερότητας 4 της κλίμακας Mc Farland. Η θολερότητα αυτή αντιστοιχεί σε μικροβιακό πληθυσμό περίπου 12*10⁸/ml.

Η διαδικασία εμβολιασμού έχει ως εξής: εμβολιάζονται τα κυπέλια της ταινίας του API, τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικές αντιδράσεις, με το ελαιώρημα των κυττάρων του κάθε στελέχους (55μl). Στην συνέχεια μεταφέρονται για επώαση στους 37⁰C για 4 – 4,5 ώρες και αφού προστεθούν τα κατάλληλα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας, τα αποτελέσματα αναγιγνώσκονται μετά από 5min. Τα αποτελέσματα αποτελούν το βιοχημικό προφίλ

του στελέχους το οποίο χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή του με την βοήθεια του αντίστοιχου λογισμικού (API LAB PLUS v 3.3.3).

B) *Lactobacillus* spp

Για την ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* αναβιώνουμε τα στελέχη από τους -80°C. Για τον σκοπό αυτό μεταφέρουμε 50μl από το αιώρημα γλυκερόλης σε τρυβλίο με υπόστρωμα MRS AGAR (LABM) και κάνουμε γραμμική διασπορά. Επωάζουμε για 48 ώρες στους 37°C αναερόβια και αφού επωαστούν κάνουμε έλεγχο καθαρότητας (μορφολογία αποικιών, δοκιμή καταλάσης, χρώση Gram, μικροσκοπική παρατήρηση). Τα στελέχη αυτά ταυτοποιούνται με την χρήση του συστήματος API 50CH (BIOMERIEUX). Για τον σκοπό αυτό δημιουργείται εναιώρημα κυττάρων του κάθε στελέχους στο υλικό API 50 CHL medium, με πληθυσμό περίπου $6 \cdot 10^8$ /ml. Το εναιώρημα αυτό χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό των κυπελίων του συστήματος API 50CH, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Οι εμβολιασμένες ταινίες επωάζονται αερόβια στους 37 °C για 48 ώρες (± 6 ώρες). Τα αποτελέσματα συγκροτούν το βιοχημικό προφίλ του μικροοργανισμού, το οποίο χρησιμοποιείται για τη ταυτοποίηση του στελέχους με τη βοήθεια του αντίστοιχου λογισμικού ταυτοποίησης (API LAB PLUS v 3.3.3 REF 34 000 Biomerieux® SA, Marcy-l'Etoile/ France).

Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών *Streptococcus* spp. και *Lactobacillus* spp

A) *Streptococcus* spp

Η μέθοδος που ακολουθείται είναι η μέθοδος της διάχυσης σε στερεό υπόστρωμα και εφαρμόζονται οι γενικές αρχές της National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2003α). Τα στελέχη που κυρίως απομονώνονται από τα γιαούρτια ανήκουν στο είδος *Streptococcus thermophilus* και δεν αναπτύσσονται στο υπόστρωμα Mueller Hinton agar που προτείνει η NCCLS. Για τον λόγο αυτό καλλιεργούνται στο υπόστρωμα ST agar και στην συνέχεια ελέγχονται ως προς την καθαρότητά τους, γίνεται δηλαδή μικροσκοπικός έλεγχος μετά από χρώση Gram.

Ακολουθεί δημιουργία αιωρήματος κυττάρων από την κάθε καλλιέργεια σε 4 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού (0,85% NaCl), με θολερότητα ισοδύναμη με 0,5 - 1 της κλίμακας McFarland. Η θολερότητα αυτή αντιστοιχεί σε $1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml.

Με την βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού που εμβαπτίζουμε στο αιώρημα, επιστρώνουμε τρυβλία διαμέτρου 150mm τα οποία περιέχουν υπόστρωμα ST agar. Το υπόστρωμα πρέπει να έχει πάχος περίπου 3-4 mm και για τον λόγο αυτό σε κάθε τρυβλίο μεταφέρουμε 65ml υλικού. Για κάθε στέλεχος γίνονται τρεις επαναλήψεις. Αφού απορροφηθεί η υγρασία, μετά από λίγα λεπτά τοποθετούνται οι δίσκοι με τα αντιβιοτικά (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson). Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37°C αερόβια και στη συνέχεια μετράται η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης. Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (Sensitive/**S**), ενδιάμεσης ευαισθησίας (Intermediate/**I**) ή ανθεκτικά (Resistant/ **R**) με βάση τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που αναφέρονται από την εταιρεία

Οι ομάδες των αντιβιοτικών που μελετήθηκαν και οι περιεκτικότητες των δισκίων ήταν οι εξής: (i) Αναστολείς της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων (Ampicillin 10 µg, Vancomycin 30 µg, Bacitracin 10 µg), (ii) Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών (Tetracycline 30 µg, Erythromycin 15 µg, Streptomycin 300 µg, Gentamycin 120 µg) (iii) Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (Ciprofloxacin 5 µg, Rifampicin 5 µg, Ofloxacin 5 µg, Norfloxacin 10 µg, Nitrofurantoin 300 µg).

Τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που αναφέρονται από την εταιρεία παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

Αντιβιοτικό	Ποσότητα (µg)	R(mm)	I(mm)	S(mm)
Ampicillin(AM)	10	<=16	-	>=17
Vancomycin(Va)	30	<=14	15-16	>=17
Bacitracin(B)	10	<=8	9-12	>=13
Tetracycline(Te)	30	<=14	15-18	>=19
Erythromycin(E)	15	<=13	14-22	>=23
Streptomycin(S)	300	<=6	7-9	>=10
Gentamicin(GM)	120	<=6	7-9	>=10
Ciprofloxacin(CIP)	5	<=15	16-20	>=21
Rifampicin(RA)	5	<=16	17-20	>=20
Ofloxacin(OFX)	5	<=12	13-15	>=16
Norfloxacin(NOR)	10	<=12	13-16	>=17
Nitrofurantoin(F/M)	300	<=14	15-16	>=17

B) *Lactobacillus* spp

Για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Lactobacillus* ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία, η οποία αποτελεί μια τροποποίηση της μεθόδου υπερκείμενης έγχυσης άγαρ (agar overlay diffusion method) (Charteris, W.P. et al. 1998α, Charteris, W.P. et al. 1998γ). Τα στελέχη που πρόκειται να εξεταστούν ελέγχονται πρώτα ως προς την καθαρότητά τους με μικροσκοπική παρατήρηση, μετά από χρώση Gram και στην συνέχεια υποβάλλονται σε τρεις διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε σωλήνες με 5 ml MRS broth υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες. Τρυβλία διαμέτρου 150mm (45 ml MRS agar) επιστρώνονται με 12ml μαλακού άγαρ 1%κ.β., το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία 45 °C σε υδατόλουτρο και εμβολιάζεται με 0,6 ml της υγρής ενεργούς καλλιέργειας (τρεις επαναλήψεις ανά στέλεχος). Αφού στεγνώσουν τα τρυβλία σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετούνται οι δίσκοι με τα αντιβιοτικά (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs), επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες και στη συνέχεια μετράται η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης. Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (Sensitive/S), ενδιάμεσης ευαισθησίας (Intermediate/ I) ή ανθεκτικά (Resistant/ R) με βάση τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που ορίστηκαν από τους Charteris et al. (1998β).

