

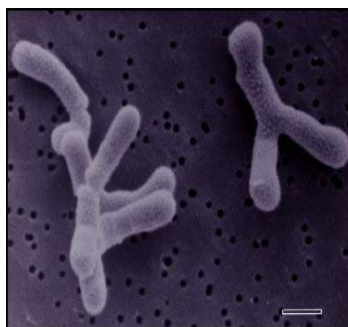
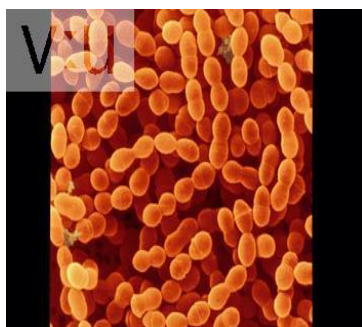
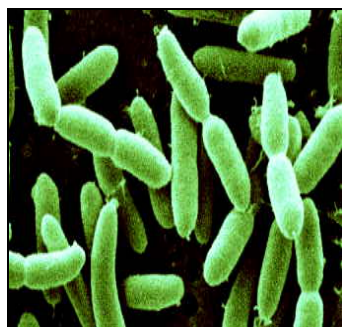
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή μελέτη

**Απομόνωση και ταυτοποίηση Οξυγαλακτικών Βακτηρίων
από γιαούρτια της ελληνικής αγοράς
Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά**

Γαζής Γιώργος

ΑΜ: 20105



Εξεταστική επιτροπή

Γιαννακούλια Μαίρη, Λέκτορας

Καραθάνος Βάϊος, Αναπληρωτής καθηγητής

Κυριακού Αδαμαντίνη, Λέκτορας

Καλλιθέα, Οκτώβριος 2006

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή μελέτη

Απομόνωση και ταυτοποίηση
Οξυγαλακτικών Βακτηρίων
από γιαούρτια της ελληνικής αγοράς
Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Καλλιθέα, Οκτώβριος 2006

Η πτυχιακή μελέτη είναι αφιερωμένη στην υπεύθυνη καθηγήτρια Μαντώ Κυριακού, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την Εύη Μήτσου για την υπομονή της και την ατελείωτη βοήθεια και καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και σε όλα τα παιδιά που δουλεύουν στο εργαστήριο για την παρέα τους και την βοήθειά τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη	Σελ.
A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
Κεφάλαιο 1 ^ο	
1. Το γιαούρτι στην διατροφή	7
1. 1. Εισαγωγή	7
1. 2. Τρόπος παρασκευής γιαουρτιού-είδη γιαουρτιού	7
1. 3. Προδιαγραφές και νομοθετικό πλαίσιο για τα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος	8
1. 4. Διατροφική αξία του γιαούρτι	10
1. 5. Γιαούρτι και εντερική λειτουργία	12
1. 6. Γιαούρτι και ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος	13
Κεφάλαιο 2 ^ο	
2. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος	20
2. 1. Ταξινόμηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος	21
2. 2. Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων	22
2. 3. Είδη γαλακτικών βακτηρίων στα γιαούρτια	23
2. 4. Καλλιέργειες εκκίνησης	27
2. 5. Ταξινόμηση των γαλακτοκομικών καλλιιεργειών εκκίνησης	28
2. 6. Διατήρηση και ασφάλεια τροφίμων	30
2. 7. Λειτουργικά τρόφιμα	32
Κεφάλαιο 3 ^ο	
3. Η χρήση των αντιβιοτικών και η εμφάνιση των ανθεκτικών βακτηρίων	37
3. 1. Η χρήση των αντιβιοτικών στις κτηνοτροφικές μονάδες	37
3. 2. Υπολείμματα αντιβιοτικών στα τρόφιμα	39
3. 3. Διάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων	40
3. 4. Ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά	43
3. 4. 1. Ενδογενής ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων	43
3. 4. 2. Πλασμίδια	44
3. 4. 3. Μεταθετά στοιχεία DNA (transposons) στα γαλακτοκομικά προϊόντα	45
3. 4. 4. Συζευκτική (conjugative) μεταφορά μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων	45
3. 5. Ανθεκτικότητα και ευαισθησία στα αντιβιοτικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα	48

B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4 ^ο	Σκοπός της μελέτης	51
4.		
Κεφάλαιο 5 ^ο		
5.	Υλικά και μέθοδοι	52
5. 1.	Περιγραφή του δείγματος	52
5. 2.	Υλικά και θρεπτικά ποστώματα	52
5. 3.	Παραλαβή και απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	53
5. 4.	Ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων	56
5. 5.	Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	59
5. 6.	Μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας	62

Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 6 ^ο		
6.	Αποτελέσματα	64
6. 1.	Το δείγμα μελέτης	64
6. 2.	Καταμέτρηση και απομόνωση των βακτηριακών πληθυσμών	65
6. 2. 1.	Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους <i>Streptococcus</i>	65
6. 2. 2.	Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους <i>Lactobacillus</i>	69
6. 2. 3.	Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους <i>Bifidobacterium</i>	73
6. 3.	Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών	74
6. 3. 1.	Ταυτοποίηση στελεχών στρεπτόκοκκων	74
6. 3. 2.	Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	75
6. 4.	Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	76

Συζήτηση

Κεφάλαιο 7 ^ο		
7. 1.	Καταμέτρηση πληθυσμών	81
7. 2.	Ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν	82
7. 3.	Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	83

Βιβλιογραφία	85
---------------------	----

Περίληψη

Από την αρχαιότητα έως και σήμερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων (γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, φυτικά προϊόντα, ποτά κ.α.). Το γιαούρτι είναι από τα πιο γνωστά ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και σήμερα υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία γιαουρτιών που κυκλοφορούν στην εγχώρια και την διεθνή αγορά.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχει αποδειχτεί ότι βοηθούν στην καλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος και βοηθούν στην πρόληψη και θεραπεία αρκετών ασθενειών, όπως οι διάρροιες και ο καρκίνος του παχέος εντέρου.

Τις τελευταίες δεκαετίες δόθηκε μεγάλη έμφαση στη μελέτη των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, ανθρώπινης και κτηνιατρικής χρήσης, μη παθογόνων βακτηρίων που παίρνουν μέρος σε μικροβιακές ζυμώσεις στα τρόφιμα. Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών που απομονώνονται από τα τρόφιμα, αποτελεί πλέον έναν σημαντικό παράγοντα για την ασφάλεια των τροφίμων.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο έλεγχος των συγκεντρώσεων των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που περιέχονται σε γιαούρτια της ελληνικής αγοράς, η ταυτοποίησή τους και ο έλεγχος για την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν 30 γιαούρτια, 10 επιδόρπια γιαουρτιού και 2 ξινόγαλα. Στα δείγματα που εξετάστηκαν έγινε καταμέτρηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Στη συνέχεια έγιναν απομονώσεις τυχαίων βακτηριακών στελεχών από τα γένη αυτά και ακολούθησε ταυτοποίηση ορισμένων στελεχών από αυτά.

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε ότι τα στελέχη των στρεπτόκοκκων ήταν τα πιο ευαίσθητα, ενώ οι λακτοβάκιλλοι εμφάνισαν ποικίλα επίπεδα ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

1. Το γιαούρτι στην διατροφή

1. 1. Εισαγωγή

Το γιαούρτι είναι γνωστό από την αρχαιότητα, αφού υπάρχουν αναφορές για την μαλακτική και καθαρτική επίδρασή του στο έντερο από τον γιατρό Γαληνό (1^{ος} – 2^{ος} π.Χ. αι.). Το 1908 ο Dr. Elie Metchnikoff ανακάλυψε την βελτιωτική επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων του γιαουρτιού στην υγεία και την μακροημέρευση. Μετά τον Πρώτο Παγκόσμιο πόλεμο το γιαούρτι διαδόθηκε ευρύτατα στις διάφορες χώρες της Ευρώπης, ενώ σήμερα έχει μια διαφορετική εικόνα απ' ότι ήταν στο παρελθόν και καταναλώνεται ευρύτατα. Έχει σταθερή γεύση, ποιότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και καταναλώνεται σκέτο, με μέλι, με φρούτα, με δημητριακά και με ξηρούς καρπούς.

Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, γιαούρτι ονομάζεται << το προϊόν πήξης νοπού γάλατος αντίστοιχης προέλευσης (αγελαδινό, πρόβειο κλπ), εξαιτίας της επίδρασης σε αυτό κατάλληλης ζύμης, που προκαλεί την πήξη>> (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 1972). Ο Codex Alimentarius του 1992 περιγράφει το γιαούρτι ως προϊόν πηγμένου γάλατος, που προκύπτει από τη ζύμωση των σακχάρων του προς γαλακτικό οξύ, από τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι ζωντανοί, ενεργοί και άφθονοι στο τελικό προϊόν.

1. 2. Τρόπος παρασκευής γιαουρτιού - Είδη γιαουρτιού

Πριν την παρασκευή του γιαουρτιού ακολουθούνται ορισμένες απαραίτητες διαδικασίες: αρχικά το γάλα θερμαίνεται, ανεξαρτήτως αν έχει προηγηθεί παστερίωση, στους 85-95° C έως 5 λεπτά. Στη συνέχεια το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία 40-42° C και εμποτίζεται με πρόσφατα ετοιμασμένη καλλιέργεια των οξυγαλακτικών στελεχών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, σε αναλογία 0,5-3% και σε πληθυσμιακή αναλογία μικροοργανισμών 1/1. Έπειτα τοποθετείται σε κεσεδάκια και επωάζεται στους 43° C

για 2-3 ώρες, οπότε επέρχεται πήξη του γάλατος και η μετατροπή του σε γιαούρτι (Μάντης Α., 1993).

Το γιαούρτι συντηρείται για 1-6 εβδομάδες, ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης. Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών δίνει στο γιαούρτι χρόνο συντήρησης δεκαπέντε ημερών στη θερμοκρασία των 0-2° C.

Είδη γιαουρτιού

Το γιαούρτι διακρίνεται ανάλογα:

- 1) Με το είδος του γάλατος (αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο)
- 2) Με τον τρόπο επεξεργασίας σε: παραδοσιακό, παραδοσιακό στραγγισμένο, φυσικό, αναμιγμένο, επιδόρπιο γιαούρτι παστεριωμένο και επιδόρπιο γιαούρτι στραγγισμένο νέου τύπου.
- 3) Με την περιεκτικότητά του σε λιπαρά: πλήρες (6-10%), ημιαποβουτυρωμένο (1,5-5%) και άπαχο (0%)

1. 3. Προδιαγραφές και νομοθετικό πλαίσιο για τα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος

Ορισμένες χώρες έχουν θεσπίσει μικροβιολογικές προδιαγραφές σύμφωνα με τις οποίες τα γιαούρτια πρέπει να περιέχουν ζωντανά οξυγαλακτικά βακτήρια σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Σύμφωνα με το National Yogurt Association των Η.Π.Α. το ζωντανό γιαούρτι ενεργής καλλιέργειας πρέπει να περιέχει ζωντανά οξυγαλακτικά βακτήρια σε πληθυσμούς μεγαλύτερους από 10^8 βακτήρια/ g τη στιγμή παραγωγής και οι καλλιέργειες αυτές πρέπει να παραμένουν ενεργές μέχρι την ημερομηνία λήξης του γιαουρτιού. Τους ίδιους πληθυσμούς με τις Η.Π.Α. έχει ορίσει και η Δανία, ενώ η Γαλλία ορίζει ως απαραίτητη την ύπαρξη 10^7 οξυγαλακτικών βακτηρίων/g και η Ελβετία την ύπαρξη 10^6 οξυγαλακτικών βακτηρίων/g (Μάντης, 1993, Sozzi και Smiley, 1980).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση προετοιμάζει σχέδιο για τη νομοθετική ρύθμιση των χαρακτηριστικών των διαφόρων ειδών γιαουρτιού που κυκλοφορούν στα κράτη μέλη της (Κεχαγιάς, 2004). Τα κυριότερα σημεία είναι:

- Ο συνολικός αριθμός των χαρακτηριστικών μικροοργανισμών των γιαουρτιών (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) πρέπει κατά την ημερομηνία της ελάχιστης διατηρησιμότητας να είναι 10^7 cfu/g.
- Δίνεται η δυνατότητα να αντικατασταθεί ο *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* με άλλο μικροοργανισμό του γένους *Lactobacillus*, με την προϋπόθεση ότι θα διευκρινίζεται η τροποποίηση δίπλα από τη λέξη γιαούρτι.
- Είναι δυνατή η προσθήκη άλλων μικροοργανισμών (πχ. *Bifidobacteria*) μαζί με τα χαρακτηριστικά οξυγαλακτικά βακτήρια του γιαουρτιού, για να αναγραφεί όμως στη συσκευασία θα πρέπει ο προστιθέμενος μικροοργανισμός να έχει πληθυσμό τουλάχιστον 10^6 cfu/g στο τελικό προϊόν.
- Σε περίπτωση που γίνει θερμική επεξεργασία μετά τη ζύμωση σε κάποιο γιαούρτι, αφήνονται περιθώρια στις χώρες (εφόσον υπάρχει σχετική νομοθεσία) να μη χρησιμοποιούν την ειδική ονομασία του προϊόντος, αφού έχουν μεταβληθεί οι χαρακτηριστικές ιδιότητες και η ζωτικότητα των μικροοργανισμών. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο όρος <<προϊόν ζύμωσης γάλακτος>>, σε συνδυασμό με τη δήλωση ότι το προϊόν έχει υποστεί θερμική επεξεργασία μετά τη ζύμωση.

Στην Ελλάδα, παρόλο που η κατανάλωση γιαούρτης είναι αρκετά αυξημένη, η νομοθεσία δεν έχει προσαρμοστεί και δεν ανταποκρίνεται στις νέες προδιαγραφές της Ε.Ε. Έτσι, στον ορισμό της γιαούρτης δεν αναφέρονται τα είδη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται και δεν καλύπτονται θέματα όπως ο πληθυσμός τους κατά την πώληση, ή η ονοματολογία σε περίπτωση αντικατάστασης ή προσθήκης άλλου μικροοργανισμού. Ακόμη, δεν έχει καθιερωθεί ο όρος <<ζυμωμένα γάλατα>>, παρόλο που κυκλοφορούν και άλλα προϊόντα εκτός από το γιαούρτι (π.χ. βουτυρόγαλα ή κεφίρ), καθώς και προϊόντα με προβιοτικούς οργανισμούς (Κεχαγιάς, 2004). Τέλος, θα μπορούν να διακινούνται στην αγορά ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα με μεγάλη διάρκεια ζωής (θερμικώς επεξεργασμένα), ανταγωνίζοντας παραδοσιακά προϊόντα όπως το γιαούρτι, αφού θα μπορούν να εμφανίζονται με το ίδιο όνομα.

1. 4. Διατροφική αξία του γιαουρτιού

Η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε θρεπτικά συστατικά εξαρτάται από τη σύσταση του γάλακτος από το οποίο προέρχεται, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως οι γενετικές και οι ατομικές διαφορές των γαλακτοπαραγωγών ζώων, η διατροφή τους, η ηλικία, η περίοδος γαλουχίας και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο κατά την επεξεργασία του γάλατος, περιλαμβάνοντας την θερμοκρασία και τον χρόνο έκθεσης στην θερμότητα, την έκθεση στο φως και τις συνθήκες αποθήκευσης, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος. Τέλος, η σύσταση του γιαουρτιού επηρεάζεται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης και εξαρτάται από τα βακτηριακά στελέχη που θα επιλεγούν και τη θερμοκρασία και διάρκεια της ζύμωσης.

Βιταμίνες του συμπλέγματος Β

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται γενικότερα ως εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών βιολογικής αξίας, ασβεστίου, καλίου, φωσφόρου, μαγνησίου, ψευδάργυρου και των βιταμινών της ομάδας Β, ριβοφλαβίνης, νιασίνης, Β-6 και Β-12. Η απώλεια των βιταμινών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των μετάλλων, λόγω της ευαισθησίας τους σε αλλαγές του περιβάλλοντος. Μερικοί παράγοντες που προκαλούν την απώλεια βιταμινών κατά τη διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού είναι η θερμοκρασία, η παστερίωση, η υπερδιήθηση και η ανάδευση (Buttriss, 1997). Επιπλέον, το περιεχόμενο του τελικού προϊόντος σε βιταμίνες επηρεάζεται και από τη δράση των βακτηριακών καλλιιεργειών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρειάζονται βιταμίνες του συμπλέγματος Β για την ανάπτυξή τους, ενώ υπάρχουν και στελέχη που μπορούν να παράγουν βιταμίνες, με καλύτερο παράδειγμα την σύνθεση φυλικού οξέος από βακτήρια που ανήκουν στα γένη *S. thermophilus* και *Bifidobacterium* (Crittenden, 2003).

Λακτόζη

Πριν τη ζύμωση η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε λακτόζη είναι περίπου 6%. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το 20-30% του δισακχαρίτη λακτόζη υδρολύεται στα συστατικά του, τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη. Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης εξηγεί γιατί το γιαούρτι είναι καλύτερα ανεκτό σε άτομα με δυσανοχή στη λακτόζη (Vesa 2000, Kolars 2004).

Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του γιαουρτιού που κυκλοφορεί στο εμπόριο είναι γενικότερα μεγαλύτερη από αυτή του γάλατος, εξαιτίας της προσθήκης σκόνης από άπαχο γάλα, η οποία αυξάνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του τελικού προϊόντος. Υποστηρίζεται ότι η πρωτεΐνη του γιαουρτιού είναι πιο εύπεπτη από αυτή του γάλατος, καθώς έχει προηγηθεί μια υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλατος από τα βακτήρια του γιαουρτιού. Αυτό αποδεικνύεται από την ύπαρξη υψηλότερης περιεκτικότητας σε ελεύθερα αμινοξέα στο γιαούρτι, ειδικότερα προλίνης και γλυκίνης, από το γάλα. Κάποια βακτηριακά στελέχη έχουν δείξει ότι έχουν μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα από άλλα, όπως για παράδειγμα το *L. bulgaricus* σε σχέση με το *S. thermophilus*. (Beshkova, 1998). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η θερμική επεξεργασία και η παραγωγή γαλακτικού οξέος, έχουν ως αποτέλεσμα τη λεπτότερη πήξη της καζεΐνης κάνοντάς την πιο εύπεπτη. Η βιολογική αξία των πρωτεϊνών του γιαουρτιού είναι πολύ υψηλή, όπως του γάλατος, γιατί δεν μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τόσο οι καζεΐνες, όσο και η πρωτεΐνες ορού είναι πλούσιες πηγές όλων των απαραίτητων αμινοξέων, με μεγάλη εντερική διαθεσιμότητα του οργανικού αζώτου, που φτάνει το 93% (Bissonnette και Jeejeebhoy 1994, Gaudichon και συν. 1994).

Λιπίδια

Το λίπος του γάλατος υφίσταται επίσης βιοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων ελευθερώνονται με τη δράση των λιπασών. Ωστόσο, βρέθηκε ότι το γιαούρτι έχει υψηλότερες συγκεντρώσεις συζευγμένου λινολενικού οξέος από το γάλα, το οποίο φαίνεται ότι

προσδίδει αντικαρκινικές ιδιότητες και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (Whigham, Cook και Atkinson, 2000).

Μέταλλα

Το γιαούρτι είναι πολύ καλή πηγή ασβεστίου και φωσφόρου. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γάλα, το γιαούρτι και το τυρί, παρέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό ασβεστίου υψηλής βιοδιαθεσιμότητας στη διατροφή δυτικού τύπου. Οι φυτικές ίνες μειώνουν την απορρόφηση του ασβεστίου, όμως χάρη στο χαμηλό pH του γιαουρτιού ελαττώνεται η ανασταλτική δράση των φυτικών οξέων και αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα του ασβεστίου. Επίσης, το χαμηλότερο pH του γιαουρτιού σε σχέση με το γάλα προκαλεί τον ιονισμό του ασβεστίου, το οποίο με τη μορφή ιόντων απορροφάται ευκολότερα από το έντερο (Bronner F και Pansu D, 1999). Κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στην απορρόφηση του ασβεστίου στο έντερο παίζει η βιταμίνη D (Norman AW, 1990).

1. 5. Γιαούρτι και εντερική λειτουργία

Έχει προταθεί ότι το γιαούρτι και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυτού συμβάλλουν στη υγεία του γαστρεντερικού συστήματος. Συγκεκριμένα συμβάλλουν στη σύνθεση της γαστρεντερικής χλωρίδας, στην ανοσολογική απάντηση και στην χαλαρότητα του εντέρου.

Εντερική χλωρίδα

Οι λακτοβάκιλλοι ανήκουν στα συστατικά της εντερικής χλωρίδας στο λεπτό και το παχύ έντερο. Η ικανότητα της μη παθογόνου εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, στην οποία ανήκουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, να δεσμεύεται στο εξωτερικό άκρο του εντερικού ιστού, εμποδίζει την πρόσβαση παθογόνων μικροβίων στο γαστρεντερικό βλεννογόνο. Έχει βρεθεί ότι ο *L. acidophilus* προκαλεί μια μέτρια αναστολή στην προσκόλληση των εντεροπαθογόνων *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* στα εντεροκύτταρα Caco-2, καθώς επίσης και ότι αναστέλλει την

εισαγωγή των *E. coli*, *S. typhimurium* και *Yersinia pseudotuberculosis* στα εντεροκύτταρα Caco-2 (Bernet, Brassard, Neeser, Servin, 1994).

Η επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων εξαρτάται από την ικανότητα επιβίωσής τους στον εντερικό σωλήνα, η οποία επηρεάζεται από το γαστρικό pH και την έκθεση σε πεπτικά ένζυμα και χολικά άλατα. Η ικανότητα επιβίωσης στο γαστρεντερικό περιβάλλον διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, για παράδειγμα το *Bifidobacterium longum* είναι πιο ανθεκτικό στο γαστρικό οξύ από ότι τα *B. Infantis* και *B. bifidus*.

Εντερική ανοσολογική απάντηση

Ο βλεννογόνος λεμφοειδής ιστός του γαστρεντερικού σωλήνα είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού στα παθογόνα μικρόβια που μεταφέρονται την τροφή. Η αλληλεπίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων με το επιθήλιο του βλεννογόνου και τα λεμφοειδή κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελεί το σημαντικότερο μηχανισμό με τον οποίο τα οξυγαλακτικά βακτήρια ενισχύουν την ανοσολογική λειτουργία του εντέρου. Αρκετοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί ότι συμβάλουν στην ανοσολογική ρύθμιση και αντιμικροβιακή δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβάνοντας την παραγωγή χαμηλού pH, οργανικών οξέων, CO₂, υπεροξειδίου του υδρογόνου, βακτηριοσινών, αιθανόλης, διακετύλιου και τον ανταγωνισμό του διαθέσιμου ζωτικού χώρου. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που περιέχονται σε ζυμωμένα προϊόντα γάλατος βρέθηκε ότι προκαλούν την αύξηση της σύνθεσης IgA και sIgA στο έντερο, καθώς και τον αριθμό των μακροφάγων και την φαγοκυτταρική δραστηριότητα.

1. 6. Γιαούρτι και ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος

Τα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος σχετίζονται με την βελτίωση της υγείας στους ανθρώπους γιατί, εκτός από την θρεπτική τους αξία, κάποια στελέχη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που περιέχουν βοηθούν στη διατήρηση μιας ισορροπημένης εντερικής χλωρίδας. Η θετική αυτή επίδραση στο εντερικό περιβάλλον μπορεί να συμβάλλει στην καταπράυνση των διαρροιών, μπορεί να αυξήσει την ανοχή στη λακτόζη στα ευαίσθητα άτομα και να ρυθμίσει την ανοσολογική απάντηση. Μερικές

επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια μείωση στις περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου σε άτομα που καταναλώνουν ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα ή γιαούρτι (Peters και συν., 1992), ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπήρχε κάποια επίδραση ή και ότι αυξανόταν το ρίσκο εμφάνισης καρκίνου (Karman και συν., 1994, Kearney και συν., 1996).

Έλλειψη λακτάσης και δυσανοχή στη λακτόζη

Η έλλειψη λακτάσης είναι η συχνότερη ενζυμική έλλειψη στους ενήλικες και περισσότερο από το μισό του πληθυσμού των ενηλίκων έχει δυσανοχή στη λακτόζη. Στην δυσανοχή της λακτόζης η άπεπτη λακτόζη ζυμώνεται από τα βακτήρια του παχέος εντέρου, παράγοντας λιπαρά οξέα μικρής αλύσου, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν διάρροια, και αέρια, όπως μεθάνιο, υδρογόνο, και διοξείδιο του άνθρακα, τα οποία μπορούν να παραμείνουν στον εντερικό αυλό και από εκεί να περάσουν στην κυκλοφορία και τελικά να αποβληθούν από τους πνεύμονες.

Τα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος, όπως το γιαούρτι, είναι καλύτερα ανεκτά στα άτομα που πάσχουν από δυσανοχή στη λακτόζη λόγω της μερικής υδρόλυσης που υπόκειται η λακτόζη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρότερη συγκέντρωση αυτής στο γιαούρτι από ότι στο γάλα. Η μεγαλύτερη ανοχή της λακτόζης στο γιαούρτι από ότι στα άλλα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος, πιθανώς να οφείλεται στην ενδογενή δραστικότητα της λακτάσης από τους μικροοργανισμούς του γιαουρτιού. Η ενζυμική δραστικότητα της λακτάσης γενικά δεν μεταβάλλεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ωστόσο, η θέρμανση του γιαουρτιού κατά την διάρκεια της παστερίωσης μειώνει σημαντικά τη δραστικότητα της λακτάσης και τον αριθμό των ζωντανών οξυγαλακτικών βακτηρίων, αποδεικνύοντας ότι τα γιαούρτια που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία δεν είναι τόσο κατάλληλα για άτομα με δυσανοχή στη λακτόζη, όσο τα γιαούρτια με ζωντανές και ενεργές καλλιέργειες.

