



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ
ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ**

Δημήτριος Β. Βάσσος
Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2009

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νόμιμη κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

*Η διδακτορική αυτή διατριβή αφιερώνεται
στη μνήμη της Βασιλικής Μάϊπα*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Επιδημιολογίας και Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπ/μίου Ιωαννίνων.

Το αντικείμενο της έρευνας μου ανέθεσε η Επικ. Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής κ. Βασιλική Μάϊπα, σε συνεργασία με την κ. Ευγ. Μπεζιρτζόγλου, τότε επίκουρη καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θράκης και τον κ. Ιωάννη Αλαμάνο, τότε επίκουρο καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων και τώρα καθηγητή Παν/μίου Πατρών.

Ευχαριστώ θερμά και εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου προς την υπεύθυνη καθηγήτριά μου κ. Βασιλική Μάϊπα για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία και οργάνωση της διατριβής μου, την ακούραστη παρακολούθησή της, τις υποδείξεις της κατά την διάρκεια του πειραματικού, την πρόθυμη και υπομονετική καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της μελέτης και την αμέριστη συμπαράστασή της.

Θερμές ευχαριστίες στον καθηγητή Άγγελο Ευαγγέλου οποίος μετά την απώλεια της κ. Βασιλικής Μάϊπας ανέλαβε ως υπεύθυνος καθηγητής μου την περαιτέρω πορεία και ολοκλήρωση της παρουσίασης της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κ. Ευγενία Μπεζιρτζόγλου και τον καθηγητή κ. Ιωάννη Αλαμάνο για την βοήθειά τους, την πολύτιμη εμπειρία που αποκόμισα από την συνεργασία τους και την ουσιαστική συμβολή τους στην εκπόνηση και συγγραφή αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Δ/ντη του εργαστηρίου Επιδημιολογίας και Στατιστικής κ. Ιωάννη Ιωαννίδη για την άριστη επ' ωφελεία μου οργάνωση του εργαστηρίου και την παροχή κάθε υλικοτεχνικής και ηθικής βοήθειας.

Ευχαριστίες εκφράζω προς τους υπευθύνους του εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Σχολής Δημόσιας Υγείας Αθηνών και του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ευγενή προσφορά απαραίτητων υλικών (πρότυπες καλλιέργειες) για την εκπόνηση της μελέτης.

Ευχαριστώ τέλος της συνάδελφο και Δρ. Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Χρ. Βόϊδαρου για την αμέριστη βοήθειά της.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο πρωτόγονος άνθρωπος αρκετά νωρίς στην ιστορία της ανθρωπότητας γνώριζε ότι το άβραστο αλλά και βρασμένο γάλα (μη παστεριωμένο και παστεριωμένο) όταν παρέμενε εκτεθειμένο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ξίνιζε (οξίνιση γάλακτος) μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Από 8.000 χρόνια π.Χ. ο άνθρωπος χρησιμοποίησε χωρίς να γνωρίζει την αιτία, εμπειρικές καλλιέργειες βακτηρίων με μη προσδιορισμένη μικροχλωρίδα και μη προσδιορισμένη δράση για να παρασκευάσει και να διατηρήσει γαλακτοκομικά προϊόντα (1,2,3,4). Για παράδειγμα γνώριζε ότι η παρασκευή όξινου τυρογάλακτος και γιαούρτης, ήταν δυνατόν να επιτευχθεί μετά από εμβολιασμό γάλακτος με ξινόγαλα ή γιαούρτη της προηγούμενης ημέρας αντίστοιχα, δε γνώριζε όμως ότι αυτή η δράση ήταν αποτέλεσμα εμπλουτισμού της με βακτήρια.

Περί τα τέλη του 19^{ου} αιώνα η δημοσίευση των αποτελεσμάτων έρευνας του Γάλλου βιοχημικού Pasteur που αποδείκνυε ότι οι ζυμώσεις είναι αποτέλεσμα δράσης βακτηρίων έφερε πραγματική επανάσταση.

Έκτοτε άρχισε μια προσπάθεια απομόνωσης και μελέτης διαφόρων μικροοργανισμών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, (όπως το τυρί, ξινόγαλα και γιαούρτι) αλλά και άλλων τροφίμων όπως τα ζυμούμενα λαχανικά.