Οι ομάδες των αντιβιοτικών, που μελετήθηκαν στη περίπτωση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* και οι περιεκτικότητες των δισκίων ήταν οι εξής: (i) Αναστολείς της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων (Ampicillin 10 μg, Amoxicillin 20μg/ Clavulanic acid 10 μg, Cephalothin 30 μg, Vancomycin 30 μg, Bacitracin 10 μg), (ii) Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών (Amikacin 30μg, Kanamycin 30 μg, Tetracycline 30 μg, Chloramphenicol 30 μg, Erythromycin 15 μg) (iii) Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (Ciprofloxacin 5 μg, Rifampicin 5 μg). Τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί

Αντιβιοτικό	Ποσότητα (μg)	R(mm)	MS(mm)	S(mm)
Ampicillin(AM)	10	≤ 12	13-15	≥ 16
Amoxycillin(AmC)	30	≤ 18	19-20	≥ 21
Cephalothin(CF)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Vancomycin(Va)	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Bacitracin(B)	10	≤ 15	16-17	≥ 18
Amikacin(AN)	30	≤ 15	16-17	≥ 18
Kanamycin(K)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Tetracycline(Te)	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Chloramphenicol(C)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Erythromycin(E)	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Ciprofloxacin(CIP)	5	≤ 13	14-18	≥ 19
Rifampicin(RA)	5	≤ 14	15-17	≥ 18

Στατιστική επεξεργασία

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μετασχηματισμός του πληθυσμού που καταμετρήθηκε με την μέθοδο των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (colony forming units:cfu), σε $\log_{10}(\text{cfu})$. Οι πληθυσμοί ελέγχθηκαν εάν ακολουθούν την κανονική κατανομή με χρήση του Anderson-Darling Normality test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της υπόθεσης:

H_0 : ο δεκαδικός λογάριθμος του μέσου πληθυσμού μικροοργανισμών [$\log_{10}(\text{cfu})$] ίσος με 7, δηλαδή ο δεκαδικός λογάριθμος του 10^7 που είναι ο αριθμός που ορίζεται από τη Γαλλική νομοθεσία για τον ελάχιστο πληθυσμό που πρέπει να υπάρχει στο γιαούρτι. ($H_0: \mu=7$)

H_1 : ο δεκαδικός λογάριθμος του μέσου πληθυσμού μικροοργανισμών [$\log_{10}(\text{cfu})$] μεγαλύτερος του 7. ($H_1: \mu>7$)

Για τον έλεγχο της υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος t (1-sample-t-test) για ανεξάρτητα δείγματα σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$. Στις περιπτώσεις που δεν μπορούσαμε να απορρίψουμε την μηδενική υπόθεση (δηλ. $p_{\text{value}}>0,05$) έγινε έλεγχος των υποθέσεων:

$$H_1: \mu < 7 \quad \text{και}$$

$$H_1: \mu = 7$$

Σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.

Χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα Microsoft Excel και Minitab 12 for Windows.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αναγραφόμενα χαρακτηριστικά των γιαουρτιών

Όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα έγινε προσπάθεια να συλλεχθούν δείγματα και από τους τέσσερις νομούς της Θεσσαλίας. Στα γιαούρτια του δείγματος, με τα κωδικοποιημένα ονόματά τους που φαίνονται στον πίνακα, τα μόνα αναγραφόμενα χαρακτηριστικά ήταν το είδος προέλευσης γάλακτος, η πόλη παραγωγής, το όνομα, η διεύθυνση και το τηλέφωνο του παρασκευαστή.

ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ.ΟΝΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ	ΠΟΛΗ
Κατσιμπέρης	1-ΚΑΤ	στραγγιστό	Λάρισα
Χατζής	2-ΧΑΤ	πρόβειο	Λάρισα
Αγορογιάννης	3-ΑΓΟ	στραγγιστό	Λάρισα
Τυράς Α.Ε.	4-ΤΥΡ	στραγγιστό	Τρίκαλα
Δίας	5-ΔΙΑ	πρόβειο	Ελασσόνα
Λέκκας	6-ΛΕΚ	πρόβειο	Ελασσόνα
Γραβάνης	7-ΓΡΑ	πρόβειο	Λάρισα
Εβόλ	8-ΕΒΟ	πρόβειο	Βόλος
Η Φλέγγα της Πίνδου	9-ΦΛΕ	πρόβειο	Βελεστίνο
Το χωριό	10-ΧΩΡ	πρόβειο	Βόλος
Η Σούρπη	11-ΣΟΥ	πρόβειο	Σούρπη Αλμυρού
Το χωριάτικο	12-ΤΟΧ	πρόβειο	Αλμυρός
Γεωργ.Τζιμίκας	13-ΤΖΙ	50%πρόβειο,50% αγελαδινό	Βόλος
Η Νέα Δημητριάς	14-ΝΕΑ	50%πρόβειο,50% αγελαδινό	Βόλος
Τα Αγραφα	15-ΤΑΓ	πρόβειο	Καρδίτσα
Τα Αγραφα	16-ΤΑΑ	αγελαδινό	Καρδίτσα
Η Τσελιγκοπούλα	17-ΤΣΕ	πρόβειο	Καρδίτσα
Η Τσελιγκοπούλα	18-ΤΣΓ	αγελαδινό	Καρδίτσα
Η Στρούγκα	19-ΣΤΡ	πρόβειο	Καρδίτσα
Η Στρούγκα	20-ΓΚΑ	αγελαδινό	Καρδίτσα

3.2 Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών

Οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν στα 20 δείγματα γιαουρτιών ήταν από τα γένη *Streptococcus* και *Lactobacillus*. Βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα γιαουρτιού.

3.2.1 Καταμέτρηση πληθυσμού του γένους *Streptococcus*

Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης του πληθυσμού του γένους *Streptococcus* παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2.1 Καταμέτρηση πληθυσμών *Streptococcus* spp

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΑΠΟΙΚΙΑΣ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ cfu/g
ΚΑΤ	ΚΑΤΣΙΜΠΕΡΗΣ	a	$3 \cdot 10^4$
		b	$69 \cdot 10^4$
		c	$18,5 \cdot 10^5$
		d	$1 \cdot 10^4$
ΧΑΤ	ΧΑΤΖΗΣ	a	$14 \cdot 10^7$
		b	$27 \cdot 10^7$
ΑΓΟ	ΑΓΟΡΟΓΙΑΝΝΗΣ	a	$9 \cdot 10^7$
ΤΥΡ	ΤΥΡΑΣ Α.Ε.	a	$10 \cdot 10^6$
		b	$7 \cdot 10^6$
ΔΙΑ	ΔΙΑΣ	a	$27 \cdot 10^7$
ΛΕΚ	ΛΕΚΚΑΣ	a	$6 \cdot 10^7$
		b	$7 \cdot 10^7$
ΓΡΑ	ΓΡΑΒΑΝΗΣ	a	$54 \cdot 10^7$
ΕΒΟ	ΕΒΟΛ	a	$15 \cdot 10^7$
ΦΛΕ	ΦΛΕΓΓΑ ΤΗΣ ΠΙΝΔΟΥ	a	$66 \cdot 10^5$
ΧΩΡ	ΤΟ ΧΩΡΙΟ	a	$17 \cdot 10^6$
ΣΟΥ	Η ΣΟΥΡΠΗ	a	$36 \cdot 10^6$
ΤΟΧ	ΤΟ ΧΩΡΙΑΤΙΚΟ	a	$12 \cdot 10^7$
ΤΖΙ	ΤΖΙΜΙΚΑΣ	a	$26 \cdot 10^6$
		b	$17 \cdot 10^6$
ΝΕΑ	Η ΝΕΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΣ	a	$23,8 \cdot 10^8$
ΤΑΓ	ΤΑ ΑΓΡΑΦΑ	a	$11 \cdot 10^7$
ΤΑΑ	ΤΑ ΑΓΡΑΦΑ	a	$4 \cdot 10^7$
ΤΣΕ	Η ΤΣΕΛΙΓΚΟΠΟΥΛΑ	a	$43 \cdot 10^6$
ΤΣΓ	Η ΤΣΕΛΙΓΚΟΠΟΥΛΑ	a	$41 \cdot 10^6$
ΣΤΡ	Η ΣΤΡΟΥΓΚΑ	a	$37 \cdot 10^7$
ΓΚΑ	Η ΣΤΡΟΥΓΚΑ	a	$14 \cdot 10^7$