Διαρροϊκές ασθένειες

Οι διάρροιες είναι ένα από τα συχνά προβλήματα των παιδιών παγκοσμίως. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα έχει προταθεί ότι ζωντανές βακτηριακές καλλιέργειες, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση των γαλακτικών προϊόντων, ίσως μπορούν να βοηθήσουν στην πρόληψη και αντιμετώπιση των διαρροϊκών ασθενειών.

Σε μια πρόσφατη μετά-ανάλυση από μελέτες με ομάδες ελέγχου (Van Neil και συν., 2002) βρέθηκε ότι η θεραπευτική αγωγή που χρησιμοποιούσε στελέχη λακτοβακίλλων πρόσφερε ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης οξείων μολυσματικών διαρροιών, που προκλήθηκαν από ποικίλα παθογόνα μικρόβια. Τα αποτελέσματα μελέτης με βρέφη, που τους χορηγήθηκε συμπλήρωμα με *B. bifidus* και *S. thermophilus*, έδειξαν ότι υπάρχει θεραπευτική επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων στην αντιμετώπιση ιϊκών διαρροιών (Saavedra και συν., 1994). Άλλη έρευνα έδειξε την ικανότητα αρκετών προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων στην πρόληψη διαρροιών προκαλούμενες από αντιβιοτικά (D'Souza, 2002).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν αποτελεσματικά ενάντια σε κάποιες μορφές διαρροϊκών ασθενειών δεν έχουν γίνει προς το παρόν γνωστοί. Έχει προταθεί ότι η θεραπευτική δράση οφείλεται στην ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να αποκαθιστούν την ισορροπία στην εντερική χλωρίδα, και να αυξάνουν το εντερικό φορτίο ανταγωνιζόμενα την προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων στα εντεροκύτταρα ή αυξάνοντας την επιθηλιακή IgA ως απάντηση στα αντιγόνα των παθογόνων βακτηρίων.

Καρκίνος του παχέος εντέρου.

Τα γιαούρτια που περιέχουν οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη μεταστατικών ή χημικά προκαλούμενων όγκων, όπως φάνηκε σε μελέτες σε ζώα. Ωστόσο τα αποτελέσματα επιδημιολογικών ερευνών μεταξύ της κατανάλωσης ζυμωμένων προϊόντων γάλατος και της εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο είναι αντιφατικά, γιατί αν και η υψηλή κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να προστατεύσει στον καρκίνο του μαστού (Van't Veer και συν., 1991), φαίνεται ότι σχετίζεται με υψηλότερη εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών (Cramer και συν., 1989).

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο. Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Έρευνες αναφέρουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαιτητικών παραγόντων, του επιθήλιου του παχέος εντέρου και της εντερικής χλωρίδας έχουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης κάποιων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου, και της

πρόσληψης ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Peters και συν., 1992). Τα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος και τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για τη γαλακτική ζύμωση φαίνεται να έχουν επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και σε άλλες μορφές όγκων σε μελέτες ζώων (Wollowski και συν., 1999), ωστόσο, όπως φάνηκε, δεν έχουν όλα τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων την ικανότητα να εμποδίζουν την καρκινογένεση.

Η αυξημένη δραστικότητα κάποιων βακτηριακών ενζύμων που ανιχνεύονται στα κόπρανα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, και η δραστικότητα των ενζύμων αυτών επηρεάζεται από τη διατροφή ή και από την χρήση αντιβιοτικών. Τα *L. acidophilus* και *L. gasseri* φαίνεται να μειώνουν τη δραστικότητα αυτών των ενζύμων, και συγκεκριμένα της νιτρορεδουκτάσης, της αζωρεδουκτάσης και της β-γλυκορονιδάσης, στους ανθρώπους. Σε τυφλή έρευνα που έγινε σε βρέφη από τους Guerin-Danan και συν. (1998) βρέθηκε ότι τα βρέφη που κατανάλωναν γαλακτοκομικό προϊόν ζυμωμένο με *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, και *L. casei* εμφάνισαν χαμηλότερη δραστικότητα της β-γλυκορονιδάσης από τα βρέφη της ομάδας ελέγχου, που κατανάλωναν ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν χωρίς *L. casei*.

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι προς το παρόν άγνωστος. Μερικοί πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί αφορούν την καταστολή των επικίνδυνων εντερικών βακτηρίων, την απομόνωση των πιθανών μεταλλαξιογόνων, την σύνθεση αντιμεταλλαξιογόνων παραγόντων, τη μείωση του pH στο κόλον και την ενίσχυση της εντερικής ανοσολογικής απάντησης.

Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, IBD

Στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου περιλαμβάνονται η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα, οι οποίες έχουν παρόμοια συμπτωματολογία αλλά επηρεάζουν το γαστρεντερικό σύστημα με διαφορετικό τρόπο. Η ελκώδης κολίτιδα προκαλεί φλεγμονή στο κόλον και το ορθό, ενώ η νόσος του Crohn προκαλεί φλεγμονή στην ανώτερη εντερική πεπτική οδό και μπορεί να οδηγήσει σε δυσασπορρόφηση των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών. Η αιτιολογία αυτών των ασθενειών είναι άγνωστη, αλλά μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι η εντερική χλωρίδα παίζει ένα σημαντικό παθογενετικό ρόλο (Sartor, 1997).

Προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και συγκεκριμένα η TNF-a, έχουν αναγνωριστεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Crohn, και πιστεύεται ότι η μείωση της παραγωγής ή της δραστηριότητας των TNF-a μπορεί να ωφελήσει ασθενείς με νόσο Crohn. Έρευνες έδειξαν ότι με την παρουσία *L. casei* και *L. bulgaricus* στην εντερική χλωρίδα η παραγωγή και απελευθέρωση TNF-a μειωνόταν (Bouhret και συν., 2002). Ακόμα βρέθηκε πως όταν οι συγκεντρώσεις των λακτοβάκιλλων στον γαστρεντερικό σωλήνα επαναφερόταν σε φυσιολογικά επίπεδα, τα συμπτώματα της ελκώδους κολίτιδας μετριάζονταν.

Έχει αναφερθεί ότι οι ασθενείς με IBD έχουν μικρή τη βλεννογονική προστασία ως αποτέλεσμα των αλλαγών στη σύνθεση, το πάχος, τις γλυκό-πρωτεΐνες και του βλεννογόνου (McCormick και συν., 1990). Αυτές οι αλλαγές στον εντερικό βλεννογόνο συνδέονται επίσης με τη μειωμένη εντερική δραστηριότητα IgA και την αυξανόμενη δραστηριότητα IgG, η οποία συμπίπτει με τη μειωμένη ικανότητα προστασίας και την εμφάνιση μιας προ-φλεγμονώδους κατάστασης. Με τον αποδυναμωμένο βλεννογόνο ανίκανο να εμποδίσει την αυξανόμενη προσκόλληση των βακτηριακών παθογόνων πάνω του, η φλεγμονή παραμένει, και οδηγεί στην περαιτέρω ζημία στον εντερικό βλεννογόνο.

Αν και τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει μια θετική επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ασθενείς με νόσο του Crohn και ελκώδη κολίτιδα, ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν έχει πλήρως κατανοηθεί.

Helicobacter pylori

Η μόλυνση με *H. pylori* παίζει ρόλο στην εμφάνιση πεπτικού έλκους, χρόνιας γαστρίτιδας, γαστρικού αδενοκαρκινώματος και καρκίνου του δωδεκαδακτύλου. Αρκετές μελέτες σε ζώα έδειξαν μείωση στη διαθεσιμότητα του *H. pylori* και στη προσκόλληση των βακτηρίων στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα ύστερα από θεραπεία με διάφορα στελέχη λακτοβακίλλων (Midolo και συν., 1998). Επίσης βρέθηκε ότι 6 στελέχη του *L. acidophilus* και *L. casei* είχαν την ικανότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη του *H. pylori*, ενώ τα *B. bifidus* και *L. bulgaricus* δεν παρουσίασαν αντίστοιχα αποτελέσματα. Η ανασταλτική δράση σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος που παράγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Αν και υπάρχουν υποσχόμενα αποτελέσματα σχετικά με την αντιμετώπιση της μόλυνσης με *H. pylori* στους ανθρώπους, η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

παραμένει αμφίβολη. Για παράδειγμα, αν και τα *L. acidophilus* και *L. gasseri* έδειξαν να μειώνουν τα επίπεδα μόλυνσης με *H. pylori* και της φλεγμονής του εντερικού επιθήλιου, οι γαστρικές βιοψίες δεν έδειξαν πλήρη απομάκρυνση του *H. pylori*.

Αλλεργικές αντιδράσεις

Η δράση του γιαουρτιού και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις αλλεργικές αντιδράσεις βρίσκεται υπό έρευνα. Έχει αναφερθεί ότι η καθυστερημένη ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων και των λακτοβακίλλων στην εντερική χλωρίδα είναι ένα κοινό εύρημα σε παιδιά που παρουσιάζουν αλλεργικές αντιδράσεις (Kalliomaki και συν., 2003).

Η θερμική επεξεργασία του γάλατος έχει προταθεί ότι μειώνει την ικανότητα των πρωτεϊνών του γάλατος να προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις, μετατρέποντάς το σε κατάλληλη πηγή πρωτεΐνης για άτομα ευαίσθητα στην πρωτεΐνη αγελάδος του γάλατος (Guir και συν., 1984). Ωστόσο βρέθηκε ότι στα άτομα που παρουσιάζουν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα, η παρουσία ζωντανών γαλακτικών βακτηρίων μπορεί να προσφέρει περισσότερα οφέλη από τα θερμικώς επεξεργασμένα γάλατα. Επιπλέον, η ανοσοποιητική απάντηση στις εγγενείς πρωτεΐνες γάλακτος μπορεί να διαφέρει από αυτήν που προκαλείται από τις αλλοιωμένες με τη θερμότητα πρωτεΐνες γάλακτος (Kirjavainen και συν., 2003).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα γαλακτικά βακτήρια ασκούν προστατευτική δράση εναντίον των αλλεργιών παραμένουν άγνωστοι.

Αποδεδειγμένες και υποθετικές επιδράσεις από τα ζυμωμένα γάλατα (Fonden et al, 2000)

Αποδεδειγμένες επιδράσεις

- Ανακούφιση δυσανεξίας στη λακτόζη
- Ανακούφιση δυσκοιλιότητας
- Ενίσχυση της φυσικής ανοσίας
- Μείωση των μεταλλάξεων των εντερικών βακτηρίων
- Μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας των εντερικών βακτηρίων
- Εξισορρόπηση της εντερικής χλωρίδας
- Θεραπευτική αγωγή της οξείας παιδικής διάρροιας και της διάρροιας ιώσεων

Υποθετικές επιδράσεις

- Βελτίωση γενικής χώνευσης των θρεπτικών ουσιών
- Βραδύτερος ρυθμός εκκένωσης της εντέρου
- Πρόληψη και ανακούφιση δυσκοιλιότητας
- Βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα των ανόργανων στοιχείων
- Αυξημένη σύνθεση φολικού οξέος και βιταμινών Β
- Βελτιωμένη χώνευση λακτόζης
- Βελτιωμένη άμυνα ανοσοποιητικού συστήματος
- Αναχαίτιση αθηροσκλήρωσης
- Αντικαρκινικές ιδιότητες
- Πρόληψη διάρροιας παιδικής και ενηλίκων
- Διατήρηση ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας
- Αποκατάσταση της εντερικής χλωρίδας

Κεφάλαιο 2^ο

2. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτελούν μια ομάδα από Gram θετικά, μη σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση, αρνητικά στην καταλάση βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) σε γαλακτικό οξύ και ενέργεια. Εμφανίζονται σαν κόκκοι, κοκκοβάκιλλοι ή βάκιλλοι και βρίσκονται σε τρόφιμα, (γαλακτοκομικά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, ποτά κ.α.), φυτά, εντερική μικροχλωρίδα ανθρώπου και ζώων, αλλά και στη στοματική κοιλότητα και τον γυναικείο κόλπο. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella* (Stiles και Holzapfel, 1997). Οι *lactobacilli*, τα *carnobacteria* και μερικά βακτήρια του γένους *Weissella* έχουν σχήμα βάκιλλου, ενώ τα υπόλοιπα γένη έχουν σχήμα κόκκου (Axelson, 1998). Στο γιαούρτι συναντούμε στελέχη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc*, τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Characteristics for discrimination of lactic acid bacteria

Character	Carno- bacterium	Lacto- bacillus	Aero- coccus	Entero- coccus	Lactoco- coccus/ Vagno- coccus	Leuconostoc/ Oenococcus	Pedio- coccus	Strepto- coccus	Tetragenococcus	Weissella
Tetrad formation	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
CO ₂ from glucose	–	±	–	–	–	+	–	–	–	+
Growth at 10°C	+	±	+	+	+	+	±	–	+	+
Growth at 45°C	–	±	–	+	–	–	±	±	–	–
Growth at 6.5% NaCl	ND	±	+	+	–	±	±	–	+	±
Growth at 18% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Growth at pH 4.4	Ns	±	–	+	±	±	+	–	–	±
Growth at pH 9.6	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–
Lactic acid	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL

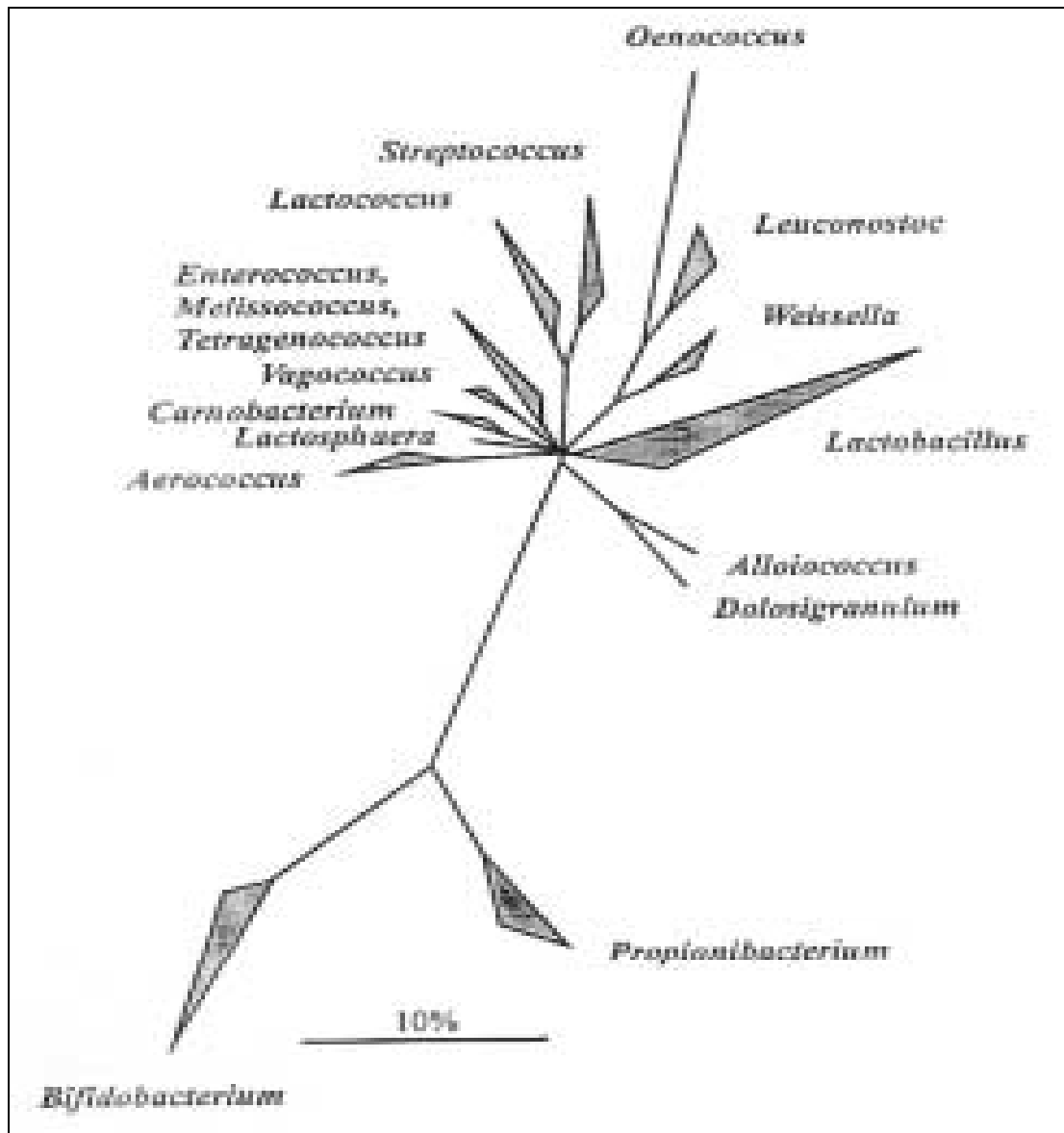
2. 1. Ταξινόμηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος

Η κλασική ταξινόμηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος βασίζεται σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, στα οποία περιλαμβάνονται η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα του κυττάρου και άλλα κυτταρικά χαρακτηριστικά. Πρόσφατα, στις τεχνικές ταξινόμησης έχουν προστεθεί και τα μοριακά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, όπως η ποσοστιαία ανά γραμμομόριο περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), η δομή και η αλληλουχία στην 16S rRNA, οι ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των προϊόντων των γονιδίων, η PFGE of digested chromosomal DNA (Tenover et al., 1995), κ.α.

Φυλογενετικά τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ανήκουν στη κλωστριδιακή υποομάδα των Gram⁺ βακτηρίων. Είναι αρνητικοί στην καταλάση, μη σποριογόνοι κόκκοι, κοκκοβάκιλλοι ή βάκιλλοι, που περιέχουν λιγότερο από 55% G + C/ mol στο DNA τους. Αυτό ξεχωρίζει τα κλασικά γαλακτικά βακτήρια από τα μπιφιδοβακτήρια, που περιέχουν περισσότερο από 55% G + C/ mol στο DNA τους και πλησιάζουν φυλογενετικά τους ακτινομύκητες (Schleifer και Ludwig, 1995).

High G+C

Low G+C



Κύριες φυλογενετικές ομάδες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των Gram⁺ βακτηρίων με χαμηλό και υψηλό ποσοστό βάσεων G + C στο DNA τους. (Holzapfel et al., 2001).

2. 2. Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων

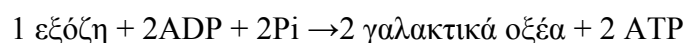
Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ζυμώνουν τους υδατάνθρακες με δύο τρόπους, τον ομοζυμωτικό και τον ετεροζυμωτικό.

Ο ομοζυμωτικός τρόπος (Homofermentation) προκαλεί γλυκόλυση των εξοζών και συμβαίνει στα στελέχη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Pediococcus*. Χαρακτηρίζεται από την διάσπαση της 1,6-διφωσφο-φρουκτόζης (FDP)

σε δύο ίσο-τριόζες, την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεϋδη (GAP) και την φωσφο-διυδροξυ-ακετόνη, με την δράση της 1,6-διφωσφορικής αλδολάσης. Από την 3-φωσφο-γλυκεριλδεϋδη σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ από το οποίο τελικά παράγεται γαλακτικό οξύ που είναι και το μόνο προϊόν αυτού του τρόπου ζύμωσης (Axelsson, 1998, Kandler, 1983).

Ο ετεροζυμωτικός τρόπος (Heterofermentention) χαρακτηρίζεται από την οξείδωση της γλυκόζης προς 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενο από μια αποκαρβοξυλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φώσφο-γλυκεριναλδεϋδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ με τη δράση μιας φωσφοκετολάσης. Το αποτέλεσμα αυτού του τρόπου ζύμωσης της εξόζης παράγει CO₂, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσα μέρη. Εδώ ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του *Lactobacillus* spp. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια έχουν επίσης την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξωτερικούς δέκτες ηλεκτρονίων για να αναγεννούν το NADH και να αποδίδουν επιπλέον ενέργεια.

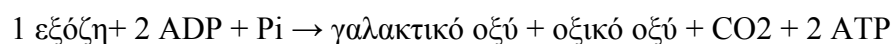
Ομοζυμωτικός τρόπος



Ετεροζυμωτικός τρόπος



ή (αν υπάρχει εξωτερικός δέκτης ηλεκτρονίων)



2. 3. Είδη γαλακτικών βακτηρίων στα γιαούρτια

Στρεπτόκοκκοι

Τα στελέχη του γένους *Streptococcus* περιγράφονται με βάση μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Έχουν μορφή κόκκων που σχηματίζουν μεγάλες αλυσίδες και περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, όπως τα ισχυρά παθογόνα βακτήρια *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* και *S. agalactiae*, την εντερική ομάδα *S. faecalis* και *S. faecium* και τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης *S. cremoris* και *S. lactis*. Οι στρεπτόκοκκοι έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα με επαρκείς πηγές

πρωτεϊνών και υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των ιστών του εντερικού σωλήνα, του γάλατος και των γαλακτοκομικών, των λαχανικών κ.α. Το εξελικτικό δέντρο της κλωστρινδικής υποομάδας των Gram⁺ βακτηρίων χωρίζει τους στρεπτόκοκκους σε τρία διαφορετικά είδη: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* και *Lactococcus* (schleifer και Kilpper-Balz, 1987).

Το *S. thermophilus* είναι το μοναδικό στέλεχος των στρεπτόκοκκων που χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης στη βιομηχανία τροφίμων, και είναι βασικό στοιχείο στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού. Τα κύτταρά του έχουν σφαιρική ή ωοειδή μορφή με διάμετρο μικρότερη από 1μm και σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες. Αναπτύσσεται μεταξύ 40 και 50° C και για τη βέλτιστη ανάπτυξή του χρειάζονται βιταμίνες του συμπλέγματος B και κάποια αμινοξέα. Μαζί με τα στελέχη *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* και *Lactobacillus helveticus*, χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες εκκίνησης ανάμεικτων στελεχών, με βέλτιστη θερμοκρασία επώασης μεγαλύτερη των 40° C, όπως στο γιαούρτι και άλλα παρόμοια γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα στελέχη *S. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* εμφανίζουν μια συνεργιστική σχέση στην ανάπτυξή τους. Ο *S. thermophilus* παράγει φουμαρικό οξύ, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, το οποίο στη συνέχεια με την προτεωλυτική του δράση επιτρέπει την ανάπτυξη του στρεπτόκοκκου στο γάλα (Καλατζόπουλος Γ., 2002).

Λακτοβάκιλλοι

Οι λακτοβάκιλλοι είναι αποκλειστικά ζυμωτικοί οργανισμοί και έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις. Είναι ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον και τροποποιούν στην όξινη περιοχή το pH των τροφίμων που περιέχουν ζυμώσιμους υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα να μπορούν να αναστείλουν ή και να εξοντώσουν άλλα βακτήρια. Χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης για τυριά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά κρασιά κ.α.

Ανάλογα με τον χαρακτήρα ζύμωσης, οι λακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς, προαιρετικά ετεροζυμωτικούς και υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς.

Οι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη *Lb. delbrueckii*,

Lb. acidophilus, *Lb. helveticus*, *Lb. farmicinis* και *Lb. kefirafaciens*. Το *Lb. acidophilus* χρησιμοποιείται στην παραγωγή ξινόγαλου και κατατάσσεται μαζί με το *Lb. jensonii* στην κατηγορία των προβιοτικών βακτηρίων. Το *Lb. delbruekii* περιλαμβάνει τα *Lb. delbruekii* subsp. *delbruekii bulgaricus* και *lactis*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή γιαουρτιών και τυριών.

Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ, αλλά μπορούν να ζυμώσουν και το γλυκονικό παράγοντας CO₂. Ακόμα ζυμώνουν και τις πεντόζες προς παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* και *Lb. plantarum*. Ο *Lb. casei* εντοπίζεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τον εντερικό σωλήνα κ.α.

Οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις πεντόζες προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO₂. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο *Lb. sanfrancisco*, ο οποίος συμμετέχει στη ζύμωση του ψωμιού μετατρέποντας τη μαλτόζη σε γαλακτικό και οξικό οξύ (Stiles και Holzapfel, 1997).

Λακτόκοκκοι

Το γένος *Lactococcus* είναι σχετικά νέο, καθιερώθηκε μόλις το 1985 από τους Schleifer και συν., και τα περισσότερα στελέχη του ανήκαν παλαιότερα στα γένη *Streptococcus* και *Lactobacillus*. Οι λακτόκοκκοι είναι ομοζυμωτικά βακτήρια και παράγουν L (+) γαλακτικό οξύ. Τα κύτταρά τους έχουν ωοειδές σχήμα, μεγέθους μεταξύ 0,5 – 1,5 μm, και σχηματίζουν ζεύγη και κοντές αλυσίδες. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 30° C και μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι και σε θερμοκρασία 10° C, αλλά όχι στους 45° C. Έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και είναι αυξοτροφικά για κάποια αμινοξέα και πρωτεΐνες. Στο γένος αυτό ανήκουν τα στελέχη *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* και *Lc. raffinolactis*. Τα *Lc. lactis* subsp. *lactis* και *cremoris* χρησιμοποιούνται ευρύτατα για ζυμώσεις στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Leuconostoc spp.

Τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* είναι ετεροζυμωτικά βακτήρια και παράγουν D (+) γαλακτικό οξύ από τις πεντόζες. Έχουν πολύπλοκες τροφικές

απαιτήσεις οι οποίες περιλαμβάνουν κάποια αμινοξέα, πεπτίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μεταλλικά ιόντα. Έχουν μορφή κοντών βακίλλων, μεγέθους μεταξύ 0,5 – 0,7 x 0,7 – 1,2 μm , και σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη *Leuconostoc argentinum*, *carnosum*, *citereum*, *fallax*, *gelidum*, *lactis*, *mesenteroides* subsp. *cremoris*, *menteroides* subsp. *dextranicum*, *mesenteroides* subsp. *mesenteroides* και *pseudo-mesenteroides*.

Bifidobacterium spp.

Τα μπιφιδοβακτήρια ανήκουν στη φυσική εντερική χλωρίδα των ανθρώπων και των ζώων και είναι αναερόβια, μη σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση Gram⁺ βακτήρια, τα οποία αρχικά κατατάσσονταν στα είδη των λακτοβακίλλων. Με την εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής ταξινόμησης διαχωρίστηκαν από τους λακτοβάκιλλους και τα υπόλοιπα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, από τα οποία διαφέρουν ως προς το υψηλότερο ποσοστό βάσεων G + C που έχουν στο DNA τους. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ 20 και 46° C και εξουδετερώνονται στους 60° C. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξή τους είναι μεταξύ 6,5 και 7,0, ενώ δεν αναπτύσσονται καθόλου σε pH μικρότερο από 5,1 ή μεγαλύτερο από 8,0. Το όνομά τους οφείλεται στις δισχιδείς μορφές που έχουν, και ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται εμφανίζουν χαρακτηριστικά σχήματα, όπως Y, X, V, λεπτότερο κέντρο με πιο χοντρά άκρα και κοκκοειδή ή βακιλλόμορφα κύτταρα (Tamime, 2002).

Είναι ετεροζυμωτικά βακτήρια και ζυμώνουν τη γλυκόζη προς παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Τα μπιφιδοβακτήρια περιλαμβάνουν περισσότερα από 30 είδη, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε διάφορες πηγές, όπως ο άνθρωπος, τα ζώα, τα έντομα, το περιβάλλον κ.α. Τα είδη των μπιφιδοβακτηρίων που βρίσκονται στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου διαφέρουν από τα είδη των μπιφιδοβακτηρίων που βρίσκονται στην εντερική χλωρίδα των ζώων (Mitsuoka, 1984). Τα είδη των μπιφιδοβακτηρίων που εντοπίζονται στον άνθρωπο είναι τα *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* και *B. pseudocatenulatum*, ενώ στα ζώα εντοπίζονται κυρίως τα *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* και *B. animalis*. Στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων χρησιμοποιούνται κυρίως έξι είδη μπιφιδοβακτηρίων, τα *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis* και *B. longum*, για την παρασκευή καινοφανών γαλακτοκομικών προϊόντων.

2. 4. Καλλιέργειες εκκίνησης

Ως καλλιέργεια εκκίνησης ορίζεται το μικροβιακό παρασκεύασμα ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, το οποίο προστίθεται σε φρέσκο υλικό, με σκοπό την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης, μέσω της καθοδηγούμενης επιτάχυνσης της ζυμωτικής του λειτουργίας (Leroy και De Vuyst, 2004).

Η αρχική παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων βασίστηκε σε αυθόρμητες ζυμώσεις, εξαιτίας της ανάπτυξης της φυσικής μικροχλωρίδας των τροφίμων αυτών, και η ποιότητα του τελικού προϊόντος ήταν ανάλογη του μικροβιακού φορτίου και του είδους του αρχικού τροφίμου. Η διαδικασία της ζύμωσης τελειοποιήθηκε με τη μέθοδο του εμβολιασμού νέου, φρέσκου, προϊόντος με μικρή ποσότητα από προηγούμενο προϊόν, το οποίο είχε υποστεί αυθόρμητη ζύμωση. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας ήταν η επικράτηση των καλύτερα προσαρμοσμένων στελεχών, συντομεύοντας ταυτόχρονα τη ζύμωση και μειώνοντας την πιθανότητα αποτυχίας της. Σήμερα η παραγωγή προϊόντων ζύμωσης είναι ένας σημαντικός κλάδος της βιομηχανίας τροφίμων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν ταχύτατη οξύνιση του φρέσκου υλικού, μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος. Επίσης παράγουν αιθανόλη, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες, ένζυμα και αρωματικές ενώσεις. Έτσι, ευνοούν τη συντήρηση και μικροβιακή σταθερότητα του τροφίμου, βελτιώνουν τη γεύση και συμβάλουν στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Caplice και Fitzgerald, 1999). Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων γάλατος, κρέατος, λαχανικών, δημητριακών και αλκοολούχων ποτών (Leroy και De Vuyst, 2004).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια – εκκινητές στην βιομηχανία γάλατος

Η χρήση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων γάλατος οφείλεται στην ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού, κυρίως, οξέος, το οποίο, σε ορισμένες περιπτώσεις βοηθά στην πήξη των πρωτεϊνών του γάλατος. Αν και το ίδιο το γαλακτικό οξύ, καθώς και οι άλλες ενώσεις που παράγονται μαζί με αυτό, συμβάλλουν στην γεύση και το άρωμα τελικού προϊόντος, υπάρχουν ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια που

χρησιμοποιούνται ως εκκινητές αποκλειστικά για την παραγωγή ενώσεων που προσδίδουν ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά και γεύση στο τελικό προϊόν, όπως το διακετύλιο, η ακεταλδεύδη και το οξικό οξύ. Άλλος τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια εκκινητές μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση και την υφή του τελικού προϊόντος είναι μέσω της αποσύνθεσης των πρωτεϊνών και του λίπους του γάλατος, καθώς και με τη μείωση του pH κατά την ζύμωση. Το χαμηλό pH των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δρα ανασταλτικά για ορισμένα παθογόνα βακτήρια. Πρόσφατα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα άρχισαν να εμπλουτίζονται και με προβιοτικές καλλιέργειες, οι οποίες μπορούν είτε να περιληφθούν άμεσα στη διαδικασία ζύμωσης, είτε να προστεθούν στο τελικό προϊόν ως πρόσθετα υλικά.

2. 5. Ταξινόμηση των γαλακτοκομικών καλλιεργείων εκκίνησης

Ανάλογα με το προς παραγωγή γαλακτοκομικό προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν και οι κατάλληλες καλλιέργειες εκκίνησης. Οι καλλιέργειες εκκίνησης για τα γαλακτοκομικά προϊόντα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

1. Μεσοφιλικές καλλιέργειες (Mesophilic cultures), με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 21 και 32° C, στις οποίες ανήκουν τα στελέχη: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.
2. Θερμοφιλικές καλλιέργειες (Thermophilic cultures), με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 38 και 46° C, στις οποίες ανήκουν τα στελέχη: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. helveticus* και *L. plantarum*.

Τα στελέχη αυτά, καθώς και τα τρόφιμα στα οποία είναι απαραίτητα ως καλλιέργειες εκκίνησης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

Συστηματική ταξινόμηση των καλλιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στα
γαλακτοκομικά προϊόντα¹

Παλαιά ονομασία	Νέα ονομασία	Κύρια παραγωγή	Παρασκευή προϊόντος
Μεσοφιλικοί εκκινητές²			
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sub-sp. <i>lactis</i>	παραγωγή οξέος	βουτυρόγαλα, ξινή κρέμα, διάφορα είδη τυριών
<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sub-sp. <i>cremoris</i>	παραγωγή οξέος	βουτυρόγαλα, ξινή κρέμα, διάφορα είδη τυριών
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sub-sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	γεύση & οξύ	ξινή κρέμα, μαλακό τυρί, βουτυρόγαλα, ώριμο βούτυρο
<i>Leuconostoc cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sub-sp. <i>cremoris</i>	γεύση	ξινή κρέμα, μαλακό τυρί, βουτυρόγαλα, ώριμο βούτυρο
<i>Leuconostoc lactis</i>	Unchanged	γεύση	ξινή κρέμα, μαλακό τυρί, βουτυρόγαλα, ώριμο βούτυρο
Θερμοφιλικοί εκκινητές³			
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> sub-sp. <i>thermophilus</i>	γεύση & οξύ	Γιαούρτι, ζυμωμένο γάλα, ιταλικό τυρί, τυρί emmental
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub-sp. <i>bulgaricus</i>	γεύση & οξύ	Γιαούρτι, ζυμωμένο γάλα, ιταλικό τυρί, τυρί emmental
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub-sp. <i>lactis</i>	γεύση & οξύ	Γιαούρτι, ζυμωμένο γάλα, ιταλικό τυρί, τυρί emmental
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Unchanged	γεύση & οξύ	Γιαούρτι, ζυμωμένο γάλα, ιταλικό τυρί, τυρί emmental

¹ Adapted from Dairy Microbiology, R.K. Robinson & Cheese and Fermented Milk Foods, F. Kozikowski

² Optimum Temperature 20 - 30°C. All are spherical shaped bacteria (coccus).

³ Optimum Temperature 37 - 45°C. *Streptococcus* are cocci, *Lactobacillus* are rod shaped bacteria.

2. 6. Διατήρηση και ασφάλεια τροφίμων

Τη σημερινή εποχή υπάρχει μια ανησυχία εκ μέρους των καταναλωτών ως προς τη χρήση και την επίπτωση στην υγεία των σύνθετων χημικών που προσθέτονται ως συντηρητικά στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα την τάση των βιομηχανιών προς παραγωγή λιγότερο επεξεργασμένων τροφίμων. Τα μη επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν σε αναερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες κατάψυξης, τις συνηθισμένες δηλαδή τεχνικές συντήρησης. Η απάντηση σε αυτό το πρόβλημα μπορεί να δοθεί με τη χρήση των αντιμικροβιακών μεταβολιτών των ζυμωτικών μικροοργανισμών.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι σπουδαίας οικονομικής αξίας στη βιομηχανία εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους τόσο στα τρόφιμα και τη ζύμωση τροφίμων, όσο και της δυνατότητάς τους να παράγουν ένα πλήθος διαφορετικών ουσιών με αντιμικροβιακές ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιο-συντηρητικά. Η ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια (Roger, 1928) και οι ουσίες που θεωρούνται υπεύθυνες για αυτήν την ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι σε άλλα βακτήρια περιλαμβάνουν: τα οργανικά οξέα, το διακετύλιο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ένζυμα, την ανθεκτικότητα στους φάγους, λυτικούς παράγοντες και τις βακτηριοσίνες (Daeschel 1990, Lindgren 1990, Ray και Daeschel 1992).

Βακτηριοσίνες

Η σημασία των βακτηριοσινών που παράγονται από στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγκειται στην ιδιότητά τους να ανταγωνίζονται άλλους, παθογόνους, μικροοργανισμούς. Αποτελούνται από μια βιολογικά ενεργή πρωτεΐνη. Έχουν βακτηριακό τρόπο δράσης και συνδέονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς. Ο Klaenhammer (1998) όρισε τις βακτηριοσίνες ως πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα με βακτηριακή δραστηριότητα ενάντια σε είδη που συνήθως σχετίζονται με τα βακτήρια που τις παράγουν. Παράγονται από Gram⁺ και Gram⁻ βακτήρια.

Οι σημαντικότερες Gram⁻ βακτηριοσίνες είναι οι κολισίνες (colicin) και παράγονται από στελέχη του *E. coli* (Braun και συν., 1994). Είναι μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικές λειτουργίες στις οποίες περιλαμβάνονται η κυτταρική σύνδεση, η μετανάστευση και η βακτηριακή δραστικότητα. Δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων στόχων. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram⁺ βακτήρια είναι μικρά πεπτίδια (Nes και συν., 1996), αν και υπάρχουν και ορισμένες εξαιρέσεις (Joerger και Klaenhammer, 1995). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα lantibiotics (Jack και συν., 1995) και τα μη-lantibiotics (Nes και συν., 1996). Οι περισσότερες από τις Gram⁺ βακτηριοσίνες είναι ενεργά μεμβρανικά σύμπλοκα που αυξάνουν την διαπερατότητα της κυττοπλασματικής μεμβράνης, και συχνά εμφανίζουν ένα πολύ μεγαλύτερο πεδίο βακτηριακής ενεργότητας από ότι οι Gram⁻ βακτηριοσίνες.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 4 κατηγορίες βακτηριοσινών που παράγονται από βακτήρια του γαλακτικού οξέος:

- Κατηγορία I, lantibiotics, περιλαμβάνει:
 - α) τη νισίνη (Nisin), η οποία παράγεται από τα στελέχη του *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* (Dodd και Gasson, 1994) και είναι δραστική ενάντια σε πολλά Gram⁺ βακτήρια, όπως κάποια είδη του γένους *Listeria*. Εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροβιακών βακίλλων και των κλωστριδιακών σπόρων, και με την προσθήκη δακτυλίων Ca γίνεται ενεργή εναντίον και μερικών Gram⁻ βακτηρίων (Stevens και συν., 1991). Η νισίνη έχει επιτραπεί ως προσθετικό τροφίμων σε περισσότερες από 50 χώρες, συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με την εμπορική ονομασία Nisaplin (Vandenberg 1993, Delves και Broughton 1996).
 - β) τη λακτισίνη 3147 (Lacticin 3147), η οποία αναστέλλει και αυτή Gram⁺ βακτήρια, όπως στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Clostridium* και *Listeria* spp.
- Κατηγορία II: περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που αποτελούνται από μικρά πεπτίδια (30 – 100 αμινοξέα) και παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα κατά την θερμική έκθεση.
- Κατηγορία III: περιλαμβάνει θερμοευαίσθητες βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Lactobacillus* και αποτελούνται από μεγάλες πρωτεΐνες.

- Κατηγορία IV: περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες αποτελούμενες από μια πρωτεΐνη και ένα μη πρωτεϊνικό δομικό συστατικό (λιπίδιο ή υδατάνθρακα), το οποίο είναι απαραίτητο για να είναι ενεργή η βακτηροσίνη.

Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί οι οποίοι απαιτούν βακτήρια ξενιστές για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Κάθε φάγος που αναπαράγεται μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή μπορεί να δημιουργήσει μέχρι και 200 φάγους οι οποίοι απελευθερώνονται, με σύγχρονη καταστροφή του βακτηρίου ξενιστή, και προσβάλουν νέα βακτήρια. Αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την γαλακτοβιομηχανία και ειδικότερα στην παραγωγή τυριού, αφού η καταστροφή των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από τους βακτηριοφάγους εμποδίζει την σωστή ωρίμασή του.

Μέτρα για τον έλεγχο των βακτηριοφάγων:

- 1) Χρήση ασηπτικών τεχνικών και κατάλληλες εστίες επώασης
- 2) Εναλλαγή καλλιεργειών εκκίνησης καθημερινά και/ή χρήση καθορισμένων στελεχών ανθεκτικών στους φάγους
- 3) Χρήση ανθεκτικών στους φάγους υποστρωμάτων για την ετοιμασία της καλλιέργειας εκκίνησης
- 4) Χρήση καλλιεργειών εκκίνησης με περισσότερα από ένα στελέχη
- 5) Χρήση της καλλιέργειας εκκίνησης απευθείας στο δοχείο του προϊόντος για αποφυγή μόλυνσης κατά την μεταφορά
- 6) Συχνοί έλεγχοι για παρουσία φάγων με τη χρήση ενός test δραστηριότητας των καλλιεργειών εκκίνησης, για την πιο πρόσφατα χρησιμοποιούμενη καλλιέργεια.

2. 7. Λειτουργικά τρόφιμα

Nutraceuticals

Τα Nutraceuticals είναι φυσικά βιοενεργά χημικά σύμπλοκα τα οποία προάγουν την υγεία και προλαμβάνουν την εμφάνιση ασθενειών. Βρίσκονται σε ένα

πλήθος παραγόμενων προϊόντων από την βιομηχανία τροφίμων, την αγορά βοτάνων και συμπληρωμάτων και την φαρμακευτική βιομηχανία. Η ονομασία <<Nutraceuticals>> χρησιμοποιήθηκε το 1979 από τον Stephen DeFelice και ορίζεται ως << ένα τρόφιμο ή μέρος τροφίμου το οποίο παρέχει ευνοϊκές επιδράσεις για την υγεία, συμπεριλαμβάνοντας την αποτροπή και την θεραπεία ασθενειών>>. Αρκετά τέτοια συστατικά που προστίθενται στα τρόφιμα προέρχονται από βακτήρια. Για παράδειγμα κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν καλλιέργειες εκκίνησης στα γιαούρτια, όπως το *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και το *S. thermophilus*, μπορούν να παράγουν βιταμίνες, όπως το φυλικό οξύ, και να αποτελέσουν υπόστρωμα για την παραγωγή εμπλουτισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Wouters και συν., 2002). Επίσης, κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως το *L. helveticus*, προκαλούν διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλατος σε μικρά πεπτίδια, μερικά από τα οποία είναι βιολογικά ενεργά και ονομάζονται βιο-πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά έχουν συσχετιστεί με βελτίωση της απορρόφησης στον γαστρεντερικό σωλήνα, της απορρόφησης μετάλλων και ειδικότερα του Ca, της υπέρτασης και του ανοσοποιητικού συστήματος (Meisel και Bockelmann, 1999).

Προβιοτικά

Τα προβιοτικά ορίζονται ως <<ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι λαμβάνονται από το στόμα και σε ορισμένες συγκεντρώσεις παρέχουν οφέλη για την υγεία, πέρα από αυτά της κύριας διατροφής >> (Guarner, 1998). Τα προβιοτικά σήμερα καταναλώνονται είτε ως συμπλήρωμα τροφής, είτε ως μη τροφικά παρασκευάσματα. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης θεωρούνται σαν φάρμακα και χορηγούνται μαζί με τα αντιβιοτικά (Collins, 1999). Σε άλλες χώρες κατηγοριοποιούνται ως τρόφιμα και όχι σε τέτοια μορφή και δοσολογία που να μπορούν να συνταγογραφηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς (Berger, 2002).

Τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις: α) να μην είναι παθογόνο για τον οργανισμό του ξενιστή, β) να είναι τεχνολογικά κατάλληλο για βιομηχανική χρήση, γ) να είναι ανθεκτικό στις γαστρικές και χολικές εκκρίσεις, δ) να παραμένει στον εντερικό σωλήνα για σύντομο χρονικό διάστημα, ε) να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες, ζ) να ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση και η) να επηρεάζει τις μεταβολικές δραστηριότητες του εντέρου (Dunne και συν., 1999).

Ωστόσο κανένα στέλεχος δεν φαίνεται να πληρεί από μόνο του αυτές τις προϋποθέσεις (Dunne και συν., 1999).

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προβιοτικών περιλαμβάνουν στελέχη από αρκετά είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactisi*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces boulardii* (Holzapfel και συν., 1998). Για την παραγωγή προβιοτικών προϊόντων για τον άνθρωπο χρησιμοποιούνται κυρίως οι λακτοβάκιλλοι και τα μπιφιδοβακτήρια (Tannock, 1999).

Τα κυριότερα στελέχη των λακτοκοβακίλλων που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι τα: *L. acidophilus*, *L. johnsoni*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* και *L. reuteri*. Τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* είναι τα *B. bifidus*, *B. longum* και *B. infantis*.

Τα προβιοτικά έχουν κάνει έντονη την εμφάνιση και παρουσία τους στην αγορά, σε καταστήματα υγιεινής διατροφής και σουπερμάρκετ, με την μορφή κάψουλας ή συμπληρωμάτων τροφίμων, κυρίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά ορίζονται ως τα αδιάσπαστα συστατικά των τροφίμων που ευνοούν τον οργανισμό υποκινώντας επιλεκτικά την ανάπτυξη ή δραστηριότητα ενός ή περισσότερων προβιοτικών βακτηρίων στην εντερική χλωρίδα (Crettenden και Playne 1996, Dimer και Gibson 1998, Zimmer και Gibson 1998, Manning και Gibson 2004). Αυτό συμβαίνει από ζυμωτικούς υδατάνθρακες που δεν διασπάστηκαν στο λεπτό έντερο και φτάνουν στο παχύ έντερο όπου και ενεργοποιούν επιλεκτικά την ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων και μερικών Gram⁺ βακτηρίων, τα οποία ανήκουν στα προβιοτικά βακτήρια. Τα συνήθη πρεβιοτικά στην διατροφή του ανθρώπου είναι η λακτουλόζη, η ινολίνη, τα γαλακτο-ολοσακχαρίδια, τα φρουκτο-ολιγοσακχαρίδια, τα μαλτοζο-ολιγοσακχαρίδια, και το ανθεκτικό άμυλο. Συναντώνται σε τρόφιμα όπως η αγκινάρα, τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα σκόρδα, οι μπανάνες, τα σπαράγγια και τα ραδίκια. Τα κύρια τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων είναι λιπαρά οξέα κοντής αλύσου και οξικό, βουτυρικό και προπιονικό οξύ, τα οποία χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό σαν πηγές ενέργειας.

Για να χαρακτηριστεί ως πρεβιοτικό ένα συστατικό θα πρέπει: να μην υδρολύεται στο άνω τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, να είναι επιλεκτικό υπόστρωμα για ένα ή για περιορισμένο αριθμό προβιοτικών βακτηρίων του εντέρου, βοηθώντας τα να αναπτυχθούν και να γίνουν μεταβολικά ενεργά, και επίσης η χορήγησή του να έχει πραγματικά ευνοϊκά αποτελέσματα για τον οργανισμό. Σε *in vivo* έρευνες (Venket Rao) αποδείχθηκε ότι η ινολίνη και η ολιγοφρουκτόζη δρουν επιλεκτικά στην ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων.

Στην βιομηχανία η χρήση μιγμάτων που συνδυάζουν προβιοτικά βακτήρια και πρεβιοτικά συστατικά γίνεται πλέον συχνά εξαιτίας του συνεργιστικού φαινομένου που απονέμουν στο παραγόμενο προϊόν. Τα μίγματα αυτά που περιέχουν προβιοτικούς οργανισμούς και πρεβιοτικά συστατικά λέγονται συμβιωτικά.

Κεφάλαιο 3^ο

3. Η χρήση των αντιβιοτικών και η εμφάνιση των ανθεκτικών βακτηρίων

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες με αντιμικροβιακή δράση τα οποία μπορούν να χορηγηθούν δια στόματος, τοπικά και παρεντερικά. Κατηγοριοποιούνται σε φυσικά, συνθετικά ή ημισυνθετικά εάν παράγονται απευθείας από μικροοργανισμούς, εάν συντίθενται χημικά ή εάν ως μεταβολικά προϊόντα ενός μικροοργανισμού υπόκεινται σε χημική τροποποίηση, αντίστοιχα. Χρησιμοποιούνται στην ιατρική και την κτηνιατρική για την θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών, καθώς επίσης και για την προώθηση της γεωργικής παραγωγής και της ανάπτυξης των ζώων στις κτηνοτροφικές μονάδες. Η εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών για την προαγωγή της ανάπτυξης των ζώων θεωρείται σήμερα η κύρια αιτία για την εμφάνιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Οι μικροοργανισμοί έρχονται σε επαφή με τεράστιες ποσότητες αντιβιοτικών σε πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα, τα οποία λειτουργούν ως μέσο εξελικτικής πίεσης για τους ίδιους. Τελικά επιβιώνουν μόνο όσοι αποκτούν ανθεκτικότητα απέναντι σε αυτά.

Η επί πενήντα έτη αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών έχει δημιουργήσει μια κατάσταση που οδηγεί σε μια οικολογική ανισορροπία με συνέπεια την αύξηση (των πολλαπλά) ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, τα οποία ανιχνεύονται στους ανθρώπους, στα ζώα, στο έδαφος, τα νερά, τα τρόφιμα κ.λ.π. (Levy, 1997). Τα νοσοκομεία αποτελούν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη και τη μεταφορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Οι πλέον επικίνδυνοι χώροι για την ανίχνευση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών είναι οι μονάδες εντατικής θεραπείας και τα χειρουργεία. Στους χώρους αυτούς εντοπίζονται και τα πολύ επικίνδυνα πολυανθεκτικά παθογόνα στελέχη (Monroe και Polk, 2000).