Σήμερα έχει συγκεντρωθεί σημαντική γνώση για τους μικροοργανισμούς που προκαλούν τις ζυμώσεις των τροφίμων, τις μεταβολές που επιφέρουν στα συστατικά τους, τα προϊόντα του μεταβολισμού τους και τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Από τα βακτήρια, τα οξυγαλακτικά (Lactic Acid Bacteria - LAB) είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρύτερα στην τεχνολογία παρασκευής ζυμούμενων τροφίμων και κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα LAB που απαντώνται σε διάφορα οικοσυστήματα αποτελούν μια ευρύτατη ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών από άποψη μορφολογίας και φυσιολογίας, που χαρακτηρίζονται για την ικανότητά τους να παράγουν σημαντικές ποσότητες γαλακτικού οξέος κατά τη ζύμωση της λακτόζης (5, 10, 11).

Συγχρόνως με την ραγδαία εξέλιξη στον τομέα της συμβολής των LAB στην τεχνολογία των ζυμούμενων τροφίμων, μια άλλη αναφορά είδε το φως της δημοσιότητας. Το 1908 ο Metchnikoff διαπίστωσε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απαντώνται στα γαλακτοκομικά

προϊόντα έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό και συγκεκριμένα συμβάλλουν στην παράταση του χρόνου ζωής του.

Εκτός του Metchnikoff και άλλοι ερευνητές πριν 100 και πλέον χρόνια από σήμερα, είχαν ήδη αρχίσει να μιλούν γενικά και αόριστα για ευεργετικές ιδιότητες των LAB επί του ανθρώπινου οργανισμού (13, 14, 15, 16, 17).

Κατά το δεύτερο ήμισυ του 20^{ου} αιώνα πάμπολλες έρευνες σχετικές με την δράση των LAB έγιναν και εξακολουθούν να γίνονται και η γνώση σε θέματα όχι μόνον τεχνολογίας αλλά και αντιβακτηριακής παρέμβασης των LAB (προβιοτική δράση) έχει αυξηθεί σημαντικά.

Η δράση αυτή των LAB επικεντρώνεται σε δύο επίπεδα:

α) σε εκείνο της βιοσυντήρησης των τροφίμων με την καταστολή των πληθυσμών των ανεπιθύμητων βακτηρίων που αναπτύσσονται σε αυτά, όπως π.χ. στελέχη της *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. Coli*, *Cl. botulinum* και (11, 18, 19, 20, 21, 22)

β) σε εκείνο της ευεργετικής επίδρασης σε πολλά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού και κυρίως στην εντερική μικροχλωρίδα (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

Η επιτυχής χειραγώγηση των προβιοτικών LAB επ' οφελεία των βιοχημικών εφαρμογών τα τελευταία χρόνια είναι συνεχής (27,28,30) και νέα γνώση διαρκώς συσσωρεύεται.

Είναι όμως γεγονός ότι παρά την πληθώρα των ανακοινώσεων και των ήδη τεχνολογικών εφαρμογών το θέμα της βακτηριακής δράσης των LAB και της αξιοποίησής της προς όφελος του ανθρώπου, έχει ακόμη τεράστιο πεδίο έρευνας.

Πάμπολλοι ερευνητές είναι θερμοί θιασώτες της διερεύνησης της συμβουλής και της εφαρμογής της προβιοτικής δράσης των LAB (23, 24, 25, 26, 27) στη φυσιοπαθολογία του ανθρώπινου οργανισμού και δεν είναι λίγοι όμως και εκείνοι που διατηρούν τις επιφυλάξεις τους ως προς τη δυνατότητα αξιοποίησης των LAB – προβιοτικών υπό μορφή θεραπευτικών σκευασμάτων (28, 31, 32, 33).

Κλινικές δοκιμές θα πρέπει να οργανώνονται και να δομούνται ως double-blind και placebo-controlled(34). Τόσο τα αποδεδειγμένα LAB-προβιοτικά στελέχη, όσο και τα προτεινόμενα τρόφιμα, θα πρέπει να μελετώνται ώστε να εξάγονται αξιόπιστα αποτελέσματα. Μόνο αυτές οι μελέτες μπορούν να εφοδιάζουν την διεθνή βιβλιογραφία με αξιόπιστα δεδομένα (28, 30).

Πρέπει επίσης να ληφθεί εξαιρετικά σοβαρά υπόψη το γεγονός ότι σε διάφορα οικοσυστήματα υπάρχουν «άγρια» στελέχη LAB, τα οποία δεν έχουν υποστεί τις διαφοροποιήσεις των βιομηχανικών καλλιεργειών βακτηρίων που ευρέως χρησιμοποιούνται (33, 35, 36, 37, 38).