Όπως παρατηρούμε στην πλειονηφία των δειγμάτων βρέθηκε ένας μόνο τύπος αποικίας, σε τρία γιαούρτια δύο τύποι, ενώ σε ένα μόνο γιαούρτι (ΚΑΤ) βρέθηκαν τέσσερις τύποι αποικιών.

Μετά από στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων του μέσου όρου του πληθυσμού των στρεπτοκόκκων των δειγμάτων, προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί

Δείγματα	Μέσος όρος	Τυπική Απόκλιση	Pvalue
ΚΑΤ	6,40	0,11	0,99*
ΧΑΤ	8,61	0,07	0,0004
ΑΓΟ	7,95	0,15	0,0042
ΤΥΡ	7,23	0,08	0,018
ΔΙΑ	8,44	0,06	0,0003
ΛΕΚ	8,07	0,14	0,0028
ΓΡΑ	8,73	0,02	0,0000
ΕΒΟ	8,16	0,12	0,0017
ΦΛΕ	6,81	0,08	0,97*
ΧΩΡ	7,24	0,01	0,0006
ΣΟΥ	7,55	0,08	0,0039
ΤΟΧ	8,17	0,07	0,0007
ΤΖΙ	7,62	0,11	0,0049
ΝΕΑ	9,38	0,01	0,0000
ΤΑΓ	8,03	0,02	0,0001
ΤΑΑ	7,50	0,46	0,10*
ΤΣΕ	7,61	0,18	0,015
ΤΣΓ	7,61	0,04	0,0008
ΣΤΡ	8,53	0,21	0,003
ΓΚΑ	8,11	0,17	0,0041

*έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΚΑΤ, $H_1: \mu < 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu < 7$

* έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΦΛΕ , $H_1: \mu = 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu = 7$

* έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΤΑΑ , $H_1: \mu = 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu = 7$

Συνεπώς το 5% των δειγμάτων των γιαουρτιών έχει πληθυσμό στρεπτοκόκκων μικρότερο από 10^7 cfu/g, το 10% έχει πληθυσμό ίσο με 10^7 cfu/g και το 85% μεγαλύτερο του 10^7 cfu/g.

3.2.2 Καταμέτρηση πληθυσμού του γένους *Lactobacillus*

Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης του πληθυσμού του γένους *Lactobacillus* παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2.2 Καταμέτρηση πληθυσμών *Lactobacillus* spp

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΟΝΟΜΑ ΑΠΟΙΚΙΑΣ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ cfu/g
ΚΑΤ	ΚΑΤΣΙΜΠΕΡΗΣ	a	$8 \cdot 10^3$
		b	$3 \cdot 10^3$
		c	$1 \cdot 10^3$
ΧΑΤ	ΧΑΤΖΗΣ	a	$53 \cdot 10^7$
ΑΓΟ	ΑΓΟΡΟΓΙΑΝΝΗΣ	a	$7 \cdot 10^5$
		b	$3 \cdot 10^5$
ΤΥΡ	ΤΥΡΑΣ Α.Ε.	a	$8 \cdot 10^6$
		b	$9 \cdot 10^6$
ΔΙΑ	ΔΙΑΣ	a	$77 \cdot 10^7$
ΛΕΚ	ΛΕΚΚΑΣ	a	$31 \cdot 10^7$
		b	$1 \cdot 10^6$
ΓΡΑ	ΓΡΑΒΑΝΗΣ	a	$3 \cdot 10^6$
		b	$17 \cdot 10^6$
ΕΒΟ	ΕΒΟΛ	a	$23 \cdot 10^6$
		b	$22 \cdot 10^6$
ΦΛΕ	ΦΛΕΓΓΑ ΤΗΣ ΠΙΝΔΟΥ	a	$7 \cdot 10^7$
		b	$3 \cdot 10^7$
ΧΩΡ	ΤΟ ΧΩΡΙΟ	a	$19 \cdot 10^7$
ΣΟΥ	Η ΣΟΥΡΙΠΗ	a	$26 \cdot 10^7$
ΤΟΧ	ΤΟ ΧΩΡΙΑΤΙΚΟ	a	$3 \cdot 10^7$
ΤΖΙ	ΤΖΙΜΙΚΑΣ	a	$31 \cdot 10^7$
ΝΕΑ	Η ΝΕΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΣ	a	$19,7 \cdot 10^8$
ΤΑΓ	ΤΑ ΑΓΡΑΦΑ	a	$44 \cdot 10^7$
ΤΑΑ	ΤΑ ΑΓΡΑΦΑ	a	$20 \cdot 10^7$
ΤΣΕ	Η ΤΣΕΛΙΓΚΟΠΟΥΛΑ	a	$35 \cdot 10^7$
ΤΣΓ	Η ΤΣΕΛΙΓΚΟΠΟΥΛΑ	a	$23 \cdot 10^7$
ΣΤΡ	Η ΣΤΡΟΥΓΚΑ	a	$47 \cdot 10^7$
		b	$6 \cdot 10^7$
ΓΚΑ	Η ΣΤΡΟΥΓΚΑ	a	$36 \cdot 10^7$
		b	$4 \cdot 10^7$

Σε αντίθεση με τους στρεπτόκοκκους, οι λακτοβάκιλλοι εμφανίζονται συνήθως με δύο τύπους αποικιών ενώ το γιαούρτι με το κωδικό όνομα ΚΑΤ περιέχει τρεις τύπους αποικιών.

Δείγματα	Μέσος όρος	Τυπική Απόκλιση	Pvalue
KAT	4,06	0,08	-
XAT	8,73	0,03	0,0000
ΑΓΟ	5,94	0,30	0,99*
TYP	7,22	0,10	0,029*
ΔΙΑ	8,88	0,05	0,0001
ΛΕΚ	8,50	0,05	0,0002
ΓΡΑ	7,27	0,12	0,032*
EBO	7,65	0,11	0,0044
ΦΛΕ	7,91	0,31	0,019
ΧΩΡ	8,27	0,09	0,0009
ΣΟΥ	8,40	0,11	0,0011
ΤΟΧ	7,43	0,38	0,093*
ΤΖΙ	8,48	0,09	0,0007
ΝΕΑ	9,29	0,07	0,0001
ΤΑΓ	8,63	0,13	0,0010
ΤΑΑ	8,29	0,07	0,0004
ΤΣΕ	8,54	0,10	0,0007
ΤΣΓ	8,36	0,08	0,0005
ΣΤΡ	8,72	0,07	0,0003
ΓΚΑ	8,11	0,05	0,0002

Για το ΚΑΤ δεν κατέστη δυνατό να γίνει έλεγχος t επειδή είχαμε μόνο 2 επαναλήψεις και δεν ακολουθεί κανονική κατανομή.

* έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΑΓΟ, $H_1: \mu < 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu < 7$

* έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΤΥΡ, $H_1: \mu = 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu = 7$

* έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΓΡΑ, $H_1: \mu = 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu = 7$

*έγινε και έλεγχος υπόθεσης για το ΤΟΧ , $H_1: \mu = 7$ και βρέθηκε ότι όντως $\mu = 7$

Συνεπώς το 10% των δειγμάτων έχει πληθυσμό λακτοβακίλλων μικρότερο 10^7 cfu/g, το 15% έχει πληθυσμό ίσο με 10^7 cfu/g και το 75% μεγαλύτερο του 10^7 cfu/g.

3.3 Απομόνωση στελεχών

Μετά από την καταμέτρηση των αντίστοιχων πληθυσμών των γενών *Streptococcus* και *Lactobacillus*, έγινε για κάθε τύπο αποικίας απομόνωση 5-6 στελεχών, των οποίων καταγράφηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα γιαουρτιού.

3.3.1 Απομόνωση στελεχών του γένους *Streptococcus*

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών του γένους *Streptococcus* που απομονώθηκαν από τα 20 δείγματα γιαουρτιών, όπως επίσης και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων μετά από χρώση Gram. Όλα τα κύτταρα ήταν αρνητικά ως προς την καταλάση και θετικά ως προς την χρώση Gram .

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.1 Περιγραφή αποικιών του γένους *Streptococcus*

ΔΕΙΓΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΑΠΟΙΚΙΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΚΑΤ	a	Άσπρη-μεσαία, r-conv	Λεπτοί-μικροί , επιμήκεις
	b	Μπεζ-μικρή, r-conv	Μικροί-στρογγυλοί
	c	Υπόλευκη r-conv	Στρογγυλοί-χονδροί, ακανόνιστοι με μεγάλες αλυσίδες
	d	Άσπρη μεγάλη , r-conv	Μικροί στρογγυλοί
	C'	r-conv	Χονδροί και ακανόνιστοι
ΧΑΤ	a	Μεγάλη, υπόλευκη r-conv	Επιμήκεις, μέτριοι και μεγάλοι
	b	Μικρές, λευκές, r-conv	Κανονικοί και πεπλατυσμένοι, ακανόνιστοι
ΑΓΟ	a	Υπόλευκη, μεσαία, r-conv	Μικροί, στρογγυλοί
ΤΥΡ	a	Υπόλευκη, r-conv	Κανονικοί και μερικοί πεπλατυσμένοι
	b	Μπεζ , r-conv	Κανονικοί και επιμήκεις πεπλατυσμένοι
ΔΙΑ	a	Υπόλευκη μεσαίες, r-unb	Κανονικοί και επιμήκεις ακανόνιστοι
ΛΕΚ	a	Υπόλευκη μικρή-μεσαία, r-conv	Ακανόνιστοι σε αλυσίδες οι περισσότεροι
	b	Μπεζ μικρή, r-conv	ακανόνιστοι
ΓΡΑ	a	Υπόλευκη μεσαία, r-conv	Κανονικοί και πεπλατυσμένοι
ΕΒΟ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και ακανόνιστοι- επιμήκεις σε αλυσίδες
ΦΛΕ	a	Υπόλευκη, r-conv	ακανόνιστοι
ΧΩΡ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και πεπλατυσμένοι
ΣΟΥ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και επιμήκεις- πεπλατυσμένοι
ΤΟΧ	a	Χρυσίζουσα, w-unb	Κανονικοί, ακανόνιστοι και επιμήκεις
ΤΖΙ	a	Έντονα χρυσίζουσα, w- unb	Κανονικοί , πεπλατυσμένοι κ ακανόνιστοι σε αλυσίδες
	b	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και πεπλατυσμένοι
ΝΕΑ	a	Χρυσίζουσα, w-unb	Κανονικοί και μερικοί πεπλατυσμένοι σε αλυσίδες
ΤΑΓ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί σε αλυσίδες και μερικοί ακανόνιστοι
ΤΑΑ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί σε αλυσίδες και μερικοί ακανόνιστοι
ΤΣΕ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και ακανόνιστοι αρκετοί σε αλυσίδες
ΤΣΓ	a	Χρυσίζουσα, r-conv	Κανονικοί και ακανόνιστοι αρκετοί σε αλυσίδες
ΣΤΡ	a	Υποκίτρινη, r-conv	Κανονικοί και ακανόνιστοι λίγοι σε αλυσίδες
ΓΚΑ	a	Υποκίτρινη, r-conv	Κανονικοί και ακανόνιστοι

3.3.2 Απομόνωση στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών του γένους *Lactobacillus* που απομονώθηκαν από τα 20 δείγματα γιαουρτιών, όπως επίσης και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων μετά από χρώση Gram. Όλα τα κύτταρα ήταν αρνητικά ως προς την καταλάση και θετικά ως προς την χρώση Gram .

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.2 Περιγραφή αποικιών του γένους *Lactobacillus*

ΔΕΙΓΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΑΠΟΙΚΙΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΚΑΤ	a	Μεγάλη υπόλευκηw-unb	Κανονικοί-επιμήκεις μεσαίοι και μικροί σε αλυσίδες
	b	Μεγάλη υπόλευκη κατσαρή ακανόνιστη με φυσαλίδες	Χοντροί μεσαίοι και λίγοι μικροί
	c	Υποκίτρινη r-sm-conv	Κοντοί και χοντροί
ΧΑΤ	a	Μεγάλη Υπόλευκηw-unb	Κανονικοί- επιμήκεις
ΑΓΟ	a	Υπόλευκη w-unb	Κανονικοί με μεγάλες αλυσίδες
	b	Υπόλευκη r-conv	Κανονικοί-μεσαίοι με μικρές αλυσίδες
ΤΥΡ	a	Μεγάλη λευκήr-conv	Κοντοί βάκιλλοι
	b	Υπόλευκη μεσαίαw-unb	Ποικιλόμορφοι βάκιλλοι
ΔΙΑ	a	Υπόλευκη μεσαίαw-unb	Ποικιλόμορφοι βάκιλλοι
ΛΕΚ	a	Μεσαία λευκή w-unb	Ποικιλόμορφοι βάκιλλοι
	b	Μεσαία λευκή w-flat	Ποικιλόμορφοι επιμήκεις
ΓΡΑ	a	Υπόλευκη μεσαία, μεγάληw-flat	Κανονικοί μικροί, μεσαίοι και μεγάλοι
	b	Υπόλευκη μεσαίαw-unb	ποικιλόμορφοι βάκιλλοι
ΕΒΟ	a	υπόλευκη w-conv	Κανονικοί-επιμήκεις και μερικοί ακανόνιστοι
	β	υπόλευκη r-conv	ποικιλόμορφοι και μερικοί ακανόνιστοι
ΦΛΕ	a	Υπόλευκη μεσαία r-w-unb	Κανονικοί μικροί και μεσαίοι
	b	Λευκή r-conv	Κανονικοί-επιμήκεις
ΧΩΡ	a	Υπόλευκη μεσαίαw-conv	Κανονικοί-ποικιλόμορφοι
ΣΟΥ	a	Υπόλευκη κατσαρή-unb	Κανονικοί μερικοί σε μικρές αλυσίδες
ΤΟΧ	a	Υπόλευκη κατσαρή-unb	ποικιλόμορφοι βάκιλλοι
ΤΖΙ	a	Υπόλευκη κατσαρή-conv	Κανονικοί ποικιλόμορφοι αρκετοί επιμήκεις οι μικροί σε αλυσίδες
ΝΕΑ	a	Υπόλευκη κατσαρή-unb	Κανονικοί-επιμήκεις μεσαίοι και μικροί
ΤΑΓ	a	Υπόλευκη w-conv	Κανονικοί-ποικιλόμορφοι
ΤΑΑ	a	Υπόλευκη w-conv	Κανονικοί-ποικιλόμορφοι οι μεγάλοι σχηματίζονται από αλυσίδες
ΤΣΕ	a	Υπόλευκη w-flat	Κανονικοί σχεδόν επιμήκεις μικροί και μεσαίοι
ΤΣΓ	a	Υπόλευκη w-flat	Κανονικοί σχεδόν επιμήκεις μικροί και μεσαίοι αρκετοί σε αλυσίδες
ΣΤΡ	a	Υπόλευκη w-conv	Κανονικοί σχεδόν επιμήκεις μικροί και μεσαίοι σε αλυσίδες
	b	Υπόλευκη w-unb	Κανονικοί-ποικιλόμορφοι με λίγες αλυσίδες
ΓΚΑ	a	Υπόλευκη w-conv	Κανονικοί σχεδόν επιμήκεις, οι μεγάλοι από αλυσίδες μικρών
	b	Υπόλευκη w-unb	Κανονικοί-ποικιλόμορφοι με λίγες αλυσίδες