Η μεγάλη και συχνή χρήση αντιβιοτικών στις κτηνοτροφικές μονάδες μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ανθεκτικών στελεχών παθογόνων αλλά και μη παθογόνων βακτηρίων (Witte 1998, Anon 1999). Τα ζώα εκτός από τους τεράστιους βακτηριακούς πληθυσμούς που ενδημούν στο εντερικό τους σύστημα, συχνά μεταφέρουν και παθογόνα βακτήρια όπως στελέχη των γενών *Campylobacter*,

Yersinia, *Listeria*, τα οποία μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα καθιστώντας πολύ δύσκολη την αντιμετώπισή τους σε περίπτωση μόλυνσης. Τα προϊόντα κρέατος και τα γαλακτοκομικά προϊόντα κυκλοφορούν μέσω του εμπορίου σε όλο τον κόσμο, μεταφέροντας και τους βακτηριακούς πληθυσμούς πέρα από τα γεωγραφικά σύνορα. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου παράγεται περίπου το 25% του κρέατος που κυκλοφορεί παγκοσμίως, οι πολιτικές που ρυθμίζουν την χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία είναι ελλειπείς ή ανύπαρκτες. Για παράδειγμα στη Ρωσία το αντιβιοτικό chloramphenicol είναι ακόμα σε κτηνιατρική χρήση αν και έχει αποδειχθεί τοξικό για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ στην Νοτιοανατολική Ασία, η χρήση των αντιβιοτικών στις καλλιέργειες γαρίδας είναι ανεξέλεγκτη (Witte, 1998).

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι αντιμετωπίζουμε μια επιδημία βακτηριακής ανθεκτικότητας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που οφείλεται στην υπερβολική και την κακή χρήση των αντιβιοτικών.

3. 1. Η χρήση των αντιβιοτικών στις κτηνοτροφικές μονάδες

Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία από τους κτηνιάτρους και τους κτηνοτρόφους για τουλάχιστον 5 δεκαετίες. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας για την Υγεία των Ζώων (European Federation of Animal Health, FEDESA), η χορήγηση αντιβιοτικών στα ζώα είναι υπεύθυνη για το ένα τρίτο της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών στην Ευρώπη. Η χρήση αντιβιοτικών στα ζώα γίνεται για τρεις λόγους: θεραπεία, προφύλαξη και ανάπτυξη.

Θεραπευτική αγωγή

Η θεραπευτική χορήγηση των αντιβιοτικών προορίζεται για τον έλεγχο μιας ήδη υπάρχουσας βακτηριακής μόλυνσης. Οι κύριες ασθένειες στις οποίες χρησιμοποιούνται είναι εντερικές και πνευμονικές μολύνσεις, αποστήματα σε δέρμα και όργανα και η μαστίτιδα. Ο τρόπος χορήγησης των αντιβιοτικών διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος κάθε ζωικής ομάδας. Σε κτηνοτροφικές μονάδες όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός ζώων, όπως π.χ. κοτόπουλα, προτιμάται η ομαδική θεραπεία όταν κάποιο

από τα ζώα εμφανίσει συμπτώματα μιας νόσου. Μεμονωμένη θεραπεία γίνεται συνήθως στα γαλακτοκομικά ζώα.

Προφύλαξη

Χρήση αντιβιοτικών στην κτηνιατρική πρακτική μπορεί να γίνει και για προληπτικούς λόγους. Στις γαλακτοκομικές αγελάδες η προφυλακτική ενδομαστική χορήγηση αντιβιοτικών στο τέλος της γαλακτοπαραγωγικής περιόδου αποτρέπει την εμφάνιση μαστίτιδας, καθώς απελευθερώνονται αντιμικροβιακοί παράγοντες σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μαστικό αδένα. Στις βιομηχανίες παραγωγής κρέατος, ειδικά χοιρινού και βόειου, η προφυλακτική χρήση αντιβιοτικών γίνεται σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους, όπως κατά τον απογαλακτισμό ή την μίξη ζώων από διαφορετικά κοπάδια. Η προφυλακτική χρήση σε αυτές τις περιόδους είναι σημαντική, γιατί χωρίς αυτή η συχνότητα των εμφανιζόμενων ασθενειών στα ζώα θα ήταν πολύ μεγάλη.

Αύξηση του βάρους στις κτηνοτροφικές μονάδες

Η προσθήκη ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά, στις ζωοτροφές νεαρών ζώων μπορεί να βελτιώσει την ανάπτυξή τους. Ζώα που λαμβάνουν αντιβιοτικά με την τροφή τους αποκτούν μεγαλύτερο βάρος κατά 4 με 5% σε σύγκριση με αυτά που τρέφονται κανονικά (Anon, 1997). Οι μηχανισμοί προώθησης της ανάπτυξης μέσω των αντιβιοτικών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, αλλά θεωρείται ότι μεσολαβεί η αντιβακτηριακή επίδραση.

Η πρώτη παρατήρηση της αυξητικής δράσης των αντιβιοτικών έγινε σε κοτόπουλα ύστερα από την προσθήκη *Streptomyces aureofaciens* στην τροφή τους. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι ο παράγοντας που οδήγησε στην αύξηση της ανάπτυξής τους ήταν το υπόλειμμα chlortetracycline (Jukes και Williams, 1953). Από τότε η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες έγινε πολύ διαδεδομένη στην κτηνοτροφία, χωρίς μάλιστα στην αρχή να υπάρχουν περιορισμοί. Η εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών επικρίθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 1960 και τελικά οδήγησε στην <<έκθεση Swan,>> (Swann Report) (Anon, 1999).

Η κύρια σύσταση της έκθεσης Swann ανέφερε ότι η χρήση των αντιβιοτικών για την προώθηση της αύξησης του βάρους των ζώων πρέπει να περιοριστεί στα

αντιβιοτικά που είναι οικονομικής αξίας για τη κτηνοτροφία, τα οποία δεν χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για την θεραπεία ασθενειών ανθρώπου ή ζώων και δεν θα μειώσουν την αποτελεσματικότητα των υπαρχόντων θεραπευτικών φαρμάκων μέσω της ανάπτυξης των ανθεκτικών οργανισμών. Αυτή η έκθεση ήταν η βάση για την ευρωπαϊκή νομοθεσία στην οδηγία 70/524, στην οποία δημοσιεύθηκε ένας κατάλογος των αναγνωρισμένων πρόσθετων ουσιών με τη μέγιστη και ελάχιστη δόση, την περίοδο απόσυρσης, και τα ζωικά είδη για τις οποίες επιτρέπονται. Οι διαφορές ανά τον κόσμο ως προς τους κανονισμούς χρήσης των αντιβιοτικών είναι μεγάλες. Σε μερικές χώρες εκτός της ΕΕ, η χρήση αντιβιοτικών όπως οι τετρακυκλίνες και οι πενικιλίνες επιτρέπονται ακόμα για την προώθηση της ανάπτυξης. Το 1986, η Σουηδία αποφάσισε να απαγορεύσει όλα τα αντιβιοτικά για την προώθηση ανάπτυξης. Αρχικά η νομοθεσία ΕΚ τροποποιήθηκε σε πολλά σημεία, και από το 1997 επιτράπηκε η χρήση 4 μόνο αντιβιοτικών για τη ζωική προώθηση ανάπτυξης στην ΕΕ, συμπεριλαμβανομένου του flavophospholipol, του monensin, του salinomycin και του avilamycin. Τα τέσσερα τελευταία αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν ακόμη νόμιμα στις ζωοτροφές απαγορεύτηκαν από τις αρχές του 2006. Η εφαρμογή απαγόρευσης χρήσης αντιβιοτικών σε όλη την ΕΕ άρχισε από την 1η Ιανουαρίου 2006 και το μέτρο κρίθηκε αναγκαίο για την προστασία της ανθρώπινης υγείας, αφού αντιβιοτικά περνούσαν τα στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας..

3. 2. Υπολείμματα αντιβιοτικών στα τρόφιμα

Η χρήση των αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει σε υπολείμματα στους εδώδιμους ιστούς, το γάλα και τα αυγά. Ο De Wasch και συν. (1998) ανέφερε ότι περισσότερο από το 5% των δειγμάτων χοιρινού κρέατος στο Βέλγιο περιείχε υπολείμματα του αντιβιοτικού tetracycline σε συγκεντρώσεις μεταξύ 50 και 1000 $\mu\text{g}/\text{kl}$. Η κατανάλωση υπολειμμάτων από αντιβιοτικά μπορεί να έχει επικίνδυνα αποτελέσματα για τον άνθρωπο είτε από άμεση τοξικότητα ή είτε από αλλεργικές αντιδράσεις. Αν και υπάρχει μεγάλη ανησυχία για τον πιθανό κίνδυνο αντιδράσεων υπερευαισθησίας στους ανθρώπους που καταναλώνουν υπολείμματα αντιβιοτικών στα τρόφιμα, οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες ή ανύπαρκτες

για τα περισσότερα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμών (Dayan, 1993).

Ανεπιθύμητες συνέπειες από υπολείμματα αντιβιοτικών στα τρόφιμα θα μπορούσαν να προκύψουν και από την αντιμικροβιακή δράση ενάντια στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα του ανθρώπου. Από *in vivo* μελέτες σε εθελοντές βρέθηκε ότι το ποσό των υπολειμμάτων που αφήνεται στα τρόφιμα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα ζωικών τροφίμων είναι πάρα πολύ χαμηλό για να θεωρηθεί ως μια σημαντική αιτία για την επιλογή της βακτηριακής ανθεκτικότητας στο έντερο (Tancrede και Barakat 1989, Corpet 1987). Τεχνολογικά προβλήματα μπορούν να προκύψουν εξαιτίας των υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο κρέας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων. Οι καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση του κρέατος μπορούν να ανασταλούν, με συνέπεια την αποτυχία ζύμωσης. Η παρουσία πενικιλίνης (2 IU/g) ή erythromycin (0,125 μg/g) έχει αναφερθεί ότι προκαλεί καθυστέρηση στη ζύμωση (Holley και Blaszyk, 1997).

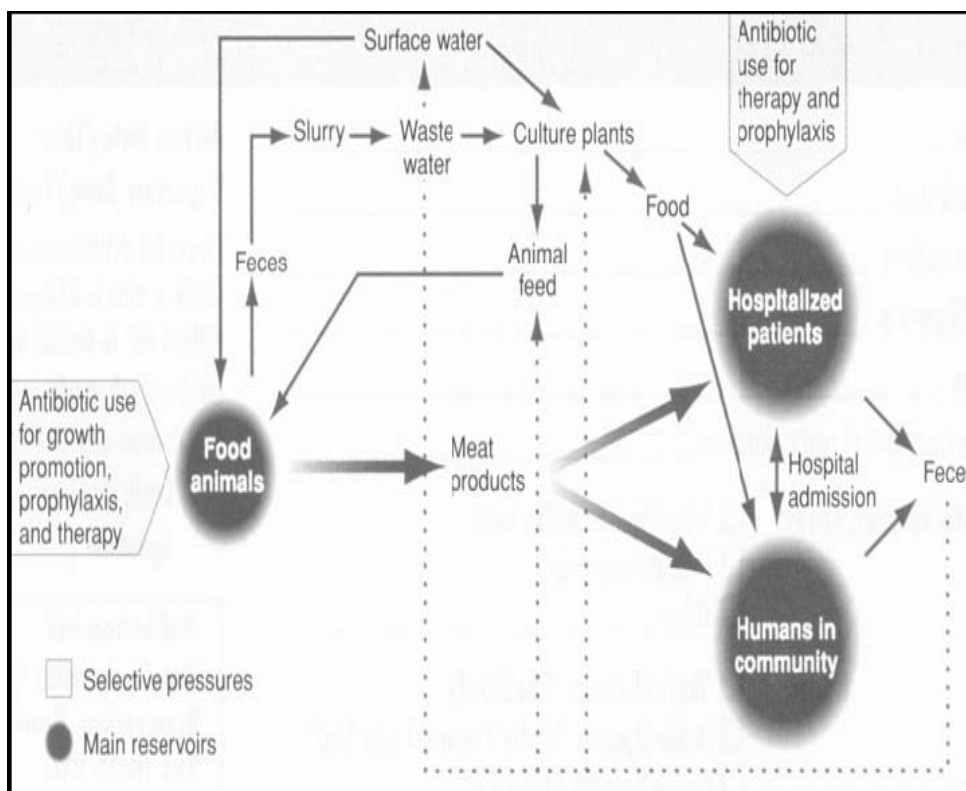
Όσον αφορά τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζωοτροφών, έχει καθιερωθεί ένα μέγιστο όριο υπολειμμάτων (maximum residue limit, MRL) για τα αντιβιοτικά, και έχουν περιληφθεί στον κανονισμό N° 2377/90 του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου. Ο σκοπός του MRL είναι να καθοριστεί ο χρόνος απόσυρσης, ο οποίος θα επιτρέπει στα επίπεδα του αντιβιοτικού να μειωθούν στα εγκεκριμένα επίπεδα, προτού διατεθούν τα προϊόντα στη αγορά προς κατανάλωση. Υποτίθεται ότι οι ποσότητες κάτω από το MRL δεν προκαλούν καμία ζημιά στον καταναλωτή. Το MRL διαφέρει ανάλογα με τον ιστό (μυς, συκώτι, νεφρό, γάλα, δέρμα, λίπος) και τα ζωικά είδη. Σε περιπτώσεις στις οποίες το MRL ξεπερνιέται, είτε ο χρόνος απόσυρσης δεν παρατηρήθηκε, είτε χρησιμοποιήθηκε υπερβολική δόση αντιβιοτικού. Εάν ένας τυχαίος έλεγχος αποκαλύπτει υπολείμματα επάνω από το MRL, ο παραγωγός είναι αρμόδιος και υφίσταται τις αντίστοιχες δικαστικές και οικονομικές κυρώσεις. Γενικά, τα αντιβιοτικά υπολείμματα στο κρέας και άλλα τρόφιμα μπορούν να θεωρηθούν ως χαμηλός κίνδυνος για τη δημόσια υγεία.

3. 3. Διάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι ενδογενής, δηλαδή χρωμοσωμικά κωδικοποιημένη και να μεταδίδεται κληρονομικά, ή επίκτητη, δηλαδή να εμφανίζεται σε στελέχη τα οποία κανονικά είναι ευαίσθητα σε κάποια αντιβιοτικά, και να είναι αποτέλεσμα τυχαίας μετάλλαξης ή να έχει μεταφερθεί σε αυτά με την πρόσληψη γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι κοινοί τόσο για την ενδογενή, όσο και για την επίκτητη ανθεκτικότητα και περιλαμβάνουν: α) την ενζυμική απενεργοποίηση του αντιβιοτικού, β) τον περιορισμό πρόσληψης του αντιβιοτικού και/ή την απομάκρυνσή του από το βακτηριακό κύτταρο και γ) την τροποποίηση του βακτηριακού στόχου του αντιβιοτικού (Teuber και συν., 1999).

Η αντιμικροβιακή αντίσταση μπορεί να προκύψει στα βακτήρια που βρίσκονται σε μεμονωμένα ζώα και ανθρώπους που εκτίθενται στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τα νοσοκομεία και οι περιοχές κτηνοτροφικής παραγωγής είναι ισχυρές εστίσεις της αντιβιοτικής εκλεκτικής πίεσης, αλλά η χρήση των αντιβιοτικών στην ανθρώπινη κοινωνία πρέπει να ληφθεί υπόψη επίσης.

Η διάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων μεταξύ των διαφορετικών περιβαλλόντων μπορεί να εμφανιστεί άμεσα από επαφή μεταξύ δέρματος, με επαφή με υλικά που περιέχουν βακτήρια (π.χ. περιττώματα, σάλιο), με κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή νερού και από τον αέρα. Μόλις μεταφερθούν στο νέο ξενιστή τα ανθεκτικά βακτήρια, μπορούν είτε να αποικίσουν εκεί και να τον μολύνουν, είτε να παραμείνουν εκεί για μόνο μια πολύ μικρή χρονική περίοδο. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, τα ανθεκτικά βακτήρια μπορούν να διαδώσουν τα γονίδια ανθεκτικότητάς τους σε άλλα βακτήρια του ξενιστή (παθογόνα ή μη), αλλά μπορούν επίσης και να δεχτούν γονίδια ανθεκτικότητας από άλλα βακτήρια (Salyers, 1995). Η πορεία διάδοσης των ανθεκτικών βακτηρίων και των ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά παρουσιάζεται στο σχήμα 1.2.



1.2. Οδοί διακίνησης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και των γονιδίων τους
Routes of transmission of antibiotic resistant bacteria and resistance genes. Adopted from (Witte, 2000)

Από όλα τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια που προκαλούν ανθρωποζωνόσους, η σαλμονέλα, το καμπυλοβακτήριο, το *E. coli* και ο εντερόκοκκος θεωρούνται τα σημαντικότερα είδη που μπορούν να επισημανθούν στις ζωικές πηγές (Witte, 1998). Ο κυρίαρχος τρόπος μετάδοσής τους στους ανθρώπους είναι μέσω της διατροφικής αλυσίδας. Εντούτοις, εάν εγκατασταθούν σε έναν ανθρώπινο πληθυσμό (που συνδέεται όχι πάντα με την ασθένεια), τα παθογόνα αυτά μπορούν να διαδοθούν μεταξύ των ανθρώπων με διάφορους τρόπους. Επομένως, είναι σημαντικό να θεωρηθεί ότι τα προαναφερθέντα βακτήρια που απομονώνονται από μια ανθρώπινη πηγή μπορεί να μην είχαν προέλθει απαραίτητως από ζώα ή από μολυσμένα ζωικά προϊόντα (Molbak και συν., 1999).

Η συχνότητα με την οποία οι ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μεταφέρεται μεταξύ ζώων και ανθρώπων είναι δύσκολο να αξιολογηθεί. Επομένως είναι δύσκολο με τα διαθέσιμα στοιχεία για να αναπτυχθεί μια ποσοτική αξιολόγηση του κινδύνου.

3. 4. Ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στα αντιβιοτικά

Αρκετά πρόσφατα, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος κέρδισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών ως προς την διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Teuber και συν., 1999). Αν και τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται γενικότερα μη παθογόνα, εν τούτοις μπορούν να είναι ξενιστές επίκτητων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, όπως γονιδία σύζευξης ή πλασμίδια και μεταθετά στοιχεία DNA.

3. 4. 1. Ενδογενής ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η ενδογενής ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, σε αντίθεση με την επίκτητη, δεν είναι επιζήμια, γιατί τα γονίδια που την καθορίζουν τοποθετημένα στο βακτηριακό χρωμόσωμα δεν έχουν την τάση να μετακινούνται. Ωστόσο, τα διαθέσιμα στοιχεία για την ενδογενή ανθεκτικότητα είναι σχετικά ανεπαρκή. Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν ενδογενή ανθεκτικότητα για τις κεφαλοσπορίνες (cephalosporins) και σε χαμηλά επίπεδα αμινογλυκοσιδών (aminoglycoside) και κλινδαμικύνης (clindamycin) (Teuber και συν., 1999, Knudtson και Hartman, 1993). Τα στελέχη των γενών *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc* έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν υψηλή φυσική ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό vancomycin, μια ιδιότητα χρήσιμη για τον διαχωρισμό τους από τα άλλα Gram+ βακτήρια (Hamolton, Miller και Shas 1998, Simpson και συν., 1988). Μερικοί λακτοβάκιλλοι έχουν υψηλή φυσική ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά bacitracin, xefoxitin, ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazin, teicoplanin trimethoprim/ sulphamethoxazole και vancomycin (Danielsen και Wind, 2002). Αναφέρεται ότι για αρκετά στελέχη λακτοβακίλλων παρατηρείται υψηλή συχνότητα τυχαίας μετάλλαξογένεσης όταν καλλιεργούνται παρουσία των αντιβιοτικών nitrofurazone (10^{-5}), kanamycin και streptomycin (Curragh και Collins, 1992). Από τα στοιχεία αυτά είναι φανερό ότι υπάρχουν διαφορές στην ενδογενή ανθεκτικότητα όχι μόνο στο εσωτερικό του γένους αλλά και ενδο-ειδικά, σε επίπεδο δηλαδή στελεχών. Συνεπώς είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση

των στελεχών που μελετώνται προκειμένου να ερμηνευτούν αποτελεσματικά τα δεδομένα μιας έρευνας.

3. 4. 2. Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι κοινά στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και οι διαφορές τους αφορούν το μέγεθος, τη λειτουργία και τη διανομή (Davidson και συν. 1996, Wang και Lee 1997). Οι λειτουργίες που εντάσσονται στα πλασμίδια περιλαμβάνουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, αμινοξέων και κιτρικού οξέος, την παραγωγή βακτηριοσινών και εξωπολυσακχαριτών και την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, τα βαρέα μέταλλα και τους φάγους. Τουλάχιστον 25 είδη λακτοβακίλλων περιέχουν ενδογενή πλασμίδια (Wang και Lee, 1997), και συχνά φαίνεται να περιέχονται πολλαπλά (από 1 ως 16) διαφορετικά πλασμίδια σε κάθε στέλεχος. Τα πλασμίδια είναι γνωστό ότι έχουν την δυνατότητα της οριζόντιας μεταφοράς από κύτταρο σε άλλο κύτταρο.

Τα R-πλασμίδια βρέθηκε ότι κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, ή macrolide – lincomycin – streptogramin για τα *Lb. reuteri* (Vescono και συν. 1983, Axelson και συν. 1988, Lin και συν. 1996, Tannock και συν. 1994), *Lb. fermentum* (Ishiwa και Iwata 1980, Fons και συν. 1997), *Lb. acidophilus* (Vescono και συν. 1982) και *Lb. plantarum* (Ahn και συν. 1992, Danielsen 2002) που απομονώθηκαν από ωμό κρέας, περιττώματα και ζωοτροφές. Τα περισσότερα από αυτά τα πλασμίδια έχουν μέγεθος μικρότερο των 10 Kb.

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν για ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, όπως τα erythromycin, vancomycin, tetracycline, chlorophenicol και gentamicin, είναι πιο εκτεταμένη στους εντερόκοκκους, και μπορεί να συμβαίνει είτε μέσω της παρουσίας πλασμιδίων (Christie και συν. 1987, Rice και Marshall 1998) είτε μέσω μεταθετών στοιχείων DNA (transposons) (Clewel και συν. 1995, Rice και Marshall 1994, Perreten και συν. 1997). Εκτός από τους εντερόκοκκους έχει αναφερθεί και στο πολύ συγγενικό είδος του *Lactococcus lactis*, που απομονώθηκε από τυρί πλασμίδιο που κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά streptomycin, tetracycline και chloramphenicol (Perreton και συν., 1997).

3. 4. 3. Μεταθετά στοιχεία DNA (transposons)

Είναι τμήματα του γενετικού υλικού και μπορούν να μετακινούνται μεταξύ των γενετικών δομών ενδοκυτταρικά ή μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών κυττάρων (συζευκτικά μεταθετά στοιχεία) (Sorum και L' Abee- Lund, 2002). Χαρακτηρίζονται από γονίδια τρανσποζασών τα οποία αποκόπτονται από το βακτήριο και ,με συζευκτική μεταβίβαση, ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό των βακτηρίων αποδεκτών. Το γνωστότερο παράδειγμα μεταθετού στοιχείου είναι αυτό της ανθεκτικότητας του Tn916 στις τετρακυκλίνες που εμφανίζεται στο *Enterococcus faecalis* (Flannagan και συν., 1994). Τα συζευκτικά μεταθετά στοιχεία προσδίδουν ανθεκτικότητα στα Gram⁺ βακτήρια. Έχουν βρεθεί στα *E. faecalis* (Tn916, Tn918, Tn920, Tn925 και Tn2702), *E. faecium* (Tn5233), *S. pyogenes* (Tn3701), *S. agalactiae* (Tn93951) και *Lactococcus lactis* (Tn5276 και Tn5301). Στους εντερόκοκκους και τους λακτόκοκκους καθορίζουν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά tetracycline, erythromycin, chloramphenicol και kanamycin. Ενδιαφέρον προκαλεί το μεγάλο εύρος των ξενιστών των μεταθετών στοιχείων Tn916 και Tn1545, τα οποία περιλαμβάνουν τόσο Gram⁺ όσο και Gram⁻ βακτήρια από τα γένη *Acetobacterium*, *Acholeplasma*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Thermus* και *Veillonella* (Clewell και Flannagan, 1995).

3. 4. 4. Συζευκτική (conjugative) μεταφορά μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μερικά από τα προαναφερθέντα R – πλασμίδια και μεταθετά στοιχεία DNA έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζονται σε άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, Gram⁺ βακτήρια αλλά και σε Gram⁻ βακτήρια. Οι εντερόκοκκοι είναι γνωστοί για την δεκτικότητά τους σε γονίδια μέσω της διαδικασίας σύζευξης (Clewell και Weaver, 1989), αλλά επίσης και για την ικανότητά τους να είναι δότες γονιδίων που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά τα οποία μεταβιβάζονται σε άλλους εντερόκοκκους (Rice και συν., 1998), σε λακτοβακίλλους (Shrago και Dobrogosz, 1988), σε σταφυλόκοκκους, σε στελέχη του γένους *Listeria* (Perreten και συν., 1997), σε άλλα Gram⁺ βακτήρια όπως το *Bacillus subtilis* (Christie και συν., 1987) αλλά επιπλέον και σε Gram⁻ βακτήρια (Courvalin 1994, Brisson - Noel και συν. 1988).

Αναφέρεται ότι πλασμίδιο που κωδικοποιεί ανθεκτικότητα στην καναμικίνη και μεταθετό στοιχείο DNA που κωδικοποιεί ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη (Doucet- Populaire και συν., 1992), τα οποία απομονώθηκαν από το *Enterococcus faecalis*, μπορούν να μεταφερθούν στα *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes* στο γαστρεντερικό σύστημα ποντικών. Σε αντίθεση, οι αναφορές για την δυνατότητα σύζευξης γονιδίων σε άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος σπανίζουν. Στη βιομηχανία τροφίμων βρίσκεται υπό μελέτη η διαδικασία μεταβίβασης πλασμιδίων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του γένους *Lactococcus*, με σκοπό τη βελτίωση των χαρακτηριστικών ή την πρόσθεση νέων χαρακτηριστικών (π.χ. παραγωγή βακτηριοσινών) στα προϊόντα παραγωγής (Gasson και de Vos, 1994).