Η αναζήτηση παρόμοιων στελεχών από διάφορα οικοσυστήματα με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των περιβαλλοντικών συνθηκών και φυσικά και του βακτηριακού ανταγωνισμού και η μελέτη των τεχνολογικών και προβιοτικών ιδιοτήτων τους αποτελούν ενδιαφέρον πεδίο έρευνας με ευρύτατους ορίζοντες

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	ΠΕΡΙ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (LAB)	1
1.1.1.	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ LAB	1
1.1.1.1.	Μεταβολισμός των LAB.....	4
1.1.1.2.	Βιοχημικές δραστηριότητες των LAB.....	7
1.1.1.3.	Μεταβολίτες των LAB.....	8
1.1.1.3.α.	Οργανικά οξέα.....	9
1.1.1.3.β.	Διοξειδίο του άνθρακα.....	10
1.1.1.3.γ.	Υπεροξειδίο του υδρογόνου & ελεύθερες ρίζες.....	10
1.1.1.3.δ.	Διακετύλιο.....	11
1.1.1.3.ε.	Ακεταλδεΐδη.....	12
1.1.1.3.στ.	Αντιμικροβιακές ουσίες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής φύσης.....	12
1.1.1.3.ζ.	Βακτηρισίνες.....	13
1.1.2.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ LAB	24
1.1.2.1.	Γένος <i>Lactobacillus sp.</i>	24
1.1.2.2.	Γένος <i>Streptococcus sp.</i>	28
1.1.2.3.	Γένος <i>Enterococcus sp.</i>	29
1.1.2.4.	Γένος <i>Lactococcus sp.</i>	30
1.1.2.5.	Γένος <i>Pediococcus sp.</i>	31
1.1.2.6.	Γένος <i>Leuconostoc sp.</i>	32
1.1.2.7.	Άλλα γένη LAB.....	33
1.1.2.8.	Άλλα βακτήρια από γαλακτοκομικά προϊόντα.....	34
1.1.3.	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ & ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ	37
1.1.3.1.	Γενικά περί προβιοτικών – Ορισμός.....	37
1.1.3.2.	Κριτήρια επιλογής LAB με προβιοτική δράση.....	39
1.1.3.3.	Επιδράσεις των LAB – προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	43
1.2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	55

2.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
2.1.	ΥΛΙΚΑ.....	59
2.1.1.	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LAB.....	59
2.1.2.	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	61
2.1.3.	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	62
2.1.4.	ΛΟΙΠΑ ΥΛΙΚΑ.....	63
2.1.5.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΣΤΕΛΕΧΗ ΔΕΙΚΤΕΣ)	64
2.1.5. 1.	Στελέχη αναφοράς (referens) των LAB	64
2.1.5. 2.	Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	65
2.1.6.	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΓΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	65
2.2.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	66
2.2.1.	ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ.....	66
2.2.2.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	66
2.2.2. 1.	Τεχνική χειρισμού & ομογενοποίησης δειγμάτων.....	66
2.2.2. 2.	Τεχνική διαδοχικών αραιώσεων.....	68
2.2.3.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	70
2.2.3. 1.	Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους <i>Lactobacillus sp.</i>	70
2.2.3. 2.	Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους <i>Enterococcus sp</i>	71
2.2.3. 3.	Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους <i>Lactococcus sp</i>	73
2.2.3. 4.	Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους <i>Leuconostoc sp.</i> και <i>Pediococcus sp.</i>	73
2.2.3. 5.	Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους <i>Bifidobacterium sp</i>	76
2.2.4.	ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LAB.....	77
2.2.4. 1.	Προσδιορισμός παραγωγής οξέος και πρόκλησης ζύμωσης.....	77
2.2.4. 2.	Προσδιορισμός ικανότητας αποδομής αμινοξέος τρυπτοφάνη, παραγωγής H ₂ S και κινητικότητας.....	78
2.2.4. 3.	Έλεγχος επιβίωσης σε χαμηλές τιμές pH.....	78
2.2.4. 4.	Έλεγχος ανθεκτικότητας στα χολικά άλατα.....	79
2.2.4. 5.	Έλεγχος ανάπτυξης παρουσία φαινόλης.....	79
2.2.4. 6.	Έλεγχος ανθεκτικότητας σε πρωτεολυτικά ένζυμα.....	79
2.2.4. 7.	Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	80
2.2.5.	ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ LAB.....	82
2.2.6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (Βιοχημικές δοκιμασίες).....	84