3.4 Ταυτοποίηση στελεχών

3.4.1 Ταυτοποίηση στελεχών του γένους *Streptococcus*

Για την ταυτοποίηση των στελεχών των στρεπτόκοκκων που απομονώθηκαν από τα δείγματα γιαουρτιών, τα στελέχη υποβλήθηκαν σε 4 δοκιμές ανάπτυξης και στην συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με το σύστημα API RAPID ID 32 STREP (BIOMERIEUX).

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις 4 δοκιμές ανάπτυξης: 1) Αύξηση σε υπόστρωμα M17 στους 10⁰C, 2) Αύξηση σε υπόστρωμα M17 στους 45⁰C, 3) Αύξηση σε υπόστρωμα M17 με υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (6,5%NaCl), 4) Δοκιμή παραγωγής αερίου σε υπόστρωμα MRS broth.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4.1 Αποτελέσματα δοκιμών ανάπτυξης στελεχών *Streptococcus* spp.

Δείγματα	Στελέχη	Ανάπτυξη στους 10 ⁰ C	Ανάπτυξη στους 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα στο NaCl	Παραγωγή αερίου
KAT	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	B1	-	+	-	-
	B3	-	+	-	-
	B5	-	+	-	-
	C1	-	+	-	-
	C2	-	+	-	-
	C5	-	+	-	-
	C'2	-	+	-	-
	C'3	-	+	-	-
	C'4	-	+	-	-
	D	+	+	+	-
XAT	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
	B1	-	+	-	-
	B2	-	+	-	-
	B3	-	+	-	-
	B4	-	+	-	-
	B5	-	+	-	-
	B6	-	+	-	-

Δείγματα	Στελέχη	Ανάπτυξη στους 10 ⁰ C	Ανάπτυξη στους 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα στο NaCl	Παραγωγή αερίου
ΑΓΟ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΓΡΑ	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
EBO	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΔΙΑ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
TYP	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
	B1	-	+	-	-
	B2	-	+	-	-
	B3	-	+	-	-
	B4	-	+	-	-
	B5	-	+	-	-

Δείγματα	Στελέχη	Ανάπτυξη στους 10 ⁰ C	Ανάπτυξη στους 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα στο NaCl	Παραγωγή αερίου
ΔΕΚ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	B1	-	+	-	-
	B2	-	+	-	-
	B3	-	+	-	-
	B5	-	+	-	-
ΧΩΡ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΦΛΕ	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΣΟΥ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΤΟΧ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-

Δείγματα	Στελέχη	Ανάπτυξη στους 10 ⁰ C	Ανάπτυξη στους 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα στο NaCl	Παραγωγή αερίου
TZI	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
	B1	-	+	-	-
	B2	-	+	-	-
	B5	-	+	-	-
	B6	-	+	-	-
NEA	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΤΑΓ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
TAA	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
ΤΣΕ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-

Δείγματα	Στελέχη	Ανάπτυξη στους 10 ⁰ C	Ανάπτυξη στους 45 ⁰ C	Ανθεκτικότητα στο NaCl	Παραγωγή αερίου
ΤΣΓ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
ΣΤΡ	A1	-	+	-	-
	A2	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-
ΓΚΑ	A1	-	+	-	-
	A3	-	+	-	-
	A4	-	+	-	-
	A5	-	+	-	-
	A6	-	+	-	-

Παρατηρούμε ότι από τα γιαούρτια που εξετάστηκαν βρέθηκε μόνο σε ένα η ύπαρξη ενός στελέχους *Enterococcus* spp. (KAT d).

Στην συνέχεια επιλεγμένα στελέχη από κάθε γιαούρτι εξετάστηκαν με το σύστημα API RAPID ID 32 STREP, ως προς το βιοχημικό τους προφίλ. Τα αποτελέσματα του API παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4.2

Ταυτοποίηση στελεχών του γένους *Streptococcus* από API RAPID ID 32 STREP

ΔΕΙΓΜΑ	% ID	T	
KAT-B1			No identification possible
KAT-d	97,6% <i>Enterococcus hirae</i>	0,51	Good id. to the gene
XAT-A4			No identification possible
ΑΓΟ-A1	<i>Str. sanguis 1</i>		Unacceptable profile
ΓΡΑ-A2	<i>Str. sanguis 1</i>		Unacceptable profile
EBO-A2			No identification possible
ΔΙΑ-A3	<i>Str.oralis 1,2</i>		Unacceptable profile
TYP-A2	99,5% <i>Str.oralis 2</i>	0,33	Good id. to the gene
ΛΕΚ-A2	91% <i>Str. mitis 2</i>	0,29	Good id. to the gene
XΩΡ-A6	99,8% <i>Strep. saliv.thermoph.</i>	0,87	Very good identification to the gene
ΦΛΕ-A2	84,6% <i>Str.oralis 2</i>	0,72	Acceptable profile
ΣΟΥ-A1	85,7% <i>Str.oralis 2</i>	0,45	Good id. to the gene
	8,5% <i>Str. mitis 2</i>	0,37	
ΤΟΧ-A1	<i>Str. Sanguis 1</i>		Unacceptable profile
ΤΖΙ-A3	<i>Str.oralis 2</i>		Unacceptable profile
ΝΕΑ-A2			No identification possible
ΤΑΑ-ΤΑΓ-A6			No identification possible
ΤΣΕ-ΤΣΓ-A2	<i>Str. acidominimus</i>		Unacceptable profile
ΓΚΑ-ΣΤΡ-A1	<i>Str.oralis 2</i>		Unacceptable profile

Παρατηρούμε ότι μόνο σε ένα γιαούρτι βρέθηκε το *Strep. saliv. thermoph* με πολύ καλή ταυτοποίηση, ενώ τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στα υπόλοιπα δείγματα βρίσκονται αρκετά κοντά ταξινομικά με το *Strep. saliv.thermoph*. Σε αρκετά βέβαια, δείγματα δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση. Το γεγονός αυτό προκύπτει διότι τα στελέχη αυτά είναι απομονώσεις από μικρές γαλακτοκομικές μονάδες, οι οποίες δεν χρησιμοποιούν καλλιέργειες εκκίνησης από γνωστές συλλογές. Αντίθετα χρησιμοποιούν στελέχη φυσικού τύπου και μάλιστα τις περισσότερες φορές δεν είναι ταυτοποιημένα, έτσι ώστε να υπάρχουν σε βάσεις δεδομένων. Για την περαιτέρω ταυτοποίησή τους απαιτούνται μοριακές τεχνικές.