Ανθεκτικότητα οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τρόφιμα

Υπάρχουν λίγες συστηματικές μελέτες που να ερευνούν την ενδογενή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Τα περισσότερα δεδομένα βασίζονται σε ευκαιριακά παθογόνους εντερόκοκκους, ενώ ο αριθμός των αναφορών για τους λακτόκοκκους και τους λακτοβακίλλους είναι περιορισμένος. Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στην ανθεκτικότητα στα γλυκοπεπτιδικά που παρουσιάζουν οι εντερόκοκκοι.

Οι εντερόκοκκοι, που είναι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό vancomycin, έχουν αναφερθεί την τελευταία δεκαετία ως μια συχνή αιτία για τις ενδονοσοκομειακές μολύνσεις, κυρίως στις ΗΠΑ, και έχουν συσχετιστεί με τη χρήση αντιβιοτικών της κατηγορίας των γλυκοπεπτιδίων στα νοσοκομεία (Jett και συν. 1994, Moellering 1998). Σημαντική ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στη vancomycin πιθανώς να οφείλεται στον εμπλουτισμό των ζωοτροφών με avoparcin σαν προαγωγό ανάπτυξης στην κτηνοτροφία και στην διάδοσή του μέσω της διατροφικής αλυσίδας (Wegener και συν. 1997, Klein και συν. 1998, Pavia και συν. 2000). Η αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στην βανκομυκίνη στους εντερόκοκκους αποδείχτηκε ότι διατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50% των στελεχών στα οποία μεταβιβάζονται. Η χρήση της avoparcin ως προωθητικό ανάπτυξης απαγορεύτηκε, αρχικά στην Δανία το 1995 και στην υπόλοιπη Ευρώπη το 1997, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί μια σημαντική μείωση της ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων μεταξύ του τελευταίου εξαμήνου του

1995 και του πρώτου εξαμήνου του 1998 στα κοτόπουλα (Bager, 2000). Εντερόκοκκοι που απομονώθηκαν από ωμό κρέας (Klein και συν. 1998, Quednau και συν. 1998) και από ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και κρέατα (Franz και συν. 2001, Teuber- Perreten και συν. 2000), στελέχη κυρίως από τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium*, αναλύθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών αντιβιοτικών και τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή διάδοση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά εντερόκοκκων στα τρόφιμα αυτά.

Στον πίνακα 1.5 παρουσιάζεται η ανθεκτικότητα στα οξυγαλακτικά βακτήρια, πέρα από τους εντερόκοκκους, που απομονώθηκαν από τρόφιμα.

Table 1.5. Overview of reported antibiotic resistances in food-associated lactic acid bacteria other than enterococci			
Foods	Species	Resistance	Remarks
Raw meat products			
Poultry	<i>Lb. reuteri</i> G4	<i>cat</i>	MIC of 256 µg/ml; located on plasmid (pTC82); 95% sequence similarity to <i>cat</i> from <i>S. aureus</i> plasmid pC194
	<i>Lb. reuteri</i> 100-63	<i>erm</i> (T)	MLS resistance; located on plasmid (pGT633); transferable to different gram-positive bacteria
Raw ground pork	<i>Lb. plantarum</i> caTC2R	<i>Cm^r</i>	Located on non-conjugative plasmid (pCaT); co-mobilizable by pAM 1 to <i>Carnobacterium piscicola</i>
Raw ground pork and beef	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> (total of 67 isolates)	Tetracycline (69%); Chloramphenicol (3%); Methicillin (85%)	Phenotypic susceptibility testing (disc diffusion)
Fermented products			
Raw milk soft cheese	<i>Lc. lactis lactis</i> strain K214	<i>str-ter</i> (S)- <i>cat</i>	Located on plasmid (pK214; 29.8 kb); <i>ter</i> (S) has 99.8% sequence similarity to <i>ter</i> (S) from <i>Listeria monocytogenes</i>
Greek cheese	<i>Lb. acidophilus</i> ACA-DC 243	Penicillin	Phenotypic susceptibility testing (disc diffusion)
Yoghurt starter cultures	<i>S. thermophilus</i> and <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Novobiocin, cloxacillin, oxacillin, polymyxin B, neomycin, lincomycin, doxycycline	Phenotypic susceptibility testing (disc diffusion)
Nigerian fermented foods and beverages	<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , and <i>Lb. jensenii</i> (total of 50 isolates)	Cloxacillin (80%); Penicillin (77.5%); Ampicillin (47.5%); Tetracycline (42.5%); Chloramphenicol (20%); Erythromycin (17.5%)	Phenotypic susceptibility testing (disc diffusion)
Others			
Maize silage	<i>Lb. plantarum</i> 5057	<i>ter</i> (M)	Located on plasmid (pMD5057; 10.9 kb); MIC > 256 µg/ml
<i>Lb. : Lactobacillus</i> ; <i>Lc. : Lactococcus</i> ; <i>Leuc. : Leuconostoc</i> , <i>S. : Streptococcus</i> ; <i>cat</i> : chloramphenicol acetylase gene; <i>str</i> : streptomycin acetylase gene; <i>ter</i> : tetracycline resistance gene; <i>erm</i> : erythromycin resistance gene; MIC: minimal inhibitory concentration; MLS: macrolide-lincosamide-streptogramin			

3. 5. Ανθεκτικότητα και ευαισθησία στα αντιβιοτικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Οι λακτοβάκιλλοι είναι σημαντικοί για την βιομηχανία τροφίμων και γαλακτοκομικών προϊόντων. Από καλλιέργειες εκκίνησης γιαούρτης απομονώθηκαν

31 στελέχη του *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, τα οποία εμφάνισαν ενδογενή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά mycostatin, nalidixic acid, neomycin, polymyxin B, trimethoprim, colimycin, sulfamthoxazol και στα sulfonamid (Sozzi και Smiley, 1980).

Οι λακτόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στα περισσότερα κλινικά αντιβιοτικά. Στελέχη του *Lactococcus lactis* βρέθηκαν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά amikacin, ampicillin, στις πρώτης γενιάς κεφαλοσπορίνες, chloromphenicol, erythromycin, gentamicin, mipenem, oxacillin, penicillin, piperacillin, sulfonamid, tetracycline, trimethoprim/ sulfomthoxazol και vancomycin, ενώ εμφάνισαν χαμηλότερη ευαισθησία στα carbenicillin, ciprofloxacin, dicloxacillin και norfloxacin. (Βιβλιογραφία)

Από καλλιέργειες γιαουρτιού 15 στελέχη του *Streptococcus thermophilus* εμφάνισαν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά colimicin, gentamicin, kanamycin, mycostatin, neomycin, polymyxin B, alidix acid, streptomycin, trimethoprim/ sulfothoxazol, αλλά σταθερά επίπεδα ανθεκτικότητας στη sulfonamide (Sozzi και Smiley, 1980). Από ποικιλία στελεχών που απομονώθηκαν από συλλογές καλλιεργειών παρατηρήθηκε ότι 38 στελέχη των *S. lactis subsp. cremoris* και *S. lactis subsp. lactis* ήταν ανθεκτικά στην trimethoprim και την sulfathiazole. Διαφορά στην ανθεκτικότητα παρουσιάστηκε στα αντιβιοτικά gentamicin, kanamycin, lincomycin, nafcillin, neomycin, nisin, rifampin και streptomycin (Orberg και Sandine, 1985).

Στελέχη του γένους *Bifidobacterium* που απομονώθηκαν από γαλακτομικά προϊόντα βρέθηκαν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ampicillin, penicillin G, cephalosporin, bacitracin, chloramphenicol, erythromycin, clysdamycin, nitrofurantoin, tetracycline, vancomycin, kanamycin, streptomycin, fusidic acid, norfloxacin, nalidix acid, metronidazol, polymyxin B και colistin. Το *Enterococcus faecium*, το οποίο χρησιμοποιείται σαν προβιοτικό είναι ενδογενώς ανθεκτικό στα αντιβιοτικά kanamycin, streptomycin και oxacillin, αλλά ευαίσθητο στα erythromycin, framycetin, streptomycin/penicillin, tetracycline και chloramphenicol (Teuber και συν., 1999).

Β) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4^ο

4. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανίχνευση, καταμέτρηση και ταυτοποίηση των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που περιέχονται στα γιαούρτια της ελληνικής αγοράς και ο έλεγχος συγκεκριμένων στελεχών που θα απομονωθούν από τα δείγματα αυτά ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά. Ο έλεγχος των πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά τις συγκεντρώσεις των ζωντανών βακτηρίων που υπάρχουν στο έτοιμο προϊόν.

Κεφάλαιο 5^ο

5. Υλικά και μέθοδοι

5. 1. Περιγραφή δείγματος

Το δείγμα της εργασίας αυτής περιελάμβανε γιαούρτια (από αγελαδινό ή πρόβειο γάλα) και άλλα ζυμωμένα προϊόντα γάλατος που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά. Συγκεκριμένα το δείγμα αποτέλεσαν 42 γαλακτοκομικά προϊόντα, εκ των οποίων 30 γιαούρτια, 2 ξινόγαλα και 10 επιδόρπια γιαουρτιού. Τα δείγματα αγοράστηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο γρήγορα όπου και συντηρήθηκαν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυσή τους. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν πριν από την λήξη της ημερομηνίας κατανάλωσής τους

5. 2. Υλικά και θρεπτικά υποστρώματα

Ως μέσο αραίωσης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα PPS (Peptone Physiological Solution), για την απομόνωση των μικροβιακών πληθυσμών από το δείγμα, με προσθήκη 0,1% peptone και 0,85% NaCl σε απιονισμένο νερό. Το υλικό παρασκευάζεται, μεταφέρεται σε φιαλίδια McCartney (9ml PPS) και αποστειρώνεται στους 121° C για 15 λεπτά.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι:

1. M17 (Oxoid), σε μορφή άγαρ ή υγρού (Broth), για την απομόνωση και παραλαβή των Gram⁺ κόκκων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Παρασκευάζεται με ανάμιξη της προτεινόμενης από την κατασκευάστρια εταιρία ποσότητα σε απιονισμένο νερό και αποστειρώνεται στους 121° C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα λακτόζης 10% με αναλογία 50ml διαλύματος λακτόζης ανά 1000ml υποστρώματος M17.
2. MRS (Oxoid), σε μορφή άγαρ ή υγρού (Broth), για την απομόνωση και παραλαβή των λακτοβακίλλων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και για την ταυτοποίησή τους και τον έλεγχο ανθεκτικότητάς τους στα

αντιβιοτικά. Παρασκευάζεται με ανάμιξη της προτεινόμενης από την κατασκευάστρια εταιρία ποσότητα σε απιονισμένο νερό και αποστειρώνεται στους 121° C για 15 λεπτά.

3. mMRS (modified MRS), σε μορφή άγαρ ή υγρού (Broth), για την απομόνωση και παραλαβή των μπιφιδοβακτηρίων. Παρασκευάζεται με την προσθήκη L-cysteinehydrochloride Monohydrate στο MRS, με αναλογία 0,5g ανά 1 λίτρο MRS.
4. ST agar, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των Gram⁺ κόκκων. Παρασκευάζεται με προσθήκη 10g τρυπτόνης, 10g σακχαρόζης, 5g yeast extract, 2g K₂PO₄ και 12g άγαρ σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού και αποστειρώνεται στους 121° C για 15 λεπτά.
5. Soft agar, χρησιμοποιείται στη διαδικασία ελέγχου της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των λακτοβάκιλλων. Παρασκευάζεται με προσθήκη 1% άγαρ σε απιονισμένο νερό και αποστειρώνεται στις ίδιες συνθήκες.

5. 3. Παραλαβή και απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Δειγματοληψία-επίστρωση-επώαση

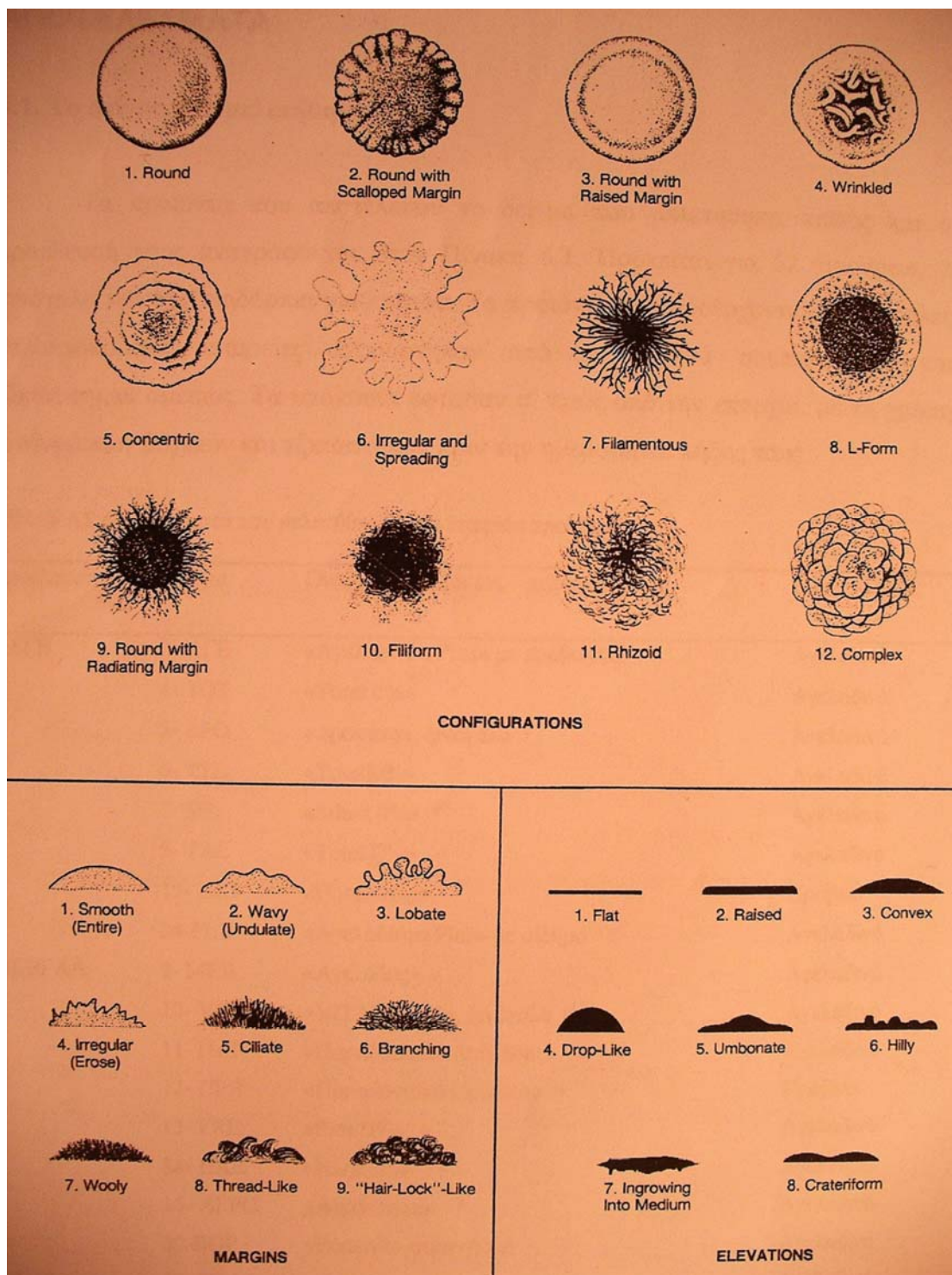
Ζυγίζουμε με προσοχή από κάθε δείγμα (ανοίγεται εκείνη τη στιγμή) ποσότητα 1g και το μεταφέρουμε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο McCartney το οποίο περιέχει προ-βρασμένο (100° C για 20 λεπτά) PPS. Η επιπλέον αυτή επεξεργασία γίνεται έτσι ώστε να αφαιρεθεί η ποσότητα οξυγόνου που βρίσκεται στο υγρό και να μην λειτουργήσει ως ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηριακών κυττάρων. Ακολουθεί ήπια και συνεχής ανάδευση έτσι ώστε να ομογενοποιηθεί η πρώτη αραιώση του δείγματος και στη συνέχεια γίνονται και οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (10^{-1} έως 10^{-7}). Από κάθε δεκαδική αραιώση του δείγματος και ξεκινώντας από την αραιότερη γίνεται επίστρωση τριών τρυβλίων για κάθε θρεπτικό υλικό, M17 για τους λακτόκοκκους, MRS για τους λακτοβάκιλλους και mMRS για τα μπιφιδοβακτήρια. Η επίστρωση γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματώδους ροής. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε διαφορετικές συνθήκες για τις διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών. Η επώαση των M17 τρυβλίων γίνεται σε αερόβιες συνθήκες στους 30° C για 48 ώρες. Η επώαση των

τρυβλίων MRS και mMRS γίνεται αναερόβια στους 37° C για 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, σε ειδικό θάλαμο αναερόβιων συνθηκών (Bactron anaerobic chamber, model 1.5, με εσωτερική ατμόσφαιρα σύστασης: N₂, H₂ 5,2%, CO₂ 5%).

Περιγραφή και καταμέτρηση αποικιών - απομόνωση αποικιών

Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης γίνεται παρατήρηση και περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών, που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία κάθε θρεπτικού υλικού, σύμφωνα με το χρώμα, το μέγεθος, την υφή και το σχήμα τους. Στη συνέχεια γίνεται δοκιμή καταλάσης και μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram, ώστε να απορριφθούν οι τύποι αποικίας που είναι θετικοί στη δοκιμή καταλάσης και αρνητικοί στη χρώση Gram. Ακολουθεί η καταμέτρηση των αποικιών των κόκκων, βακίλλων και μπιφιδοβακτηρίων που βγήκαν αρνητικές στη δοκιμή καταλάσης και θετικές στη χρώση Gram. Στο υλικό M17 μετρούνται μόνο οι κόκκοι, στο MRS μόνο οι βάκιλλοι και στο mMRS μόνο τα μπιφιδοβακτήρια, τα οποία είναι βάκιλλοι χαρακτηριστικού δισχιδούς σχήματος.

Από κάθε θρεπτικό υλικό επιλέγονται τυχαία 3 μεμονωμένες αποικίες για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας και γίνεται γραμμική διασπορά στο ίδιο υλικό και νέα επώαση στις ίδιες συνθήκες, ώστε να έχουμε στο νέο τρυβλίο καθαρές καλλιέργειες με μεμονωμένες αποικίες.



Περιγραφή μορφολογίας αποικιών βακτηρίων (H.J.Benson, 1998)

Συντήρηση των βακτηριακών απομονώσεων

Από κάθε στέλεχος που απομονώθηκε γίνεται υγρή καλλιέργεια σε 5ml από το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό (M17-Broth για λακτόκοκκους, MRS-Broth για λακτόβακίλλους και mMRS-Broth για μπιφιδοβακτήρια), η οποία εμβολιάζεται από

μεμονωμένη αποικία. Ακολουθεί επώαση του κάθε υγρού θρεπτικού υλικού στις ανάλογες συνθήκες. Μετά την επώαση, μεταφέρονται σε αποστειρωμένη γλυκερόλη (30% κ.ο.) σε φιαλίδιο erpendorf και αποθηκεύονται στους -80°C .

5. 4. Ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών του δείγματος της μελέτης έχει ξεκινήσει από το στάδιο της απομόνωσης των αποικιών χρησιμοποιώντας μορφολογικά και βιοχημικά κριτήρια, όπως η μορφή των αποικιών, η χρώση Gram, το σχήμα των κυττάρων και οι σχηματισμοί που διαμορφώνουν μεταξύ τους κ.α. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν αναβιώνονται από τους -80°C σε τρυβλία με το αντίστοιχο υπόστρωμα, ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα των αποικιών και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για ταυτοποίηση με βιοχημικές μεθόδους.

Στρεπτόκοκκοι

Η ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων, αφού γίνει επανέλεγχος των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών με χρώση Gram για να εξασφαλιστεί η καθαρότητά τους, γίνεται με βιοχημική μέθοδο με τη χρήση του συστήματος API Rapid ID 32 STREP, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώαση γίνεται στους 37°C για 4 ώρες. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό (APILAB PLUS v 3.3.3).

Λακτοβάκιλλοι

Η ταυτοποίηση των λακτοβακίλλων γίνεται με βιοχημική μέθοδο, μετά τον επανέλεγχο των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών με χρώση Gram, με το σύστημα API 50 CHL, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επώαση γίνεται στους 37°C για 48 ώρες.

Αρχικά δημιουργείται ένα εναιώρημα στο υλικό API CHL medium με το προς εξέταση στέλεχος και στη συνέχεια εμβολιάζονται με αυτό 49 σωληνάρια μιας ειδικής ταινίας, που περιέχουν διαφορετικά είδη υδατανθράκων. Κατά την επώαση, οι υδατάνθρακες ζυμώνονται σε οξέα, τα οποία προκαλούν μείωση του pH, που ανιχνεύεται με αλλαγή του χρώματος του δείκτη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το

βιοχημικό προφίλ του στελέχους που εξετάζεται. Αυτό ταυτοποιείται με το λογισμικό της εταιρίας APILAB PLUS v5.0, το οποίο μας δίνει πληροφορίες για:

1. το ποσοστό ταυτοποίησης: μια εκτίμηση του ποσοστού αντιστοιχίας του βιοχημικού προφίλ του εξεταζόμενου στελέχους με το βιοχημικό προφίλ του πρότυπου στελέχους στο οποίο αποδίδεται, σε σχέση με τα στελέχη της βάσης δεδομένων.
2. την τιμή T: μια εκτίμηση για την ακρίβεια με την οποία αντιστοιχεί το βιοχημικό προφίλ του εξεταζόμενου στελέχους με το τυπικό βιοχημικό προφίλ του είδους στο οποίο αποδίδεται. Η τιμή κυμαίνεται από 0 έως 1.
3. την ποιότητα της ταυτοποίησης (μέτρια, καλή κ.α.) με βάση το συνδυασμό των παραπάνω δύο.

Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι περιορίζεται στην ταυτοποίηση των ειδών που περιέχονται στη βάση δεδομένων και δεν μπορεί να δώσει απαντήσεις ως προς την ταυτοποίηση άλλων στελεχών που μπορεί να παρουσιάζουν μικρές διαφορές στο βιοχημικό τους προφίλ, γεγονός το οποίο είναι αρκετά σύνηθες στους λακτοβακίλλους, αλλά ούτε και να αποκλείσει την παρουσία τους.

Μπιφιδοβακτήρια

Οι μη σποριογόνοι Gram(+) και catalase (-) βάκιλλοι με το χαρακτηριστικό δισχιδές σχήμα, ταυτοποιούνται σε επίπεδο γένους χρησιμοποιώντας μορφολογικά και γενετικά κριτήρια.

1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά: μορφολογία κυττάρων, σχήμα αποικιών κ.α.
2. Γενετικός έλεγχος για την παρουσία νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, στο γονιδίωμα των εξεταζόμενων στελεχών με την τεχνική PCR. Η ακολουθία αυτή προέρχεται από την περιοχή που κωδικοποιεί την σύνθεση 16S rRNA στο γένος *Bifidobacterium* και είναι χαρακτηριστική του γένους.

Ο γενετικός έλεγχος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: (α) απομόνωση DNA του στελέχους, (β) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), (γ) ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, (δ) χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση κάτω από λάμπα UV.

Αναλυτικά οι παραπάνω διαδικασίες έχουν ως εξής:

α) Απομόνωση DNA

Η μέθοδος βρασμού σε Triton X-100 κατά Wang και συν. (1996) χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση της απομόνωσης DNA από καθαρές υγρές καλλιέργειες των εξεταζόμενων στελεχών.

1. Φυγοκέντρηση απευθείας των κυττάρων στις υγρές καλλιέργειες στις 9000 rpm για 3 λεπτά, προκειμένου να συγκεντρωθούν τα βακτηριακά κύτταρα σε ίζημα (pellet).
2. Ξέπλυμα του ιζήματος 2 φορές με PBS και μια φορά με απιονισμένο νερό.
3. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 0,1 ml % Triton X-100, θέρμανση σε ζέον υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά και άμεση μεταφορά σε πάγο προκειμένου να επέλθει η λύση των κυττάρων.

Η PCR στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται χωρίς απομόνωση του DNA και καθαρισμό με φαινόλη, π.χ. 2μl από κάθε δείγμα προστίθενται απευθείας σε 23μl μίγματος PCR, με απαραίτητη προσθήκη BSA για τυχόν παρουσία αναστολέων της διαδικασίας (Bovine Serum Albumin).

β) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η εξειδικευμένη ως προς το γένος *Bifidobacterium* αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές PCR (primers) Bif164-f και Bif662-r κατά τους Satokari και συν. (2001), οι οποίοι στοχεύουν στο 16S rRNA των μικροοργανισμών του γένους αυτού και οδηγούν σε PCR προϊόντα περίπου 520bp (πίνακας 1). Οι εκκινητές προήλθαν από την εταιρία InvitrogenTM Life Technologies England.