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
3.1	ΠΙΝΑΚΕΣ.....	88
3.2	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	181
3.2.1.	ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΥΤΟΧΘΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	181
3.2.2.	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	183
3.2.2.1.	Ανθεκτικότητα σε διάφορες τιμές pH.....	183
3.2.2.2.	Ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα.....	183
3.2.2.3.	Ανθεκτικότητα στη φαινόλη.....	184
3.2.2.4.	Ανθεκτικότητα στα πρωτεολυτικά ένζυμα.....	184
3.2.2.5.	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	184
3.2.3.	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	186
3.2.4.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	194
3.2.4.1.	Ανάλυση διασποράς.....	194
3.2.4.2.	Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson.....	196
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	203
4.1.	ΓΕΝΙΚΑ.....	203
4.2.	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	204
4.3.	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	196
4.3.1.	Ανθεκτικότητα σε τιμές pH.....	205
4.3.2.	Ανθεκτικότητα σε τιμές στα χολικά άλατα.....	206
4.3.3.	Ανθεκτικότητα σε τιμές στη φαινόλη.....	206
4.3.4.	Ανθεκτικότητα σε τιμές στη λυσοζύμη.....	207
4.3.5.	Ανθεκτικότητα σε τιμές στα αντιβιοτικά.....	207
4.4.	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	210
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	213
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	215
7.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	217
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Σύστημα Vancouver)	219

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΠΕΡΙ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (LACTIC ACID BACTERIA – LAB)

1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ LAB

Πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει κοινά αναγνωρισμένος από όλους τους ερευνητές ορισμός των LAB στη βιβλιογραφία των γαλακτοκομικών προϊόντων (4).

Οι οξύγαλακτικοί μικροοργανισμοί έχουν πάρει το όνομα τους από το κύριο προϊόν της ζυμώσεως της λακτόζης που είναι το γαλακτικό οξύ, με μια από τις τρεις στερεοχημικές μορφές του ήτοι: D(-), L(+) και DL(ρακεμική). Το σχήμα τους λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους ποικίλλει από σφαιρικό έως ραβδόμορφο με όλες τις ενδιάμεσες καταστάσεις. Οι διατάξεις των κυττάρων επίσης ποικίλλουν ανάλογα με το γένος, από μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη κυττάρων, τετράδες σε δύο επίπεδα, και τέλος αλύσεις βραχείες ή επιμήκεις.

Τα LAB προκαλούν την πήξη του γάλακτος λόγω του παραγόμενου γαλακτικού οξέος.

Παρουσιάζουν μικρή πρωτεολυτική και λιπολυτική δραστηριότητα. Είναι Gram(+) βακτήρια, μη σπορογόνα, ακίνητα, στερούμενα βλεφαρίδων, εκτός από μεμονωμένες περιπτώσεις στρεπτόκοκκων, αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης. Οι αποικίες τους είναι γαλακτόχρες λόγω της απουσίας κυτοχρωμάτων από τα κύτταρα.

Συνθέτουν ATP μέσω των ζυμώσεων των υδατανθράκων και όχι μέσω της αναπνευστικής οδού, λόγω της αδυναμίας τους να συνθέτουν κυτόχρωμα και άλλα συστατικά με συστατικό την αίμη και έτσι δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και να αποδεσμεύσουν μέσω οξειδώσεως το σύνολο της ενέργειας που εγκλείει το μόριο των υδατανθράκων (2, 4, 5, 39).

Αναπτύσσονται καλύτερα σε γάλα καλής ποιότητας και αναστέλλεται η ανάπτυξη τους από τα απορρυπαντικά και απολυμαντικά. Είναι προαιρετικά αναερόβια με περιορισμένες ικανότητες βιοσύνθεσης και με μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις σε αμινοξέα, βιταμίνες, πουρίνες και πυριδίνες και μερικά συγκεκριμένα πεπτίδια για την ανάπτυξη τους (4, 5, 40, 41, 42, 43).

Ο σκοπός της χρησιμοποίησης των LAB στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντικός γιατί (1, 5, 44, 45, 46):