3.4.2 Ταυτοποίηση στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Για την ταυτοποίηση των λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τα γιαούρτια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα API 50 CH (BIOMERIEUX). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4.3

Ταυτοποίηση στελεχών του γένους *Lactobacillus* μέσω του συστήματος API

ΔΕΙΓΜΑ	% ID	T	
KAT-A6	92,8% <i>Lact.delb.delb.</i>	0,84	Very good identification to the gene
	7% <i>Lact.acydophilus 3</i>	0,76	
XAT-A2	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
AGO-A2	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
ΓPA-A1	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
EBO-A2	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene
ΔΙΑ-A2	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
TYP-A3	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene
ΛΕΚ-A3	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
ΧΩΡ-A2	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
ΦΛΕ-A1	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
ΣΟΥ-A1	95,5% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,65	Good id. To the gene
ΤΟΧ-A1	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
TZI-A1	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene
NEA-A2	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene
TAA-TAG-A1	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene
ΤΣΕ-ΤΣΓ-A1	53,6% <i>Lact.delb.lactis</i>	0,87	Good id. To the gene
	40,3% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,79	
ΓΚΑ-ΣΤΡ-A1	98,8% <i>Lact.delb.bulgar.</i>	0,95	Good id. To the gene

Παρατηρούμε ότι για όλα τα δείγματα γιαουρτιού έγινε καλή ταυτοποίηση (Good id. To the gene) του γένους των *Lactobacillus* ενώ για το γιαούρτι με το κωδικό όνομα KAT έγινε πολύ καλή ταυτοποίηση (Very good identification to the gene). Σε αυτό το γιαούρτι βρέθηκε σε ποσοστό 92.8% ID το *Lact.delb.delb.*, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα βρέθηκαν τα *Lact.delb.lactis* και *Lact.delb.bulgar.* Όλα τα είδη

Lactobacillus που ταυτοποιήθηκαν έχει αποδειχτεί από μελέτες σε ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος ότι έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γιαουρτιού. Βέβαια το γένος *Lact.delb.bulgar* είναι εκείνο που ορίζεται από τους οργανισμούς FAO/WHO και Codex Alimentarius ως η καλλιέργεια εκκινητής για τη ζύμωση του γιαουρτιού και είναι εκείνο που ταυτοποιήθηκε στην πλειοψηφία των δειγμάτων.

3.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Όλα τα στελέχη των στρεπτόκοκκων και των λακτοβακίλλων εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 12 αντιβιοτικά. Συγκρίνοντας το μέσο όρο των μετρήσεων της διαμέτρου της ζώνης παρεμπόδισης με τα πρότυπα όρια, τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (Sensitive/**S**), ενδιάμεσης ευαισθησίας (Intermediate/**I**) ή ανθεκτικά (Resistant/ **R**) R

3.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Streptococcus*

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των στελεχών του γένους *Streptococcus*, που απομονώθηκαν από τα δείγματα γιαουρτιών ως προς 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Streptococcus*

Δείγμα	Στέλεχος	AM	VA	B	Te	E	S	GM	CIP	RA	OFX	NOR	F/M
ΚΑΤ	C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	C'3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	d	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
ΧΑΤ	A4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΑΓΟ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΓΡΑ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΕΒΟ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΔΙΑ	A3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΥΡ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΛΕΚ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΧΩΡ	A6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΦΛΕ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΣΟΥ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΟΧ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΖΙ	A3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΝΕΑ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΑΓ	A6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΑΑ	A3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΣΕ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΤΣΓ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΣΤΡ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ΓΚΑ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα μόνο ένα στέλεχος εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Rifampicin (RA-5) και το βακτήριο αυτό είναι *Enterococcus hirae*, όπως προέκυψε μετά από την ταυτοποίηση. Τα υπόλοιπα στελέχη είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά. Έτσι η ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη εμφανίζεται σε ποσοστό 3,33%.

3.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των στελεχών του γένους *Lactobacillus*, που απομονώθηκαν από τα δείγματα γιαουρτιών ως προς 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Δείγμα	Στέλεχος	AM	AmC	CF	Va	B	AN	K	Te	C	E	CIP	RA
ΚΑΤ	A6	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
	B3	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	I	S
	C2	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	I	S
ΧΑΤ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΑΓΟ	A2	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
	B4	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S
ΓΡΑ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΕΒΟ	A2	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
	B3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΔΙΑ	A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΤΥΡ	A3	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	I	S
	B2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΛΕΚ	A3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΧΩΡ	A2	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
ΦΛΕ	A3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
	B1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΣΟΥ	A1	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
ΤΟΧ	A1	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
ΤΖΙ	A1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΝΕΑ	A2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΤΑΓ	A2	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S
ΤΑΑ	A2	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
ΤΣΕ	A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
ΤΣΓ	A1	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
ΣΤΡ	A1	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
	B1	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
ΓΚΑ	A1	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
	B3	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S

Από τα στελέχη των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν, ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στα εξής αντιβιοτικά: Vancomycin(Va) , Bacitracin(B), Amikacin(AN),

Kanamycin(K) και Ciprofloxacin(CIP) με ποσοστά ανθεκτικότητας 3,33% στη B , 10% στη Va, 33,33% στην K, 33,33% στην AN και 90% στην CIP. Συνεπώς ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε και για τις τρεις ομάδες αντιβιοτικών.(Αναστολείς της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων: Va, B, Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών: AN, K, Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων : CIP).

Παρατηρείται ότι μεταξύ των στελεχών που εμφάνισαν ανθεκτικότητα, υπάρχουν 9 στελέχη που είναι πολυανθεκτικά, δηλαδή παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 2 αντιβιοτικά και αυτά είναι:

KAT A6 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

KAT B3 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και Va

KAT C2 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και Va

TYP A3 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K, Va και B

TYP B2 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

ΦΛΕ A3 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

ΦΛΕ B1 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

TZI A1 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

NEA A2 το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην AN, K και CIP

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την ανάλυση των 20 δειγμάτων γιαουρτιών από την περιοχή της Θεσσαλίας, φάνηκε ότι δεν πληρούσαν όλα τα κριτήρια όπως έχουν οριστεί ως προς την ετικέτα της συσκευασίας τους (Food Standarts Codex Alimentarius A-11(b)-1976; Μπόσκου Γ., 2005). Έτσι, σε κανένα δείγμα δεν αναγράφονταν τα συστατικά που περιέχει συγκεκριμένη μερίδα του γιαουρτιού (π.χ. υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες κ.λ.π.) όπως και η κατηγοριοποίηση σε πλήρες, ημίπαχο, άπαχο ή/και φρουτώδες. Παρόλα τα παραλείπόμενα στοιχεία σε όλα τα γιαούρτια αναγράφονταν η ημερομηνία λήξης του προϊόντος, το καθαρό βάρος του, η ζωική προέλευση του γάλακτος που χρησιμοποιείται (αγελαδινό, πρόβειο), καθώς και το όνομα, η διεύθυνση και το τηλέφωνο του παρασκευαστή.