Πίνακας 1 Εκκινητές PCR που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Χρήση	Εξειδίκευση στόχου
Bif164-f	GGGTGGTAATGCCGGATG	PCR	Bifidobacterium 16S
Bif662-r	CCACCGTTACACCGGGAA	PCR	Bifidobacterium 16S

Satokari και συν. (2001), Walter και συν. (2001), Vwrsalovic, Koeuth και Lupski (1991)

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης (Thermuq aquaticus DNA Polymerase) της εταιρίας HyTest (#7 T1, Lab Supplies). Το μίγμα της αντίδρασης συνίσταται από Reaction Buffer 10x

(670mM Tris-HCL, pH 8.8, 166mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP's), 0,25 μM συγκέντρωση από κάθε εκκινητή, 2,5 U Taq DNA πολυμεράσης και 2μl DNA, σε διάλυση προς τελικό όγκο 50μl. Επίσης προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης και 25μg BSA 20mg/ml (SB04a, HyTest). Η PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή PCR Primus 96Plus (MWG AG Biotech) βάση του ακόλουθου προγράμματος (Bif 12 cys): θέρμανση στους 94 °C για 5 λεπτά (hot start), 35 κύκλοι σε θερμοκρασία 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 62 °C για 20 δευτερόλεπτα και 68 °C για 40 δευτερόλεπτα, και τελικά θέρμανση στους 68 °C για 7 λεπτά (final extension). Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος τα προϊόντα της PCR ψύχονται στους 4 °C.

γ) Ηλεκτοφόρηση σε 1,5% πήκτωμα αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε 1,5% (w/v) πήκτωμα αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (Tris-Acetate-EDTA) (Sambrook και συν. 1989). Το πήκτωμα αгарόζης παρασκευάζεται με ανάμιξη 1,5 g αгарόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή τάση 100V για 30 λεπτά σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Owl B1A. Ως πρότυπο αναφοράς στις ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε ο ladder Lamda DNA/Hind III Digest (HT Biotechnology LTD, Cambridge England).

δ) Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση κάτω από λάμπα UV

Το μέγεθος και η ποσότητα του DNA, όπως προκύπτει από τις ηλεκτροφορήσεις, εκτιμώνται, έπειτα από τοποθέτηση του πηκτώματος σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 1 μg/ml για 20-30 λεπτά και παρατήρηση με λαμπτήρα υπεριώδους φωτός 6W (UVGL-58 Handheld UV-Lamp, UVP) σε κατάλληλο σύστημα (Gel Documentation & Analysis System, GDS8000, UVP).

5. 5. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά γίνεται με την μέθοδο της διάχυσης των αντιβιοτικών ουσιών στο υπόστρωμα (disc diffusion method) και η οποία περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων τοποθέτηση των αντιβιοτικών, τα οποία είναι

σε μορφή χάρτινων δισκίων, στο ανάλογο υπόστρωμα για κάθε στέλεχος που θα εξεταστεί.

1. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά για τα στελέχη του γένους *Streptococcus*

Αρχικά γίνεται αναβίωση των στελεχών από τους -80° C με γραμμική διασπορά 20μL σε τρυβλία με ST άγαρ. Ακολουθεί επώαση για 48 ώρες στους 30° C και γίνεται έλεγχος καθαρότητας των στελεχών με χρώση Gram, δοκιμή καταλάσης και μικροσκοπική παρατήρηση. Έπειτα από τα καθαρά στελέχη γίνονται ανακαλλιέργειες σε νέα τρυβλία με ST και επώαση για 24 ώρες. Από τις ανακαλλιέργειες αυτές λαμβάνονται, υπό ασηπτικές συνθήκες με βακτηριολογικό κρίκο τόσες πανομοιότυπες αποικίες έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα εναιώρημα 4ml σε φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) με θολερότητα ίση με το σημείο 1 στη κλίμακα McFarland. Στο εναιώρημα αυτό βυθίζουμε έναν αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στύλεο και με τη βοήθεια αυτού επιστρώνουμε τρυβλίο Petri διαμέτρου 150mm με 45ml ST άγαρ τρεις φορές, περιστρέφοντας το τρυβλίο μετά από κάθε επίστρωση κατά 60°, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφος εμβολιασμός. Για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις εμβολιασμοί σε αντίστοιχα τρυβλία petri, στα οποία όταν στέγνωσαν τοποθετήθηκαν τα αντιβιοτικά δισκία.

Οι ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Παρεμποδιστές της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων (Ampicillin 10μg, Vancomycin 30μg, Bacitracin 10μg)
- Παρεμποδιστές της σύνθεσης πρωτεϊνών (Tetracycline 30μg, Erythromycin 15μg, Streptomycin 300μg, Gentamycin 120μg)
- Παρεμποδιστές της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (Ciprofloxacin 5μg, Rifampicin 5μg, Nitrofurantoin 300μg, Norfloxacin 10μg, Ofloxacin 5μg)

Μετά την τοποθέτηση των αντιβιοτικών τα τρυβλία επωάζονται αερόβια για 24 ώρες στους 30° C και στη συνέχεια μετράτε η διάμετρος της ζώνης παρεμπόδισης που έχει σχηματισθεί γύρω από κάθε αντιβιοτικό δισκίο. Με βάση τα όρια παρεμπόδισης των ζωνών που αναφέρονται στις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας (BD), τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα

(sensitive, S), μετρίως ευαίσθητα (intermediate, I) ή ανθεκτικά (resistant, R) για κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά.

2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά για τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*

Αρχικά γίνεται αναβίωση των στελεχών από τους -80°C με γραμμική διασπορά σε τρυβλία με MRS άγαρ. Ακολουθεί επώαση για 48 ώρες στους 37°C αναερόβια και γίνεται έλεγχος καθαρότητας των στελεχών με χρώση Gram, δοκιμή καταλάσης και μικροσκοπική παρατήρηση. Μετά τον έλεγχο καθαρότητας των αποικιών, γίνεται εμβολιασμός σε σωλήνα με 5ml υγρού υποστρώματος MRS Broth και αναερόβια επώαση για 48 ώρες, ακολουθούμενη από δύο συνεχείς 48ώρες ανακαλλιέργειες σε MRS Broth. Σε υδατόλουτρο 45°C διατηρούνται φιαλίδια McCartney με 12ml Soft agar, τα οποία εμβολιάζονται με 0,6ml της υγρής καλλιέργειας και αφού αναδευτούν και ομογενοποιηθούν χρησιμοποιούνται για την επίστρωση τρυβλίων petri που περιέχουν 45 ml MRS άγαρ. Για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις εμβολιασμοί σε αντίστοιχα τρυβλία Petri, στα οποία όταν στέγνωσαν τοποθετήθηκαν τα αντιβιοτικά δισκία.

Οι ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Παρεμποδιστές της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων (Ampicillin 10μg, Vancomycin 30μg, Bacitracin 10μg, Cephalothin 30μg, Amoxicillin 20μg / Clavulanic acid 10μg)
- Παρεμποδιστές της σύνθεσης πρωτεϊνών (Tetracycline 30μg, Erythromycin 15μg, Amicacin 30μg, Kanamycin 30μg, Chloramphenicol 30μg)
- Παρεμποδιστές της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (Ciprofloxacin 5μg, Rifampicin 5μg)

Μετά την τοποθέτηση των αντιβιοτικών τα τρυβλία επωάζονται αναερόβια για 24 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια μετράται η διάμετρος της ζώνης παρεμπόδισης που έχει σχηματισθεί γύρω από κάθε αντιβιοτικό δισκίο. Με βάση τα όρια παρεμπόδισης των ζωνών που αναφέρονται από τους Charteris et al. (1998), τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (sensitive, S), μετρίως ευαίσθητα (intermediate, I) ή ανθεκτικά (resistant, R).

5. 6. Μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση των προγραμμάτων Microsoft Excel και Minitab. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται οι δεκαδικοί λογάριθμοι $\log_{10}\text{CFU/g}$ των πληθυσμών των βακτηριακών στελεχών, οι οποίοι εκφράζονται ως βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες ανά γραμμάριο προϊόντος (CFU). Με τη χρήση One Sample T-test θα γίνει σύγκριση της μέσης τιμής των τριών επαναλήψεων για κάθε είδος μικροοργανισμού κάθε γιαουρτιού με τις πρότυπες συγκεντρώσεις πληθυσμών που ορίζονται από τη νομοθεσία.

Στον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά θα γίνει καταγραφή του ποσοστού των ανθεκτικών, των ενδιάμεσων και των ευαίσθητων στελεχών κάθε μικροοργανισμού για κάθε αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε.

Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 6^ο

6. Αποτελέσματα

6. 1. Το δείγμα μελέτης

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 30 γιαούρτια, 10 επιδόρπια γιαουρτιού και 2 ξινόγαλα. Τα προϊόντα αυτά προέρχονται από μεγάλες γαλακτοκομικές εταιρίες, αγοράστηκαν σε σουπερμάρκετ και εξεταστήκαν πριν από την ημερομηνία λήξης. Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζεται το δείγμα, ο τόπος προέλευσης, η ονομασία και το είδος γάλατος κάθε προϊόντος.

Πίνακας 6.1 Το δείγμα μελέτης

Προέλευση	Ονομασία προϊόντος-παραγωγού	Κωδικός	Είδος γάλακτος
ΝΟΥΝΟΥ	ΝΟΥΝΟΥ classic 2%	1-ΝΟΥ1	Αγελαδινό
	ΝΟΥΝΟΥ classic 10%	2-ΝΟΥ2	Αγελαδινό
	ΝΟΥΝΟΥ αγελάδος 4%	3-ΝΟΥ3	Αγελαδινό
	ΝΟΥΝΟΥ Noulac, Probiotic με Fe	10-ΝΟΥ4	Επιδόρπιο γιαουρτού
	ΝΟΥΝΟΥ Kid, Probiotic με Ca	11-ΝΟΥ5	Επιδόρπιο γιαουρτού
ΟΛΥΜΠΟΣ	ΟΛΥΜΠΟΣ Επιλεγμένο 5%	4-ΟΛ1	50%αγελαδινο 50%προβειο
	ΟΛΥΜΠΟΣ Πρόβειο	9-ΟΛ2	Πρόβειο
	ΟΛΥΜΠΟΣ Biostar	37-ΟΛ3	Αγελαδινό
ΜΕΒΓΑΛ	ΜΕΒΓΑΛ αγελάδας παραδοσιακό	5-M2	Αγελαδινό
	ΜΕΒΓΑΛ πρόβειο παραδοσιακό	6-M1	Πρόβειο
	ΜΕΒΓΑΛ Free 0%	20-M3	Επιδόρπιο γιαουρτού
	ΜΕΒΓΑΛ Harmony 10% στραγγιστό	30-M4	Αγελαδινό
	ΜΕΒΓΑΛ only 2%	32-M5	Επιδόρπιο γιαουρτού
	ΜΕΒΓΑΛ Αγρόκτημα Βραχιάς 4%	34-ΑΒ	Αγελαδινό
ΔΕΛΤΑ	ΜΕΒΓΑΛ Vita Fresh	39-M6	Ξινόγαλο
	ΔΕΛΤΑ Natural αγελάδος	18-Δ1	Αγελαδινό
	ΔΕΛΤΑ Vitaline στραγγιστό 0%	19-Δ2	Αγελαδινό
	ΔΕΛΤΑ αγελάδος 4%	27-Δ3	Αγελαδινό
	ΔΕΛΤΑ complet 2%	28-Δ4	Αγελαδινό
	ΔΕΛΤΑ Danone Actimel με L. casei Defensis	13-D1	Επιδόρπιο γιαουρτού
	ΔΕΛΤΑ complet 10% στραγγιστό	29-Δ5	Αγελαδινό
	ΔΕΛΤΑ αυθεντικό	40-Δ6	50%αγελαδινο 50%προβειο
ΒΕCΕL	ΔΕΛΤΑ Advance με Fe και βιταμίνες	42-Δ7	Επιδόρπιο γιαουρτού
	Becel pro-active, αγελαδινό γιαούρτι	12-B1	Επιδόρπιο γιαουρτού

	-φράουλα		
	Becel pro-active 100ml	17-B2	Επιδόρπιο γιαουρτού
ΦΑΓΕ	ΦΑΓΕ Αγελαδίτσα	8-Φ1	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ total 10%	21-Φ2	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ total 5% light	22-Φ3	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ total 2%	23-Φ4	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ total 0%	24-Φ5	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ siluet 1%	31-Φ6	Αγελαδινό
	ΦΑΓΕ Drossato Buttermilk	35-Φ7	Ξινόγαλο
	ΦΑΓΕ ΑΒΓ	36-Φ8	Επιδόρπιο γιαουρτού
	ΦΑΓΕ Αγελαδίτσα με Bifidus	38-Φ9	Αγελαδινό
Μέγαρο	Ωμέγα, αγελάδος	16-Ω1	Αγελαδινό
Αττική	Ο Τσέλιγκας, αγελάδος	14-ΤΣ1	Αγελαδινό
	Ο Τσέλιγκας, πρόβειο	15-ΤΣ2	50%αγελαδινο 50%προβειο
Ιταλία	Jogole probiotic drink	7-J1	Επιδόρπιο γιαουρτού
Σέρρες	Κρι κρι 3,85%	25-κρι1	Αγελαδινό
	Κρι κρι 2% στραγγιστό	26-κρι2	Αγελαδινό
Αττική	Δημητρίου ελαφρύ 3,85%	33-ΔΜ	Αγελαδινό
Ιωάννινα	Δωδώνη στραγγιστό αγελάδος 8%	41-Δωδ1	Αγελαδινό

6. 2. Καταμέτρηση και απομόνωση των βακτηριακών πληθυσμών

6. 2. 1. Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους *Streptococcus*

Καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί των κόκκων που αναπτύχθηκαν με αερόβια επώαση των δειγμάτων σε θρεπτικό υλικό M17 και βρέθηκαν αρνητικοί στο τεστ καταλάσης και θετικοί στη χρώση Gram. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται ως βιώσιμες αναπαραγωγικές ανά γραμμάριο προϊόντος (CFU/g).

Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των κόκκων που καταμετρήθηκαν σε κάθε προϊόν του δείγματος και γίνεται διάκριση των διαφορετικών τύπων αποικιών και περιγραφή των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Τα στοιχεία περιγραφής των μορφολογικών χαρακτηριστικών αναφέρονται στο σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος, το περίγραμμα και το σχήμα κάτοψης της αποικίας. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος CFU/g που μετρήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις και στην τελευταία στήλη του πίνακα αναγράφεται ο αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Πίνακας 6.2 Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους Streptococcus

Κωδικός	Ονομασία αποικίας	Περιγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών	Πληθυσμοί (μ.ο.)	Στελέχη που απομονώθηκαν
1-NOY1	NOY1	round, convex, smooth	$2,79 * 10^9$	3
2-NOY2	NOY2	round, convex, smooth	$1,86 * 10^9$	3
3-NOY3	NOY3	round, convex, smooth	$6,2 * 10^9$	3
10-NOY4	NOY4	round, drop-like, smooth, μπεζ, 0,5mm	$8,6 * 10^8$	3
11-NOY5	NOY5 1	round, ελαφρά unbonate, μπεζ, 0,1mm	$7,36 * 10^9$	3
4-ΟΛ1	ΟΛ1	μπεζ, round, convex, 0,1 mm	$2,33 * 10^8$	3
9-ΟΛ2	1-8	μεγάλη, μπεζ, round, convex, 1mm	$4,08 * 10^8$	3
	2-9	μικρή, μπεζ, round, flat, 0,5mm	$7,75 * 10^7$	3
37-ΟΛ3	ΟΛ3	μπεζ, round, convex, smooth, 0,5-1mm	$10,1 * 10^8$	
5-M2	M2	μπεζ, round, convex, 0,1 mm	$3,5 * 10^8$	3
6-M1	1-7	μεγάλη, μπεζ, round, convex, 1mm	$4,79 * 10^8$	3
	2-8	μικρή, μπεζ, round, convex, 0,1mm	$7,1 * 10^7$	
20-M3	M3	μπεζ, round, convex, 0,1-0,5 mm	$1,6 * 10^8$	
30-M4	M4	μπεζ, round, convex-unbonate, 0,5 mm	$14,57 * 10^8$	
32-M5	M5	μπεζ, round, convex, smooth, 0,1-1mm	$5,33 * 10^7$	
39-M6	1-7	άσπρη-μπεζ, round, convex-unbonate, smooth, 1mm	$25,3 * 10^8$	
	2-8	μπεζ, round, convex, smooth ,0,5mm	$201,33 * 10^6$	
34-AB	1-2	μπεζ, round, flat, smooth, 1-2mm	$7 * 10^8$	
	2-3	άσπρη, round, ελαφρώς unbonate, smooth, 1-2mm	$9,66 * 10^8$	
18-Δ1	Δ1 3	μπεζ, round, convex-unbonate, 0,1-1 mm	$8 * 10^8$	3
	Δ1 4	άσπρη, round, convex, smooth, 0,5-1mm	$1,56 * 10^7$	3
19-Δ2	Δ2 1-12	μπεζ, round, convex, 0,5mm	$2,55 * 10^9$	3
	Δ2 2-13	μπεζ-διάστικτη, scalloped, unbonate, 1mm	$1,25 * 10^7$	3
13-D1	D1	round, convex, μπεζ, 0,1-0,5mm	$5,76 * 10^8$	3
27-Δ3	Δ3	μπεζ, round, ελαφρώς unbonate, 0,1-1 mm	$23,11 * 10^8$	
28-Δ4	Δ4	μπεζ, round ,ελαφρώς unbonate, 0,5-1 mm	$23,59 * 10^8$	
29-Δ5	Δ5	μπεζ, round, convex, smooth, 0,1-1mm	$18,35 * 10^8$	
40-Δ6	1-9	μπεζ, round, smooth, convex, 0,5mm	$54,9 * 10^7$	
	2-10	χρυσίζων, round, flat, smooth, 1mm	$10,08 * 10^7$	
42-Δ7	Δ7	μπεζ, round, convex, smooth, 0,5mm	$21,66 * 10^8$	
12-B1	B1 5	χρυσίζουσα-μπεζ, round, convex, 0,1	$9 * 10^6$	3
	B1 4	μπεζ, umbonate, round, 0,5-1mm	$5,09 * 10^9$	3
17-B2	B2	μπεζ, round, convex-unbonate, 1 mm	$8,83 * 10^8$	3
8-Φ1	1-11	μεγάλη, μπεζ, round, flat, 1mm	$1,76 * 10^8$	3
	2-12	μικρή, μπεζ, round, flat, 0,5mm	$2,38 * 10^8$	
21-Φ2	Φ2	μπεζ-διάφανη, round, convex, smooth, 0,1-0,5mm	$263 * 10^7$	
22-Φ3	1-3	μπεζ-χρυσίζων, round, convex, smooth, 0,1mm	$37,81 * 10^6$	
	2-4	μπεζ-διάφανη, round, convex, smooth, 0,5mm	$63,32 * 10^6$	

23-Φ4	1-5	χρυσίζων, round, convex, smooth, 0,1mm	42,11 * 10 ⁶	
	2-6	μπεζ-διάφανη, round, convex, smooth, 0,5mm	60,3 * 10 ⁶	
24-Φ5	1	μπεζ-χρυσίζων, round, convex, smooth, 0,1mm	1258,18 * 10 ⁴	
	2	μπεζ-διάφανη, round, convex, smooth, 0,5mm	53,32 * 10 ⁴	
31-Φ6	Φ6	μπεζ, round, convex, d=0,1-1mm	33,9 * 10 ⁷	
35-Φ7	3-9	μπεζ-χρυσίζων, round, convex, smooth, 0,5mm	5,3 * 10 ⁵	
	2-8	άσπρη-μπεζ, round, convex, smooth, 1mm	7,4 * 10 ⁴	
	1-7	μπεζ, round, convex, smooth, 0,1mm	11 * 10 ⁵	
36-Φ8	Φ8	μπεζ, round, convex, smooth, 0,01mm	30,34 * 10 ⁸	3
38-Φ9	Φ9	μπεζ-χρυσίζων, round, convex, smooth, 0,5-1mm	106 * 10 ⁷	3
16-Ω1	Ω1	μπεζ, round, convex-unbonate ,1 mm	2,81 * 10 ⁸	3
14-ΤΣ1	ΤΣ1	round, convex, μπεζ, 0,1-1mm	4,5 * 10 ⁸	3
15-ΤΣ2	ΤΣ2	μπεζ-γυαλιστερή, convex, round, 0,5mm	6,06 * 10 ⁸	3
7-J1	J1 11	μεγάλη, μπεζ, round, convex, smooth	1,33 * 10 ⁸	3
25-κρι1	1 10	μπεζ, round, convex, 0,5 mm	8,54 * 10 ⁸	
	11	άσπρη-διάφανη, round, convex, smooth, 0,1-0,5mm	7,37 * 10 ⁸	
26-κρι2	14	μπεζ, round, convex, 0,5 mm	15,39 * 10 ⁸	
	15	άσπρη-διάφανη, round, convex, smooth, 0,1-0,5mm	11,87 * 10 ⁸	
33-ΔΜ	ΔΜ	μπεζ, round, convex, smooth, 1-2mm	8,76 * 10 ⁸	3
41-Δωδ1	Δωδ1	μπεζ με άσπρο κέντρο, round, ελαφρώς unbonate, smooth, 1,5mm	21,3 * 10 ⁸	3

Οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν λογαριθμήθηκαν με βάση το δεκαδικό λογάριθμο και συγκρίθηκαν με την πρότυπη συγκέντρωση 10⁷ CFU/g που πρέπει να έχουν οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, ώστε να πληρούν τις προϋποθέσεις που ορίζει η νομοθεσία. Στον πίνακα 6.3 γίνεται η σύγκριση των πληθυσμών με την πρότυπη συγκέντρωση και παρουσιάζεται το επίπεδο σημαντικότητας της σύγκρισης αυτής. Από τα 42 προϊόντα που αποτέλεσαν το δείγμα της μελέτης, τα 40 έχουν πληθυσμούς μεγαλύτερους ή ίσους από 10⁷ CFU/g, ενώ σε 2 προϊόντα οι πληθυσμοί των κόκκων είναι μικρότεροι από 10⁷ CFU/g.

Πίνακας 6. 3 Σύγκριση πληθυσμών στρεπτόκοκκων με την πρότυπη συγκέντρωση 10^7 CFU/g

A) προϊόντα με πληθυσμούς μεγαλύτερους ή ίσους με 10^7 CFU/g

Δείγμα	Mean	95,0% Lower Bound	T	P
1-NOY1	9,4266	9,1377	24,53	0,001
2-NOY2	9,243	8,913	19,89	0,001
3-NOY3	9,7904	9,6882	79,72	0,000
10-NOY4	8,9299	8,7598	33,15	0,000
11-NOY5	9,3831	9,2261	44,32	0,000
4-ΟΛ1	8,3570	8,1601	20,12	0,001
9-ΟΛ2	8,6728	8,4376	20,77	0,001
37-ΟΛ3	9,0026	8,9053	60,13	0,000
5-M2	8,5358	8,3644	26,17	0,001
6-M1	8,7379	8,6251	45,00	0,000
20-M3	8,1991	8,0523	23,85	0,001
30-M4	9,1558	8,9812	36,06	0,000
32-M5	7,7154	7,5091	10,13	0,005
34-AB	9,2151	9,0559	40,61	0,000
39-M6	8,6572	8,6168	119,67	0,000
18-Δ1	8,595	7,750	5,51	0,016
19-Δ2	9,5209	9,3484	42,68	0,000
13-D1	8,7580	8,6529	48,83	0,000
29-Δ5	9,2588	9,1236	48,77	0,000
28-Δ4	9,3645	9,1871	38,92	0,000
27-Δ3	9,3588	9,2241	51,13	0,000
40-Δ6	8,8124	8,7734	135,68	0,000
42-Δ7	9,3209	9,0920	29,60	0,001
12-B1	9,2254	9,0694	41,66	0,000
17-B2	8,9403	8,7958	39,20	0,000
8-Φ1	8,5992	8,3380	17,87	0,002
21-Φ2	9,4186	9,3484	100,63	0,000
22-Φ3	8,1076	7,8276	11,55	0,004

23-Φ4	8,0089	7,9344	39,54	0,000
31-Φ6	8,5291	8,4640	68,57	0,000
36-Φ8	9,4777	9,3485	56,00	0,000
38-Φ9	9,0239	8,9510	81,04	0,000
16-Ω1	8,421	8,077	12,08	0,003
14-ΤΣ1	8,6459	8,4774	28,53	0,001
15-ΤΣ2	8,7821	8,7260	92,72	0,000
7-J1	8,8955	8,8653	182,95	0,000
25-KPI1	9,1851	8,9402	26,05	0,001
26-KPI2	9,4383	9,2894	47,83	0,000
33-ΔΜ	8,823	8,096	7,33	0,009
41-ΔΩΔ1	9,3242	9,1916	51,19	0,000

B) προϊόντα με πληθυσμούς μικρότερους από 10^7 CFU/g

Δείγμα	Mean	95,0% Lower Bound	T	P
24-F5	6,6772	6,5742	-9,15	0,006
35-F7	6,2795	6,2054	-28,37	0,001

6. 2. 2. Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους *Lactobacillus*

Καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί των βακίλλων που αναπτύχθηκαν με αναερόβια επώαση των δειγμάτων σε θρεπτικό υλικό MRS και βγήκαν αρνητικοί στο τεστ καταλάσης και θετικοί στη χρώση Gram. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται ως βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες ανά γραμμάριο προϊόντος (CFU/g).