Μικροβιακοί πληθυσμοί

Σε σχέση με τον πληθυσμό των στρεπτοκόκκων που καταμετρήθηκαν, βρέθηκε ότι το 85% των γιαουρτιών πληροί τις προδιαγραφές, διαθέτοντας πληθυσμό $> 10^7$ cfu/g, ενώ όσο αφορά στον πληθυσμό των λακτοβακίλλων, το 75% των δειγμάτων πληροί τις ίδιες προδιαγραφές. Μόνο το 5% των δειγμάτων είχαν πληθυσμό βακτηρίων του γένους *Streptococcus* $< 10^7$ cfu/g και 10% των δειγμάτων είχαν πληθυσμό βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* $< 10^7$ cfu/g. Σε αυτά τα ποσοστά συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα το οποίο δεν πληροί τις προδιαγραφές για κανένα από τα 2 είδη βακτηρίων, γεγονός που φαίνεται ότι εντοπίζεται και από άλλους ερευνητές στον ευρωπαϊκό χώρο (Temmerman R., et al.; 2002).

Απομόνωση-Ταυτοποίηση

Από το σύνολο των γιαουρτιών που εξετάστηκαν, βρέθηκε σε ένα μόνο δείγμα, ότι περιέχεται εντερόκοκκος (*Enterococcus hirrae*). Όσον αφορά στα βακτήρια του γένους *Streptococcus*, σε πολλά γιαούρτια ήταν δύσκολο να ταυτοποιηθούν. Το γεγονός αυτό προκύπτει διότι τα στελέχη αυτά είναι απομονώσεις από μικρές γαλακτοκομικές μονάδες, οι οποίες δεν χρησιμοποιούν καλλιέργειες εκκίνησης από γνωστές συλλογές. Αντίθετα χρησιμοποιούν στελέχη φυσικού τύπου και μάλιστα τις περισσότερες φορές δεν είναι ταυτοποιημένα, και δεν υπάρχουν σε συλλογές μικροβιακών στελεχών. Αξίζει, λοιπόν, να ταυτοποιηθούν περαιτέρω με μοριακές τεχνικές και να φυλαχτούν σε κατάλληλες συνθήκες ως πολύτιμο βιολογικό υλικό.

Τα στελέχη των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν είναι τα αναμενόμενα, όπως έχουν αναφερθεί και σε παρόμοιες μελέτες (Temmerman R., et al., 2002; Sozzi T., 1980).

Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των στρεπτόκοκκων που απομονώθηκαν από τα 20 γιαούρτια, μόνο σε ένα γιαούρτι βρέθηκε ανθεκτικό στέλεχος για τη ριφαμπικίνη και αυτό είναι εντερόκοκκος. Γενικά για την ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από ποικίλες πηγές, ως προς την ριφαμπικίνη, έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται σε υψηλά ποσοστά. Στην παρούσα εργασία εμφανίζεται σε ποσοστό μόλις 3,33%, αλλά πρόκειται για ένα μόνο στέλεχος που εντοπίστηκε σε ένα μόνο δείγμα. (Quinones D., et al., 2005; Zouain M.G., 2001).

Το σύνολο των στελεχών των στρεπτόκοκκων που απομονώθηκαν από τα 20 γιαούρτια εμφάνισαν ευαισθησία στους 12 αντιβιοτικούς παράγοντες που εξετάστηκαν, ενώ η αντίστοιχη μελέτη των Ιταλών Sossi και Smiley (1980) έδειξε ανθεκτικότητα των στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά Gentamycin και Streptomycin (κοινοί αντιβιοτικοί παράγοντες που εξετάστηκαν και στη μελέτη μας) (Sozzi T., 1980).

Για την ανθεκτικότητα των λακτοβακίλλων στο CIP η βιβλιογραφία αναφέρει μειωμένη ευαισθησία και η ανθεκτικότητα είναι ενδογενής. Έτσι τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με παρόμοιες έρευνες αφού σε όλα τα δείγματα υπήρχαν στελέχη ανθεκτικά στο CIP (Katla A.K., et al., 2001).

Σε σχέση με την ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, βρέθηκαν 3 στελέχη ανθεκτικά εκ των οποίων τα 2 βρίσκονται στο ίδιο δείγμα. Επειδή η ανθεκτικότητα στην βανκομυκίνη φαίνεται ότι παρουσιάζει διαφορές σε επίπεδο είδους, δηλαδή στο *L. rhamnosus* είναι ενδογενής, ενώ σε άλλα είδη όπως το *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* δεν είναι, τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν ενδιαφέρον αν και είναι σε μικρό ποσοστό (Danielsen M., 2003; Hamilton-Miller J.M.T., 1998; Saarela M., 2001).

Ανθεκτικότητα στη Β σημειώθηκε σε ένα μόνο δείγμα γεγονός που συμφωνεί με τους Charteris W.P., et al., (1998) οι οποίοι προτείνουν ανθεκτικότητα στη Β σε ποσοστό 6,5% για τους λακτοβακίλλους. (Charteris W.P., et al., 1998a).

Τα ποσοστά ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν για την ΑΝ και την Κ δεν είναι υψηλά. Αντιθέτως, οι Charteris W.P., et al., (1998) αναφέρουν μειωμένη φυσική

ευαισθησία των λακτοβακίλλων στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά.(Charteris W.P., et al., 1998a).

Αξίζει, λοιπόν, να αναλυθούν περαιτέρω τα στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα με τεχνικές μοριακές, ώστε να ανιχνευτεί η ύπαρξη πλασμιδίων που μπορούν να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας.

Τελικά τα γιαούρτια της συγκεκριμένης γεωγραφικής περιοχής, η οποία είναι κατεξοχήν κτηνοτροφική, δεν φαίνεται να παρουσιάζουν πρόβλημα ως την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν.