Στον πίνακα 6.4 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των βακίλλων που καταμετρήθηκαν σε κάθε προϊόν του δείγματος και γίνεται διάκριση των διαφορετικών τύπων αποικιών και περιγραφή των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Τα στοιχεία περιγραφής των μορφολογικών χαρακτηριστικών αναφέρονται στο σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος, το περίγραμμα και το σχήμα κάτοψης της αποικίας. Επίσης παρουσιάζεται ο μέσος όρος CFU/g που μετρήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις και στην τελευταία στήλη του πίνακα αναγράφεται ο αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν. Σε 3 προϊόντα δεν βρέθηκαν καθόλου βάκιλλοι.

Πίνακας 6.4 Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους *Lactobacillus*

Κωδικός	Ονομασία αποικίας	Περιγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών	Πληθυσμός (μ.ό)	Στελέχη που απομονώθηκαν
1-NOY1	NOY1	δεν βρεθήκαν βάκιλλοι	-	
2-NOY2	NOY2	δεν βρεθήκαν βάκιλλοι	-	
3-NOY3	NOY3	δεν βρεθήκαν βάκιλλοι	-	
10-NOY4	NOY4	round, convex, smooth, μπεζ, 0,5mm	$2,06 * 10^6$	
11-NOY5	NOY5 8	άσπρη, drop-like, round, 1mm	$1,41 * 10^7$	
	NOY5 7	χρυσίζων-μπεζ, scalloped margin, convex, 0,1mm	$6,6 * 10^5$	
4-ΟΛ1	ΟΛ1	scalloped-margin, χρυσίζων, 0,01mm, convex	$3,35 * 10^7$	3
9-ΟΛ2	ΟΛ2 2-6	λευκή-μπεζ, round, convex, 1mm	$5,08 * 10^6$	3
	1-5	διάστικτος χρυσίζων, convex, wavy, 1mm	$5,3 * 10^7$	3
	3-7	μπεζ (μικρή), round, ελαφρώς convex, 0,5mm	$2,5 * 10^8$	3
37-ΟΛ3	ΟΛ3	μπεζ με άσπρο κέντρο, scalloped, unbonate, 1mm	$27,08 * 10^7$	
5-M2	M2 2-10	scalloped-margin, flat, wavy, διάστικτη χρυσίζων	$3,54 * 10^7$	3
	1-9	λευκή, round, drop-like, smooth	$7,2 * 10^6$	3
6-M1	M1 2-12	scalloped-margin, flat, wavy, διάστικτη χρυσίζων	$3,36 * 10^7$	3
	1-13	λευκή, round, drop-like, smooth	$6,27 * 10^5$	3
20-M3	M3 1-3	μπεζ-άσπρο, unbonate, round, 0,5mm	$4,66 * 10^6$	3
	M3 2-4	άσπρη-γαλακτώδης, drop-like, round, 2mm	$4,2 * 10^7$	3
	M3 3-5	μπεζ-διάστικτη, scalloped margin, flat, 2mm	$5 * 10^5$	3
30-M4	M4	άσπρη-γαλακτώδης, convex, round, 2mm	$88,28 * 10^6$	
32-M5	M5 1-2	άσπρη-γαλακτώδης, convex, round, 1mm	$57 * 10^6$	
	2-3	χρυσίζων, scalloped margin, flat, 0,1mm	$8 * 10^5$	
		λευκή, scalloped margin, ελαφρώς unbonate, 1,5mm	$8,03 * 10^6$	
39-M6	M6			
34-AB	AB	άσπρη, round, convex, smooth, 2mm	$38,66 * 10^6$	
18-Δ1	Δ1	λευκή, scalloped margin, wavy, 1mm	$5,46 * 10^7$	
19-Δ2	Δ2 2-7	άσπρη-μπεζ ματ, round, convex, 0,5-1mm	$3,5 * 10^6$	
	Δ2 3-8	μπεζ-διάστικτη, scalloped, unbonate, 1,5mm	$3,3 * 10^5$	
13-D1	D1-6	άσπρη, round, drop-like, 0,5mm	$6,53 * 10^8$	
	D2-7	μπεζ, flat, scalloped, 0,01mm	$2 * 10^6$	
28-Δ4	Δ4	μπεζ με άσπρο κέντρο, scalloped, unbonate, 1mm	$12,38 * 10^5$	
27-Δ3	Δ3	άσπρη, scalloped margin, ελαφρώς convex, 1mm	$17,2 * 10^5$	
29-Δ5	Δ5	λευκή, scalloped margin, unbonate, 1mm	$38,41 * 10^6$	
		μπεζ με άσπρο κέντρο, scalloped, λίγο unbonate, 1mm	$8,4 * 10^6$	
40-Δ6	Δ6			
42-Δ7	Δ7 9	Μπεζ, scalloped, margin, flat, 1,5mm	$7,33 * 10^6$	
	10	άσπρη, round, convex, smooth, 0,5mm	$2 * 10^6$	
12-B1	B1 10	άσπρη, drop-like, round, 1-2mm	$1,31 * 10^8$	
	B1 11	χρυσίζων, convex, 0,1mm	$1,39 * 10^6$	
17-B2	B2 3-7	λευκή-χρυσίζων, scalloped, unbonate, 1mm	$6,3 * 10^7$	
	B2 1-5	Άσπρη, round, convex, 1mm	$1,26 * 10^8$	
8-Φ1	Φ1 2	διάστικτη χρυσίζων, scalloped, unbonate, 0,5mm	$2,36 * 10^5$	
	4	Μπεζ, flat, scalloped, 0,1mm	$6,6 * 10^5$	
		μπεζ-χρυσίζων, round, convex, smooth, μπεζ, 1mm	$6 * 10^7$	
21-Φ2	Φ2 1			

	2	round, convex, smooth, άσπρη, 1,mm	$1,66 * 10^7$	
	3	μπεζ-διαφανής,convex,round,0,1mm	$5,09 * 10^7$	
22-Φ3	Φ3	άσπρη με χρυσίζων περιφέρεια, scalloped margin, 2mm	$15,45 * 10^6$	
23-Φ4	Φ4	άσπρη με χρυσίζων περιφέρεια, scalloped margin, 2mm	$2,72 * 10^6$	
24-Φ5	Φ5	άσπρη με χρυσίζων περιφέρεια, scalloped margin, 2mm	$1,5 * 10^6$	
31-Φ6	Φ6	μπεζ-χρυσίζων, scalloped margin, unbonate, 1mm	$30,45 * 10^5$	
35-Φ7	Φ7	άσπρη, round, convex, smooth, 0,5mm	$4,5 * 10^5$	
36-Φ8	Φ8	άσπρη με μπεζ περιφέρεια, scalloped margin, 0,1mm	$6,89 * 10^4$	3
38-Φ9	Φ9 3	μπεζ, scalloped margin, ελαφρώς convex, 0,5mm	$9 * 10^5$	3
	Φ9 2	άσπρη, scalloped margin, flat, 0,5mm	$3 * 10^5$	3
16-Ω1	Ω1 8	λευκή, scalloped margin, unbonate, 1mm	$2,09 * 10^8$	3
	Ω1 9	μπεζ, round, convex, 0,001mm	$1,18 * 10^8$	3
14-ΤΣ1	ΤΣ1	λευκή, scalloped margin, unbonate, 0,5-1mm	$1,03 * 10^7$	3
15-ΤΣ2	ΤΣ2	μπεζ-λευκή, round, unbonate, 0,1-0,5mm	$4,03 * 10^7$	3
7-J1	J1	round, convex, smooth, άσπρο-μπεζ γυαλιστερό	$4,58 * 10^7$	3
25-κρι1	κρι1 5	άσπρη, wavy, unbonate, 0,5mm	$9,14 * 10^4$	
	6	μπεζ-διάφανη, scalloped margin, convex, 1mm	$18,87 * 10^4$	
	4	μπεζ, round, convex, smooth, 0,1-0,5mm	$32,74 * 10^4$	
26-κρι2	κρι2 8	άσπρη, wavy, unbonate, 0,5mm	$11,87 * 10^4$	
	9	μπεζ-διάφανη, scalloped margin, convex, 1mm	$30,13 * 10^4$	
33-ΔΜ	ΔΜ 6	μπεζ-λευκή, scalloped margin, unbonate, 1mm	$161,39 * 10^6$	3
	7	μπεζ, round, convex, smooth, 0,1mm	$3458,64 * 10^4$	
41-Δωδ1	Δωδ1	λευκή, scalloped margin, ελαφρώς unbonate, 1,5mm	$14 * 10^7$	3

Οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν λογαριθμήθηκαν με βάση το δεκαδικό λογάριθμο και συγκρίθηκαν με την πρότυπη συγκέντρωση 10^7 CFU/g. από τα 42 προϊόντα που μελετήθηκαν, 22 έχουν πληθυσμούς λακτοβακίλλων μεγαλύτερους ή ίσους με 10^7 CFU/g, 17 έχουν πληθυσμούς μικρότερους από 10^7 CFU/g, ενώ σε τρία γιαούρτια, στα NOY1, NOY2 και NOY3 δεν βρέθηκαν βάκιλλοι. Στον πίνακα 6.5 γίνεται η σύγκριση των πληθυσμών με την πρότυπη συγκέντρωση και παρουσιάζεται το επίπεδο σημαντικότητας της σύγκρισης αυτής.

Πίνακας 6.5 Σύγκριση πληθυσμών λακτοβακίλλων με την πρότυπη συγκέντρωση 10^7 CFU/g

A) προϊόντα με πληθυσμούς μεγαλύτερους ή ίσους με 10^7 CFU/g

Δείγμα	Mea n	95,0% Lower Bound	T	P
11-NOY5	7,1660	7,0006	2,93	0,050
4-ΟΛ1	7,5252	7,4837	37,00	0,000
9-ΟΛ2	8,4876	8,4359	83,90	0,000
5-M2	7,5741	7,4600	14,69	0,002
6-M1	7,5290	7,3786	10,27	0,005
20-M3	7,6578	7,5819	25,30	0,001
30-M4	7,9444	7,8729	38,57	0,000
32-M5	7,2955	7,2296	13,09	0,003
34-AB	7,5705	7,3123	6,45	0,012
18-Δ1	7,73766	7,72229	140,11	0,000
13-Δ1	8,8144	8,7224	57,58	0,000
29-Δ5	7,5862	7,4429	11,94	0,003
12-B1	7,665	7,313	5,51	0,016
17-B2	8,2732	8,1272	25,47	0,001
8-Φ1	7,7129	7,6358	26,99	0,001
21-Φ2	7,7387	7,6599	27,38	0,001
16-Ω1	8,5146	8,4788	123,73	0,000
14-ΤΣ1	7,0138	6,9735	1,00	0,211
15-ΤΣ2	7,6013	7,4741	13,81	0,003
7-J1	7,66117	7,64456	116,24	0,000
33-ΔΜ	8,2914	8,2359	67,94	0,000
41-ΔΩΔ1	8,1431	8,0377	31,67	0,000

B) προϊόντα με πληθυσμούς μικρότερους από 10^7 CFU/g

Δείγμα	Mea n	95,0% Lower Bound	T	P
10-NOY4	6,31516	6,29453	-96,96	0,000
37-ΟΛ3	6,4279	6,2944	-12,51	0,003
39-M6	6,9000	6,7654	-2,17	0,081
19-Δ2	6,5801	6,4641	-10,57	0,004
28-Δ4	5,273	4,472	-6,29	0,012
27-Δ3	6,209	5,882	-7,06	0,010
40-Δ6	6,343	5,681	-2,90	0,051
42-Δ7	6,9540	6,7155	-0,56	0,315

22-Φ3	6,481	4,722	-0,86	0,240
23-Φ4	6,391	6,002	-4,58	0,022
24-Φ5	6,157	5,861	-8,34	0,007
31-Φ6	6,4807	6,3741	-14,23	0,002
35-Φ7	5,519	4,883	-6,80	0,010
36-Φ8	4,8345	4,7129	-52,00	0,000
38-Φ9	6,0926	5,8210	-9,76	0,005
25-KPI1	5,7809	5,7128	-52,22	0,000
26-KPI2	5,7907	5,6397	-23,39	0,001

6. 2. 3. Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους *Bifidobacterium*

Καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί των μπιφιδοβακτηρίων που αναπτύχθηκαν με αναερόβια επώαση σε θρεπτικό υλικό mMRS και βγήκαν θετικοί στη χρώση Gram και αρνητικοί στο τεστ καταλάσης. Στον πίνακα 6.6 παρουσιάζονται τα δείγματα στα οποία εντοπίστηκαν τα μπιφιδοβακτήρια, οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν και εκφράζονται ως το μέσο όρο των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων ανά γραμμάριο προϊόντος (CFU/g) τριών επαναλήψεων, η περιγραφή των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και τα στελέχη που απομονώθηκαν.

Πίνακας 6.6 Καταμέτρηση πληθυσμών του γένους *Bifidobacterium*

Κωδικός	ονομασία αποικίας	περιγραφή	πληθυσμός (μ.ό)	στελέχη που απομονώθηκαν
17-B2	B2	άσπρη, drop-like, round, 1mm	5,33x 10 ⁷	3
39-M6	M6	χρυσίζων-άσπρη, round, convex, smooth, 0,5mm	53x10 ⁵	
38-Φ9	Φ9 1	άσπρη, round, convex, smooth, 0,5mm	115,9 x 10 ⁵	3

Οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν λογαριθμήθηκαν και συγκρίθηκαν με την πρότυπη συγκέντρωση 10⁶ CFU/g. Στον πίνακα 6.7 γίνεται η σύγκριση των πληθυσμών με την πρότυπη συγκέντρωση και παρατίθεται το επίπεδο σημαντικότητας της σύγκρισης αυτής. Και στα 3 δείγματα που εντοπίστηκαν μπιφιδοβακτήρια οι πληθυσμοί ήταν μεγαλύτεροι από 10⁶ CFU/g.

Πίνακας 6.7 Σύγκριση πληθυσμών μπιφιδοβακτηρίων με την πρότυπη συγκέντρωση 10⁶ CFU/g

Δείγμα	Mean	95,0% Lower Bound	T	P
17-B2	7,7195	7,5481	29,29	0,001
39-M6	6,72407	6,69643	76,48	0,000
38-Φ9	7,0621	6,9745	35,39	0,000

6. 3. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

6. 3. 1. Ταυτοποίηση στελεχών *Streptococcus*

Ταυτοποιήθηκαν 6 στελέχη κόκκων από νέα προϊόντα που κυκλοφόρησαν πρόσφατα στην αγορά και δεν είχαν μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες. Και τα 6 προϊόντα περιείχαν στελέχη που ανήκουν στα είδη *Streptococcus salivarius* και *Streptococcus thermophilus*, ενώ ένα από αυτά περιείχε και το στέλεχος *Streptococcus vestibularis*. Η ταυτοποίηση έγινε με το σύστημα API Rapid ID 32 STREP. Στον πίνακα 6.8 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης.

Πίνακας 6.8 ταυτοποίηση στελεχών στρεπτόκοκκων με το σύστημα API Rapid ID 32 STREP

Δείγμα - Στέλεχος	Ετικέτα προϊόντος	API Rapid id 32 STREP	identification	%id	T
NOY5- i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Streptococcus Salivarius</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i>	Doubtfull	99,9	0,47
ΤΣ1- i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Streptococcus Salivarius</i> – <i>Streptococcus thermophilus</i>	Doubtfull	99,9	0,47
Ω1- i	καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Streptococcus Salivarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus Vestibularis</i>	Unacceptable		
NOY4- i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Streptococcus Salivarius</i> – <i>Streptococcus thermophilus</i>	Doubtfull	99,9	0,47

B1- 4i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Streptococcus Salivarius - Streptococcus thermophilus</i>	Doubtfull	99,9	0,47
B2- i	Bifidobacterium Lactis Bb12	<i>Streptococcus Salivarius - Streptococcus thermophilus</i>	Doubtfull	99,9	0,47

6. 3. 2. Ταυτοποίηση στελεχών λακτοβακίλλων

Όπως και στους στρεπτόκοκκους, έτσι και εδώ ταυτοποιήθηκαν 6 στελέχη λακτοβάκιλλων από νέα προϊόντα που κυκλοφόρησαν πρόσφατα στην αγορά και δεν είχαν μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες. Από τα 6 προϊόντα, τα 4 περιείχαν στελέχη που ανήκουν στο είδος *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* και τα άλλα 2 ανήκουν στο είδος *Lactobacillus paracasei paracasei*. Η ταυτοποίηση έγινε με τη μέθοδο API CHL50. Στον πίνακα 6.9 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των λακτοβακίλλων.

Πίνακας 6.9 ταυτοποίηση των στελεχών λακτοβακίλλων με τη μέθοδο API CHL50

Δείγμα - Στέλεχος	Ετικέτα προϊόντος	API CHL50	identification	%id	T
NOY5- 8ii	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	Good identification	98,8	0,75
B1 -11i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	Good identification	98,8 0,75	0,75
ΤΣ1- i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	Very good identification	99,4	0,80
Ω1 -9i	καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	Good identification	98,8	0,95
NOY4- i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus para. paracasei 1</i>	Very good identification	99,7	0,79

B1 -10i	Προβιοτική καλλιέργεια, καλλιέργεια γιαούρτης	<i>Lactobacillus para. paracasei 1</i>	Very good identification	99,3	0,80
---------	--	--	-----------------------------	------	------

6. 4. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε μόνο στα προϊόντα του δείγματος που μελετήθηκαν για πρώτη φορά. Επιλέχθηκαν στελέχη από κάθε τύπο και εξετάστηκαν σε 12 αντιβιοτικά.

Έλεγχος ευαισθησίας στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά

Οι κόκκοι στο σύνολό τους ήταν ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά. Σε 10 από τα 12 αντιβιοτικά, και συγκεκριμένα στα ampicillin, vancomycin, bacitracin, tetracycline, erythromycin, streptomycin, gentamycin, rifampin, ofloxacin και nitrofurantoin, οι κόκκοι παρουσίασαν 100% ευαισθησία. Στα αντιβιοτικά ciprofloxacin και norfloxacin η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνισε ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε ποσοστό 55%. Οι περιπτώσεις ενδιάμεσης ανθεκτικότητας εμφανίστηκαν στα αντιβιοτικά που εμποδίζουν την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας των στρεπτόκοκκων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 6.10.

Έλεγχος ευαισθησίας λακτοβακίλλων στα αντιβιοτικά

Οι λακτοβάκιλλοι, όπως και οι κόκκοι, στο σύνολό τους ήταν ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά. Σε 7 από τα 12 αντιβιοτικά, και συγκεκριμένα στα ampicillin, amoxicillin 20μg / clavulanic acid 10μg, cephalothin, chloramphenicol, tetracycline, erythromycin και rifampin, οι λακτοβάκιλλοι ήταν 100% ευαίσθητοι. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας εμφανίστηκε στο αντιβιοτικό ciprofloxacin σε ποσοστό 100%. Μεγάλη ανθεκτικότητα εμφανίστηκε και στα αντιβιοτικά amicacin (ανθεκτικότητα 68,75%, ενδιάμεση ανθεκτικότητα 12,5%) και kanamycin (ανθεκτικότητα 75%, ενδιάμεση ανθεκτικότητα 18,75%), ενώ μικρότερη ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στα αντιβιοτικά vancomycin (ανθεκτικότητα 18,75%)

και bacitracin (ανθεκτικότητα 18,75%, ενδιάμεση ανθεκτικότητα 6,25%). Όλα τα αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων είχαν μεγάλο ποσοστό ευαισθησίας μεταξύ 75 και 100%. Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας των λακτοβακίλλων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.11.

Στον πίνακα 6.12 παρουσιάζονται τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε είδος μικροοργανισμού με την ανάλογη κωδική ονομασία τους.

Πίνακας 6.12

Αντιβιοτικά στρεπτόκοκκων	Κωδικοί	Αντιβιοτικά λακτοβακίλλων	Κωδικοί
Ampicillin 10μg	AM-10	Ampicillin 10μg	AM-10
Vancomycin 30μg	Va-30	Amoxicillin 20μg / Clavulanic acid 10μg	AmC-30
Bacitracin 10μg	B-10	Cephalothin 30μg	CF-30
Tetracycline 30μg	Te-30	Vancomycin 30μg	Va-30
Erythromycin 15μg	E-15	Bacitracin 10μg	B-10
Streptomycin 300μg	S-300	Amicacin 30μg	AN-30
Gentamycin 120μg	GM-120	Kanamycin 30μg	K-30
Ciprofloxacin 5μg	CIP-5	Chloramphenicol 30μg	C-30
Rifampicin 5μg	RA-5	Tetracycline 30μg	Te-30
Nitrofurantoin 300μg	OFX-5	Erythromycin 15μg	E-15
Norfloxacin 10μg	NOR-10	Ciprofloxacin 5μg	CIP-5
Ofloxacin 5μg	FIM-300	Rifampicin 5μg	RA-5

Πίνακας 6.10 Έλεγχος ευαισθησίας στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά

	AM-10	Va-30	B-10	Te-30	E-15	S-300	GM-120	CIP-5	RA-5	OFX-5	NOR-10	FIM-300
B1 4i	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
B2i	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
NOY4	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
TΣ1 i	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NOY5 1i	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
TΣ2 i	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Ω1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Φ8i	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Δωδ.1i	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
Φ91i	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
ΔMi	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
Sensitive %	100	100	100	100	100	100	100	45,5	100	100	45,5	100
Intermediate %								54,5			54,5	
Resistant %												

Πίνακας 6.11 Έλεγχος ευαισθησίας λακτοβακίλλων στα αντιβιοτικά

	AM-10	AmC-30	CF-30	Va-30	B-10	AN-30	K-30	C-30	Te-30	E-15	CIP-5	RA-5
NOY5 8ii	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
B1 10i	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
Ω1 9 i	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
B2i	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
NOY4	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
TΣ2 (M)	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
B1 11i	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
NOY5 7ii	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
Ω1 8i	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
TΣ1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΔM 7i	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
Φ9 3i	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
ΔM 6i	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Φ9 2i	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S
Φ8i	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S
Δωδ.1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
Sensitive %	100	100	100	81,25	75	18,75	6,25	100	100	100		100
Intermediate %					6,25	12,5	18,75					
Resistant %				18,75	18,75	68,75	75				100	

Κεφάλαιο 7^ο

Συζήτηση

7. 1. Καταμέτρηση πληθυσμών

Η σύγκριση των πληθυσμών στρεπτόκοκκων και λακτοβάκιλλων με την πρότυπη συγκέντρωση 10^7 CFU/g που ορίζεται από την πρόταση της ΕΕ, έχει νόημα μόνο στα προϊόντα του δείγματος που χαρακτηρίζονται ως γιαούρτι (40 από τα 42 προϊόντα του δείγματος). Για τα υπόλοιπα προϊόντα πήξης του γάλατος δεν υπάρχουν καθορισμένες προδιαγραφές. Για τους πληθυσμούς των μπιφιδοβακτηρίων η σύγκριση γίνεται με την πρότυπη συγκέντρωση 10^6 CFU/g. Η σύγκριση αυτή έχει σημασία μόνο για τα προϊόντα στα οποία αναγράφεται η ύπαρξη μπιφιδοβακτηρίων, υπονοώντας την ευεργετικές επιδράσεις αυτών στην υγεία.

Όσον αφορά τους στρεπτόκοκκους, η πλειοψηφία των γιαουρτιών (95%) έχει πληθυσμούς μεγαλύτερους από 10^7 CFU/g, ενώ σε ένα γιαούρτι, το 24-Φ5, βρέθηκαν πληθυσμοί μικρότεροι από την πρότυπη συγκέντρωση.

Στους λακτοβάκιλλους το ποσοστό των προϊόντων που βρέθηκαν να έχουν πληθυσμούς μικρότερους από 10^7 CFU/g είναι μεγαλύτερο. Από τα 40 γιαούρτια του δείγματος, τα 18 είχαν πληθυσμούς βακίλλων μικρότερους από 10^7 CFU/g, δηλ. το 45%. Τα προϊόντα αυτά ήταν τα: 10-NOY4, 37-ΟΛ3, 19-Δ2, 28-Δ4, 27-Δ3, 40-Δ6, 42-Δ7, 22-Φ3, 23-Φ4, 24-Φ5, 31-Φ6, 36-Φ8, 38-Φ9, 25-Κρι1, 26-Κρι2, 1-NOY1, 2-NOY2 και 3-NOY3.

Το γιαούρτι 24-Φ5 βρέθηκε να έχει πληθυσμούς μικρότερους από την πρότυπη συγκέντρωση ταυτόχρονα για τους στρεπτόκοκκους και τους λακτοβάκιλλους, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα που εμφανίστηκαν μικρότεροι πληθυσμοί, αφορούσαν έναν μόνο από τους δύο μικροοργανισμούς, είτε τους στρεπτόκοκκους, είτε στους λακτοβάκιλλους. Επειδή η προσθήκη των μικροοργανισμών για την παρασκευή του γιαουρτιού γίνεται σε αναλογία 1:1, στα γιαούρτια που εμφανίστηκε μικρή συγκέντρωση πληθυσμών για κάποιο είδος μικροοργανισμού, αυτή πιθανώς να οφείλεται στην μειωμένη βιωσιμότητα του είδους αυτού και όχι στην προσθήκη ανεπαρκούς ποσότητας κατά την παραγωγή του γιαουρτιού (κάτι που μπορεί να ισχύει για τα γιαούρτια που εμφάνισαν μικρούς πληθυσμούς ταυτόχρονα για τους στρεπτόκοκκους και τους λακτοβάκιλλους).