Η διάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, αποτελεί ένα φαινόμενο, το οποίο απαιτεί για την αντιμετώπισή του να ληφθούν κοινές πολιτικές αποφάσεις ώστε να περιοριστεί η χρήση των αντιβιοτικών (Sorum H., L’Abee-Lund T.M., 2002, Barton M.D., 2000). Είναι πλέον δεδομένο ότι η αυξανόμενη χρήση αντιβιοτικών σε όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων αντιστοιχεί σε αυξανόμενη εμφάνιση ανθεκτικότητας ανάμεσα στα τροφογενή παθογόνα βακτήρια. Η σύγχρονη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην μείωση της χρήσης αντιβιοτικών παραγόντων σε όλα τα στάδια της πρωτογενούς παραγωγής και επεξεργασίας προϊόντων (γεωργία, κτηνοτροφία, αλιεία). Σημαντικό είναι επίσης, τα βακτηριακά στελέχη που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης πρέπει πρώτα να ελέγχονται για την παρουσία μεταθετών γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Συνεπώς, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων σχετίζεται άμεσα και με τη διατροφή.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adachi S.(1999) Lactic Acid Bacteria and the Control of Tumours. In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* , Wood Brian J.B.,ed., Aspen Publications, Gaithersburg , Maryland,pp.233-261.
- Adolfsson O., Meydani S.N. and Russell R.M.(2004). Yoghurt and gut function. *Am J Clin Nutr.*, 80, 245-56.
- Aldinucci C., Bellussi L., Monciatti G., Passali GC., Salerni L., Passali D. and Bocci V. (2002) Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *Eur. J Clin Nutr.*,56(12),1155-61.
- Antonopoulou S., Semidalas CE., Koussissis S., Demopoulos C. (1996). Platelet-activating factor(PAF) antagonists in foods : A study of lipids with PAF or anti-PAF like activity in cow's milk and yoghurt. *J Agric Food Chem*, 44, 3047-3051.
- Barton M.D.(2000) Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr.Res Rev*, 13,279-99.
- Charteris W.P., Kelly M.P., Morelli L. and Collins K. (1998a) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection* , 61(12), 1636-1643.
- Charteris W.P., Kelly M.P., Morelli L. and Collins K. (1998b) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal track. *Lett Appl Microbiol*, 26, 337-7.
- Collee J.G.(1996) Practical Medical Microbiology ,14th ed., Churchill Livingstone, New York.
- Danielsen M. and Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*, 82, 1-11.
- De Moreno de Leblanc A. and Perdigon G. (2004) Yoghurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit.* , 10(4), BR96-104.
- Doleyres Y., Fliss I. and Lacroix C. (2003) Changes of lactic and probiotic characteristics during continuous immobilized-cell fermentation with mixed strains.[online] <http://www.theses.ulaval.ca/2003/20742/ch05.html>
- El-Zahar K. , Chobert J.M., Sitohy M. , Dalgalarondo M. and Haertle T. (2003) Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage. *Nahrung* ,47(3), 199-206.

- FAO (AGENTA ITEM 5) Consideration of draft standards and related texts [9].[online]
<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4800E/Y4800e07.htm-54k>
- FAO/WHO Food Standards Codex Alimentarius (1976) Codex Standards for flavoured yoghurt and products heat-treated after fermentation.Codex Stan A-11(b). [online]
<http://www.ipfsaph.org/id/codex x 183-15k>
- Fernandes C.F., Chandan R.C. and Shahani K.M. (1999) Fermented Dairy Products and Health. In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* , Wood , Brian J.B.,ed., Aspen Publications, Gaithersburg , Maryland,pp.297-339.
- Florez A.B., Delgado S. and Mayo B.(2005) Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J.Microbiol.*, 51, 51-58.
- Franz C.M.A.P., Hozapfel W.H. and Stiles M.E. (1999) *Enterococci* at the crossroads of food safety? *Int JFood Microbiol*, 47, 1-24.
- Ginovart M., Lopez D., Valls J. and Silbert M. (2002) Simulation modelling of bacterial growth in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*,73,415-425.
- Halami P.M., Chandrashekar A. and Nand K. (2000) *Lactobacillus farcimidis* MD , a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Lett Appl Microbiol*, 30(3), 197-202.
- Hamilton-Miller J.M.T. and Shah S. (1998) Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of *Lactobacilli*. *Lett Appl Microbiol*, 26, 153-4.
- Heyman M.(2000) Effect of Lactic Acid Bacteria on Diarrheal Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(90002),137S-146S.
- Katla A-K., Kruse H., Johnsen G.,Herikstad H. (2001) Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 147-52.
- Kiessling G., Schneider J. and Jahreis G. (2002) Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J Clin Nutr.*,56(9),843-9.
- Madigan M.T., Martinko M.J., Parker J. (1997) Normal flora of the gastrointestinal track. In *Biology of microorganisms*, 8th ed., Brock, ed., Prentice Hall International,Inc., pp. 792.
- Madigan M.T., Martinko M.J., Parker J. (1997) Procaryotic Diversity Bacteria. In *Biology of microorganisms*, 8th ed., Brock, ed., Prentice Hall International,Inc., pp.718.
- Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I.G. and Alifantakis E.M. (2003) Evolution of microbial population during manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*,78,43-56.

- Muyanja C.M.B.K., Narvhus J.A., Treimo J. and Langsrud T. (2002) Isolation ,characterisation and identification of lactic acid bacteria from *bushera*: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* ,80,201-210.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals—Second Edition: Approved Standard M31-A2. NCCLS, Villanova, PA,USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.(2003a). Approved standard M2-A8.Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th ed., NCCLS, Wayne , Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.(2003b).M100-S13(M2) Disk Diffusion Supplemental Tables, NCCLS, Wayne, Pa.
- Quinones D., Goni P., Rubio C.M., Duran E., Gomez-Lus R. (2005) Enterococci spp. Isolated from Cuba : species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 51, 63-7.
- Robinson R.K., Tamime A.Y. and Wszolek M. (2002) Microbiology of fermented milks. In *Dairy Microbiology Handbook*, 3rd ed., Robinson R.K.,ed.,Wiley Interscience, New York, pp.367-430.
- Roos N.M. and Katan M.B.(2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.*, 71,405-11.
- Saarela M., Matto J., Mattila-Sandholm T.(2002) Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal track or from probiotic products. *Microb Ecol Health Dis*, 14, 233-40.
- Sodini I., Remeuf F., Haddad S. and Corrieu G. (2004) The relative effect of milk base ,starter, and process on yoghurt texture: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 44(2), 113-37.
- Sørum H., L’Abée-Lund T.M.(2002) Antibiotic resistance in food related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*,78,43-56.
- Sozzi T. and Smiley M.B.(1980) Antibiotic resistances of yogurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(5), 862 – 865.

- Stiles M.E. and Holzapfel W.H. (1997) Lactic Acid Bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Tamine A.Y. (2002) Microbiology of starter cultures. In *Dairy Microbiology Handbook*, 3rd ed., Robinson R.K., ed., Wiley Interscience, New York, pp. 261-366.
- Temmerman R., Pot B., Huys G. and Swings J. (2002) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1-10.
- Teuber M. (1999) Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol Life Sci*, 56, 755-63.
- Teuber M., Meile L. and Schwarz F. (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 115-37.
- Tomioka H. and Saito H. (1999) Lactic Acid Bacteria in the Support of Immuno-compromised Host. In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Wood, Brian J.B., ed., Aspen Publications, Gaithersburg, Maryland, pp. 263-295.
- Zouain M.G., Araj G.F. (2001) Antimicrobial resistance of *Enterococcus* in Lebanon. *Intern J Antimicrob Agents*, 17, 209-213.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αργύρης Ι., Κοτσιφάκη Ε., Μάργαρης Ν., Μάρκου Σ., Παπαδόπουλος Ν., Παπαφίλης Α., Παταργιάς Θ. και Σέκερης Κ. (1992) Μικροβιολογία.. In *Βιολογία Γ' Λυκείου* .Οργανισμός εκδόσεων διδακτικών βιβλίων ,Αθήνα , σελ.115-163.

Μπόσκου Γ. (2005) Ασφάλεια και ποιότητα τροφίμων. In *Οργάνωση και Διαχείριση Μονάδων Διατροφής* .σελ. 81-130.

Μπόσκου Γ. (2005) Επισήμανση των τροφίμων. In *Οργάνωση και Διαχείριση Μονάδων Διατροφής* .σελ. 73-80.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων-Παραγωγικοί κλάδοι(2004) Στατιστικά στοιχεία ζωικού κεφαλαίου κατά νομό.[online] <http://www.ypge.gr/scripts/zoa-nomo.pl.cgi?nomos=26>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