Σε 3 γιαούρτια, τα 1-NOY1, 2-NOY2 και 3-NOY3, δεν εντοπίστηκαν καθόλου λακτοβάκιλλοι και σύμφωνα με τις υπάρχουσες προδιαγραφές τα προϊόντα αυτά, τα οποία δεν περιέχουν έναν από τους δύο χαρακτηριστικούς οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς, δεν μπορούν να φέρουν την ονομασία γιαούρτι.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης του συγκεκριμένου δείγματος συμπεραίνουμε ότι η παρουσία των χαρακτηριστικών μικροοργανισμών στα προϊόντα γιαούρτης της ελληνικής αγοράς είναι πολύ ικανοποιητική όσον αφορά τους στρεπτόκοκκους και ικανοποιητική όσον αφορά τους λακτοβάκιλλους. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα παλαιότερης μελέτης από τους Κουλούρης και συν. (1998) που έγινε σε 39 είδη γιαουρτιών της ελληνικής αγοράς.

Στη μελέτη των Temmerman και συν. (2002), που έγινε σε 55 προϊόντα της ευρωπαϊκής αγοράς, από τα οποία 30 ήταν συμπληρώματα τροφής (κάψουλες λυοφιλωμένων προβιοτικών) και 25 ήταν ζυμωμένα προϊόντα γάλατος, βρέθηκε ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιείχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ζωντανών βακτηρίων από ότι τα συμπληρώματα. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν τον καλύτερο φορέα εισόδου στο ανθρώπινο σώμα των ευεργετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, παρέχοντάς τα ζωντανά και λειτουργικά.

7. 2. Ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν

Από την ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν βρέθηκε ότι τα κυρίως χρησιμοποιούμενα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Streptococcus salivarius* και *Streptococcus thermophilus*, τα οποία εντοπίστηκαν στα 6 προϊόντα που εξετάστηκαν. Το πιο συχνά εμφανιζόμενο είδος λακτοβακίλλων είναι το *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Στα NOY4i και B1-10i βρέθηκε το στέλεχος *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

Μπιφιδοβακτήρια βρέθηκαν σε τρία προϊόντα, στα γιαούρτια B2 και Φ9 και στο ξινόγαλο M6, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την πρότυπη συγκέντρωση 10^6 CFU/g. Στα προϊόντα αυτά η ύπαρξη των μπιφιδοβακτηρίων αναγραφόταν στην ετικέτα. Στο γιαούρτι Φ8, αν και αναφερόταν η ύπαρξη τους στην ετικέτα, δεν εντοπίστηκαν μπιφιδοβακτήρια κατά την εξέταση. Η συντήρηση του πληθυσμού των μπιφιδοβακτηρίων σε βιώσιμη μορφή, μέχρι την ημερομηνία λήξης του προϊόντος, φαίνεται ότι αποτελεί ένα ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα.

7. 3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Έλεγχος ευαισθησίας στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά

Ως προς την ευαισθησία στα αντιβιοτικά εξετάστηκαν στελέχη στρεπτόκοκκων από τα δείγματα B1 4i, B2i, NOY4, TΣ1 i, NOY5 1i, TΣ2 i, Ω1, Φ8i, Δωδ.1,i Φ91i, και ΔMi. Σε γενικές γραμμές οι στρεπτόκοκκοι ήταν ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά, κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, ενώ κάποια από αυτά παρουσίασαν ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Ciprofloxacin και Norfloxacin, δηλαδή σε αντιβιοτικά που ανήκουν στους παρεμποδιστές της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών. Οι Katla και συν., (2001), οι οποίοι μελέτησαν την ευαισθησία στα αντιβιοτικά στελεχών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων στη Νορβηγία, βρήκαν ότι κανένα από τα στελέχη λακτόκοκκων και στρεπτόκοκκων που εξετάστηκαν δεν ήταν ανθεκτικό στα αντιβιοτικά ampicillin, tetracycline, bacitracin και erythromycin, ενώ τα περισσότερα ήταν ευαίσθητα στα gentamycin και streptomycin. Στο ciprofloxacin τα γένη των κόκκων βρέθηκαν ευαίσθητα με μια μικρή διακύμανση της ευαισθησίας, όπως και στη μελέτη μας.

Έλεγχος ευαισθησίας λακτοβάκιλλων στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας των λακτοβακίλλων έδειξε ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Στα αντιβιοτικά vancomycin, bacitracin, kanamycin και amicasin εμφανίστηκε ποικίλη ανθεκτικότητα, ενώ στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin βρέθηκαν ανθεκτικά όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν. Βλέπουμε ότι ανθεκτικότητα εμφανίστηκε σε όλες τις ομάδες αντιβιοτικών, ωστόσο, στα αντιβιοτικά που ανήκουν στους παρεμποδιστές της σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων (vancomycin, bacitracin) παρουσιάστηκε το υψηλότερο ποσοστό ευαισθησίας, (81,25 και 75% αντίστοιχα).

Για το αντιβιοτικό vancomycin οι Charteris και συν. (1998) αναφέρουν ότι τα στελέχη του *Lb. bulgaricus* παρουσιάζουν ποικίλη ανθεκτικότητα, ενώ όλα τα άλλα είδη είναι ανθεκτικά. Επιπλέον, οι Hamilton-Miller και Shah (1998) βρήκαν ευαίσθητα όλα τα στελέχη των *Lb. delbrueckii* και *Lb. acidophilus* και ανθεκτικά τα στελέχη των *Lb. casei* και *Lb. rhamnosus*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα

αποτελέσματα της μελέτης μας, που δείχνουν την ποικίλη ανθεκτικότητα που εμφανίζεται στο vancomycin.

Για το αντιβιοτικό bacitracin, οι Charteris και συν. (1998) αναφέρουν ότι όλα τα στελέχη των λακτοβακίλλων ήταν ευαίσθητα, πράγμα που δεν συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας. Αντίθετα, οι Danielsen και Wind (2003) αναφέρουν ότι εμφανίστηκε ανθεκτικότητα σε κάποια στελέχη των *Lb. acidophilus* και *L. paracasei rhamnosus*, πράγμα που συμφωνεί με την ποικίλη ανθεκτικότητα που βρήκαμε στα αποτελέσματά μας για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Από την ομάδα των παρεμποδιστών της σύνθεσης πρωτεϊνών παρουσιάστηκε μειωμένη ευαισθησία στις δύο αμινογλυκοσίδες amicacin και kanamycin. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα των Danielsen και Wind (2003) ως προς το αντιβιοτικό kanamycin. Οι Katla και συν. (2001) αναφέρουν επίσης μια μειωμένη ευαισθησία των λακτοβακίλλων στα αντιβιοτικά amicacin και kanamycin, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Στα άλλα δύο αντιβιοτικά της ομάδας των παρεμποδιστών της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων, την τετρακυκλίνη την χλωραμφαινικόλη και την ερυθρομυκίνη, όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν ευαίσθητα, πράγμα που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Charteris και συν. (1998), Katla και συν. (2001) και Danielsen και Wind (2003).

Στα αντιβιοτικά που ανήκουν στην ομάδα των παρεμποδιστών της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων, ciprofloxacin και rifampicin, τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν βρέθηκαν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ciprofloxacin. Το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Katla και συν. (2001), αλλά διαφέρει από αυτά των Hamilton και Shah (1998), Danielsen και Wind (2003) και Charteris και συν. (1998) οι οποίοι αναφέρουν μια ποικιλία ως προς την ανθεκτικότητα. Ωστόσο, οι Charteris και συν. (1998) αναφέρουν ότι όλα τα στελέχη του *Lb. bulgaricus* που απομονώθηκαν από ελληνικά γιαούρτια βρέθηκαν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ciprofloxacin. Αντιθέτως, όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν βρέθηκαν ευαίσθητα στην ριφαμικίνη, γεγονός που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Charteris και συν. (1998) και Danielsen και Wind (2003).

Βιβλιογραφία

- Adhikari K., Mustapha A., Grun I.U., and Fernando L. Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage. 2000 J Dairy Sci 83 :1946–1951
- Ana Alonso, Patricia SaÂnchez and JoseÂ L. MartõÂnez. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology (2001) 3(1), 1-9
- Ana Belén Flórez, Susana Delgado, and Baltasar Mayo. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Can. J. Microbiol. 51: 51–58 (2005)
- Anuradha S, Rajeshwari K. Probiotics in Health and Disease. JIACM 2005; 6(1): 67-72
- Belma Aslim, Yavuz Beyatli. Antibiotic Resistance and Plasmid DNA Contents of Streptococcus thermophilus Strains Isolated from Turkish Yogurts. Turk J Vet Anim Sci 28 (2004) 257-263
- Burgos J. M., Ellington B. A., and Varela M. F. Presence of Multidrug - Resistant Enteric Bacteria in Dairy Farm Topsoil. J. Dairy Sci. 88:1391–1398, 2005
- Burton J. P. and Tannock G. W. Properties of Porcine and Yogurt Lactobacilli in Relation to Lactose Intolerance. 1997 J Dairy Sci 80:2318–2324
- Carl A Batt. *Lactococcus*. Department of Food Science, Cornell University, USA, 1999
- Carlo Zambonelli, Cristiana Chiavari, Marzia Benevelli and Fabio Coloretto. Effects of Lactic Acid Bacteria Autolysis on Sensorial Characteristics of Fermented Foods. Food Technol. Biotechnol. 40 (4) 347–351 (2002)
- Charlotte A. West and Philip J. Warner. Plasmid Profiles and Transfer of Plasmid - Encoded Antibiotic Resistance in Lactobacillus plantarum. Applied and Environmental Microbiology, Nov. 1985, p. 1319-1321
- Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L. and Collins J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Bifidobacterium isolates from the human gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology 1998, 26, 333-337.
- Claire L. Vernazza, Bodun A. Rabiou and Glenn R. Gibson. Human Colonic Microbiology and the Role of Dietary Intervention: Introduction to Prebiotics. rebiotics: Development and Application
- Clifford McDonald, Matthew J. Kuehnert, Fred C. Tenover, and William R. Jarvis. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 3, July–September 1997

- Cornelius W. Van Niel, MD; Chris Feudtner, MD, PhD, MPH; Michelle M. Garrison, MPH; and Dimitri A. Christakis, MD, MPH. Pediatrics. *Lactobacillus* Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-analysis. Vol. 109 No. 4 April 2002
- David M. Collins and Glenn R. Gibson. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999;69(suppl):1052S–7
- Dave R. I. and Shah N. P. Evaluation of *thermophilus*, *Lactobacillus* Media for Selective Enumeration of *Streptococcus Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *acidophilus*, and Bifidobacteria. 1996 *J Dairy Sci* 79:1524-1536
- Dirk Gevers. Tetracycline Resistant in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dry Sausages. Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor (Ph.D.) in Sciences, Biochemistry, 2002
- Dubravka Samaržija, Neven Antunac, Jasmina Luka Havranek. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo* 51 (1) 35-48, 2001
- Dureja H., Kaushik D., Kumar V. Developments in Nutraceuticals. *Indian Journal of Pharmacology* 2003; 35: 363-372
- Elliott J.A. and Facklam R.R. Antimicrobial Susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a Proposed Method To Discriminate between Them. *Journal of clinical microbiology*, May 1996, p. 1296–1298, Vol. 34, No.5
- Ekta k. Kalra. Nutraceutical – Definition and introduction. *AAPS PharmSci* 2003; 5 (3) Article 25
- Erja Malinen. Molecular methods for detection of probiotics and intestinal microbiota, and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct. Section of Microbiology and Epidemiology Department of Basic Veterinary Sciences Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, 2002
- Erika Isolauri. Probiotics in human disease1–3. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl): 1142S–6S
- Facklam R., Elliott J., Pigott N., and Franklin A. R. Identification of *Streptococcus porcinus* from Human Sources. *Journal of clinical microbiology*, Feb. 1995, p. 385–388, Vol. 33, No. 2
- Hamilton – Miller J.M.T. and S. Shah. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of *Lactobacilli*. *Letters in Applied Microbiology* 1998, 26, 153-154

- Hassan N. A., Frank J. F., Schmid K. A., and Shalabi S. I. Textural Properties of Yogurt Made with Encapsulated Nonropy Lactic Cultures. 1996 J Dairy Sci 79:209-2103
- Huys G., K. D'Haene and J. Swings. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. Letters in Applied Microbiology 2002, 34, 402–406
- Ghelfi F., Verdenelli M.C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. Dept. Comparative Morphology and Biochemistry, University of Camerino, Italy
- Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C., and Ross R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food, a review. Journal of Applied Microbiology 2005, 98, 1316–1325
- Ian Phillips, Mark Casewell, Tony Cox, Brad De Groot, Christian Friis, Ron Jones, Charles Nightingale, Rodney Preston and John Waddell. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 53, 28–52
- Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Shea Beasley. Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki Finland, 2004
- Jagoda Suskovic, Blazenka Kos, Jadranka Goreta and Sreko Matosic. Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect. Food technol. biotechnol. 39 (3) 227–235 (2001)
- Johannes Arnikunnas. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Department of Basic Veterinary Sciences Division of Microbiology and Epidemiology University of Helsinki, 2006
- Jehanno D., Thuault D., and Bourgeois C. M. Development of a Method for Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Exclusively the L-(+) Isomer of Lactic Acid. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1992, p. 4064-4067, Vol. 58, No. 12
- John H. Cummings and San Choon Kong. Probiotics, prebiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease. 2004 Inflammatory bowel disease, p 99-114
- John Nordal and Erik Slinde. Characteristics of Some Lactic Acid Bacteria Used as Starter Cultures in Dry Sausage Production. Applied and Environmental Microbiology, Sept. 1980, p. 472-475

- Jouko Sillanpää. Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria: Identification and Characterization of the Collagen- Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*. Department of Biosciences, Division of General Microbiology, University of Helsinki, 2001
- Karag -Yuceer Y., Wilson, J. C. and White C. H. Formulations and Processing of Yogurt Affect the Microbial Quality of Carbonated Yogurt. J. Dairy Sci. 84:543–550, 2001
- Καλατζόπουλος Γ. Μαθήματα εφαρμοσμένης μικροβιολογίας γάλατος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα 1987.
- Καλαντζόπουλος Γ. Η Ιστορία του Ελληνικού Γάλακτος και των Προϊόντων του, 1ο Τριήμερο Εργασίας Ξάνθη, 7-9 Οκτωβρίου 2005.
- Κεχαγιάς Χ. Ευνοϊκές επιδράσεις στην υγεία από τη χρησιμοποίηση μικροοργανισμών στα ζυμούμενα γάλατα και διαμόρφωση νέου πλαισίου για την περιγραφή τους. Πρακτικά 3^{ου} Πανελληνίου Συμπόσιου Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα 2004.
- Κουλούρης Σ., Τύμης Δ., Κεχαγιάς Χ. και Σαμωνάς Α. Ζωτικότητα χαρακτηριστικών μικροοργανισμών γιαούρτης σε εμπορικά προϊόντα. Πρακτικά Πέμπτου Συνεδρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα 1998
- Kneifel W., Maria Kaufmann, Angela Fleischer, and Ulberth F. Screening of Biochemical, Commercially Available Mesophilic Dairy Starter Cultures: Sensory, and Microbiological Properties. 1992 J Dairy Sci 75:315&3166
- Knut J Heller. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms1–3. Am J Clin Nutr 2001;73(suppl):374S–9S.
- Kurland C. G., Canback B., and Otto G. Berg. Horizontal gene transfer: A critical view. PNAS vol. 100 no. 17, p.9658–9662, 2003
- Langford F. M., Wear D. M. y, and Fisher. J. L. Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. Dairy Sci. 86:3963–3966, 2003
- Lee W. J. and Lucey J. A. Structure and Physical Properties of Yogurt Gels: Effect of Inoculation Rate and Incubation Temperature. J. Dairy Sci. 87:3153–3164, 2004
- Lilia Tserovska, Stanka Stefanova and Tanya Yordanova. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated From Katyk, Goat's and. Journal Of Culture Collections, Volume 3, 2000-2002, pp. 48-52

- Linda J. Harris, Henry P. Fleming, and Todd R. Klaenhamme'. Novel Paired Starter Culture System for Sauerkraut, Consisting of a Nisin-Resistant *Leuconostoc mesenteroides* Strain and a Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, May 1992, p. 1484-1489, Vol. 58, No. 5
- Lodics T. A. and Steensonz L. R. Phage-Host Interactions in Commercial Mixed-Strain Dairy Starter Cultures: Practical Significance-A Review. 1993 *J Daury Sci* 76:238&2391
- Lukasova J., Sustackova A. Review Article Enterococci and Antibiotic Resistance. *ACTA VET. BRNO* 2003, 72: 315–323
- Luc De Vuyst.
Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food technol. biotechnol.* 38 (2) 105–112 (2000)
- Luc De Vuyst, Vincent Schrijvers, Spiros Paramithiotis, Bart Hoste, Marc Vancanneyt, Jean Swings, George Kalantzopoulos, Effie Tsakalidou, and Winy Messens. The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 2002, p. 6059–6069, Vol. 68, No. 12
- Maeve Trotter, Olivia E. McAuliffe, Gerald F. Fitzgerald, Colin Hill, R. Paul Ross and Aidan Coffey. Variable Bacteriocin Production in the Commercial Starter *Lactococcus lactis* DPC4275 Is Linked to the Formation of the Cointegrate Plasmid pMRC02. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2004, p. 34–42, Vol. 70, No. 1
- Marcela Zubillaga, Ph.D., Ricardo Weill, Eng., Eric Postaire, Ph.D., Cinthia Goldman, Bioch., Ricardo Caro, Ph.D., Jose' Boccio, Bioch. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research* 21 (2001) 569–579
- Mark Casewell, Christian Friis, Enric Marco, Paul McMullin and Ian Phillips. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 159–161
- Manolopoulou E., Sarantivopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., et al. Evolution of microbial populations during traditional feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiology* 82(2003): 153-161
- Μάντης Αντώνης. Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλατος και των προϊόντων του. Εκδόσεις Κυριακίδη (2^η έκδοση) Θεσσαλονίκη 1993, 1339.
- Miloud Hadadji and Ahmed Bensolt. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (6), pp. 505-509, 15 March 2006

- Morsi El Soda, N. Ahmed, N. Omran, G. Osman and A. Morsi. Emir. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. J. Agric. Sci. 2003. 15 (2): 51-71
- Moubareck C., Gavini F., Vaugien L., Butel M. J. and Doucet-Populaire F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2005) 55, 38–44
- Mudgal P., F. Breidt, Jr., Lubkin S. R., and Sandeep K. P. Quantifying the Significance of Phage Attack on Starter Cultures: a Mechanistic Model for Population Dynamics of Phage and Their Hosts Isolated from Fermenting Sauerkraut. Applied and environmental microbiology, June 2006, p. 3908–3915
- Nicolette Klijn, Anton H. Weerkamp, and Willem M. De Vos. Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction-Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. Applied and Environmental Microbiology, Nov. 1991, p. 3390-3393, Vol. 57, No. 11
- Nicolette Klijn, Anton H. Weerkamp, and Willem M. De Vos. Detection and Characterization of Lactose-Utilizing *Lactococcus* spp. in Natural Ecosystems. Applied and Environmental Microbiology, Feb. 1995, p. 788–792, Vol. 61, No. 2
- Nigatu A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. Journal of Applied Microbiology 2000, 89, 969-978
- Nokuthula F. Kunene, Ifigenia Geornaras, Alexander Von Holy and John W. Hastings. Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria from a Sorghum-Based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, Mar. 2000, p. 1084–1092, Vol. 66, No. 3
- Oskar Adolfsson, Simin Nikbin Meydani, and Robert M Russell. Yogurt and gut function. Am J Clin Nutr 2004;80:245–56.
- Ozlem Erdourul, Feryal Erbulur. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Turk J Biol . 30 (2006) 39-44
- Parvathy Seema Nair and Puthuvallil Kumaran Surendran. Biochemical Characterization Of Lactic Acid BacteriaA Isolated From Fish and Prawn. Journal of Coulture Collection Volume 4, 2004-2005, pp. 48-52

- Paulo K. Orberg and William E. Sandine. Survey of Antimicrobial Resistance in Lactic Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1985, p. 538-542, Vol. 49, No. 3
- Perdigon G., Vintini E., Alvarez S., Medina M., and Medici M. Study of the Possible Mechanisms Involved in the Mucosal Immune System Activation by Lactic Acid Bacteria. 1999 *J Dairy Sci* 82:1108–1114
- Peter Kaufmann, Anita Pfefferkorn, Michael Teuber and Leo Meile. Identification and Quantification of *Bifidobacterium* Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1997, p. 1268–1273, Vol. 63, No. 4
- Reeta M. Satokari, Elaine E. Vaughan, Antoon D. L. Akkermans, Maria Saarela, and Willem M. De Vos. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb. 2001, p. 504–513, Vol. 67, No. 2
- Richard van Kranenburg, Michiel Kleerebezem, Johan van Hylckama Vlieg, Bjorn M. Ursing, Jos Boekhorst, Bart A. Smit, Eman H.E. Ayad, Gerrit Smit, Roland J. Siezen. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12 (2002) 111–121
- Rosa del Campo, Daniel Bravo, Rafael Canto'n, Patricia Ruiz-Garbajosa, Raimundo Garcí'a-Albiach, Alejandra Montesi-Libois, Francisco-Javier Yuste, Victor Abaira, and Fernando Baquero. Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers. *Applied and environmental microbiology*, Jan. 2005, p. 547–549
- Ronel Visser, Wilhalm H. Holzapfel, Joahannes J. Bezuidenhout, and Johannes M. Kotze. Antagonism of Lactic Acid Bacteria against Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 1986, p. 552-555, Vol. 52. No. 3
- Ruegg P. L. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. *J. Dairy Sci.* 86:(E. Suppl.):E1–E9, 2003
- Sophie Drouault, Gérard Corthier. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.* 32 (2001) 101–117, © INRA, EDP Sciences, 2001
- Shea Beasley. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki Finland, 2004

- Simin Nikbin Meydani and Woel-Kyu Ha. Immunologic effects of yogurt 1–4. *Am J Clin Nutr* 2000;71:861–72
- Sinton L. W. , Donnison A. M. and Hastie C. M. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part I: Taxonomy and enumeration. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1993: Vol. 27: 101-115
- Soomro, A.H., T. Masud and Kiran Anwaar. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24, 2002
- Tamine A. Y. Microbiology of starter cultures. In. *Dairy Microbiology Handbook*, Third Ed., 2002, Wiley-Interscience Inc. Canada.
- Tejada-Simon M. V., Lee J. H., Ustunol Z., and Pestka J. J. Ingestion of Yogurt Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to Potentiate Immunoglobulin A Responses to Cholera Toxin in Mice. 1999 *J Dairy Sci* 82:649–660
- Tharmaraj N. and N. P. Shah. J. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Dairy Sci.* 86:2288–2296, 2003
- Todd Klaenhammer, Eric Altermann, Fabrizio Arigoni, Alexander Bolotin, Fred Breidt, Jeffrey Broadbent, Raul Cano, Stephane Chaillou, Josef Deutscher, Mike Gasson, Maarten van de Guchte, Jean Guzzo, Axel Hartke, Trevor Hawkins, Pascal Hols, Robert Hutkins, Michiel Kleerebezem, Jan Kok, Oscar Kuipers, Mark Lubbers, Emmanuelle Maguin, Larry McKay, David Mills, Arjen Nauta, Ross Overbeek, Herman Pel, David Pridmore, Milton Saier, Douwe van Sinderen, Alexei Sorokin, James Steele, Daniel O’Sullivan, Willem de Vos, Bart Weimer, Monique Zagorec & Roland Siezen. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 29–58, 2002
- Valérie Coeuret, Ségolène Dubernet, Marion Bernardeau, Micheline Gueguen, Jean Paul Vernoux. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products, Review article. *Lait* 83 (2003) 269–306
- Venter C.S. Prebiotics for the Improvement of Human Health. *Human Ecology Special Issue No. 14*: 1-6 (2006)
- Vinderola C. G., Mocchiutti P., and Reinheimer J. A. Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 85:721–729, 2002

- Viola Strompfova and Andrea Laukova. Antibiotic Resistance Of Lactic Acid Bacteria From Canine Faeces. Bull Vet Inst Pulawy 48, 215-218, 2004
- Virginia Ocaña, Clara Silva, and María Elena Nader-Macías. Antibiotic Susceptibility Of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli.
- Wen-Hsin Lin, Chin-Fa Hwang, Li-Wei Chen, Hau-Yang Tsen. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food Microbiology 23 (2006) 74–81
- Wasseela Verachia. Application of *Pediococcus* spp. as adjunct cultures in gouda cheese. Departement of Food Science Faculty and Agricultural Sciences, University of Pretoria 2005
- Włodzimierz Grajek, Anna Olejnik and Anna Sip. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta Biochimica Polonica Vol. 52 No. 3/2005, 665–671
- Yazid A.M., Ali A.M., Shuhaimi M., Kalaivaani V., Rokiah M.Y and Reezal A. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. Letters in Applied Microbiology 2000, 31, 57-62
- Yamaki M., Berruga M. I., Althaus R. L., Molina M. P., and Molina A. Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega Ewe Dairy Farms. J. Dairy Sci. 87:3132–3137, 2004
- Yeung P. S. M., Sanders M. E., Kitts C. L., Cano R., and Tong P. S. Species-Specific Identification of Commercial Probiotic Strains. J. Dairy Sci. 85:1039–1051, 2002
- Υπουργείο οικονομικών – Γενικό Χημείο του Κράτους (1998). Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. Εθνικό Τυπογραφείο, άρθρο 81, 556 - 558