- Παράγουν γαλακτικό οξύ με ή χωρίς αέριο, ως αποτέλεσμα της ζύμωσης της λακτόζης. Μεγαλύτερο ποσοστό παράγουν τα θερμοφιλά ομοζυμωτικά βακτήρια (πχ., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*). Η πτώση του pH κάτω από 5,2 συντελεί στο να αποσυνδέονται τα σύμπλοκα του ασβεστίου από τις φωσφορορεσίνες του γάλακτος, να αποδιοργανώνονται τα μικκύλια του λίπους, ενώ παράλληλα να αναδιοργανώνονται τα υπομικκύλια που αποτελούν τη βάση του καζεϊνικού πλέγματος που οδηγεί τελικά στο πήγμα (47).
- Προωθούν την ζύμωση στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα ελέγχοντας τη σύνθεση της μικροχλωρίδας τους και μη επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και την επικράτηση των ανεπιθύμητων βακτηρίων που βρίσκονται στο γάλα (47).
- Ευνοούν την πήξη του γάλακτος και την παραγωγή του βουτύρου (1,2,3,6).
- Αυξάνουν το χρόνο διατήρησης των γαλακτοκομικών προϊόντων επειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών λόγω: α) του όξινου και δυσμενούς περιβάλλοντος που δημιουργούν β) των μεταβολιτών με αντιβακτηριακή δράση που παράγουν και γ) του κυτταρικού ανταγωνισμού που παρουσιάζουν (9, 39).
- Ευνοούν την πρωτεόλυση επιδεικνύοντας μικρή ενδοπεπτιδασική δραστηριότητα αλλά μεγάλη αμινοπεπτιδασική δραστηριότητα με σημαντική παραγωγή αμινοξέων(5, 48, 49).
- Ευνοούν τη λιπόλυση (5, 46).
- Βελτιώνουν το άρωμα των ζυμώσιμων προϊόντων, ιδιαίτερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια *L. diacetylactis* ή αυτά του γένους *Leuconostoc sp.*(46).
- Ορισμένα βακτήρια αυξάνουν τη θρεπτική αξία των ζυμώσιμων προϊόντων γιατί συνθέτουν βιταμίνες κυρίως του συμπλέγματος Β. Πχ το *Propionibacterium shermanii* συνθέτει τη βιταμίνη Β₁₂, ο *L acidophilus* συνθέτει τις βιταμίνες Β₁₂, νιασίνη και ασκορβικό οξύ και τα στελέχη *Leuconostoc sp.* συνθέτουν τις βιταμίνες Β₁₂ και ριβοφλαβίνη(5).
- Δημιουργούν χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και βοηθούν έτσι να διατηρούνται σε ανηγμένη μορφή οι θειούχες ενώσεις που αποτελούν σημαντικά συστατικά του αρώματος των τυριών(46).

- Επιταχύνουν την ωρίμανση των ζυμώσιμων προϊόντων μέσω διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που ελευθερώνουν(46).
- Αποδομούν πικρά πεπτίδια, συντελλώντας στην ευγευστικότητα των προϊόντων (46).
- Ορισμένα στελέχη σχηματίζουν πολυσακχαρίτες και αυξάνουν το ιξώδες ορισμένων όξινων προϊόντων π.χ. *S. lactis* var. *taette*, *Leuconostoc dextranicus*(50, 51).
- Αρκετά από αυτά βελτιώνουν την μικροχλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου, επιδρώντας συγχρόνως και σε άλλα συστήματα του οργανισμού, χαρακτηριζόμενα ως προβιοτικά π.χ. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Bif. bifidus*(52, 53, 54, 55, 56).
- Παράγουν βακτηριοσίνες (5, 7, 8, 57, 58, 59, 60).
- Ορισμένα στελέχη αυξάνουν την υγιεινότητα των προϊόντων στα οποία περιέχονται και χαρακτηρίζονται ως προστατευτικά (protective cultures) (5, 11, 18,).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πέραν της βιομηχανίας γάλακτος στην οποία σήμερα χρησιμοποιούνται ευρύτατα, βρίσκουν εφαρμογή και στην παραγωγή

- ζυμωμένων αλλαντικών (60),
- ζυμωμένων φυτικών προϊόντων (50, 51, 61, 62, 63, 64, 65),
- κρασιών (66),
- αρτοσκευασμάτων (67),
- ζωοτροφών (68,69),
- στις υδατοκαλλιέργειες ως εναλλακτικός τρόπος θεραπείας των νοσημάτων των αλιευμάτων, με στόχο τη μείωση των αντιβιοτικών (70,71 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80).

1.1.1.1. Μεταβολισμός των LAB

Τα LAB, από πλευράς μεταβολισμού, διαιρούνται σε δύο ομάδες:

I . Τα ομοζυμωτικά (homofermenters), τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά προς γαλακτικό οξύ και

II. Τα ετεροζυμωτικά (heterofermenters) τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και CO₂.

Τα δύο βασικά σχήματα μεταβολισμού φαίνονται στους πίνακες 1, 2.

Τα ομοζυμωτικά γαλακτοβακτήρια συνθέτουν το ένζυμο φρουκτοζο-διφωσφορο-αλδολάση (όπως οι ζύμες και οι ιστοί του ανθρώπου) με την παρέμβαση του οποίου διασπών τη διφωσφορυλιωμένη φρουκτόζη προς δύο τριόζες κατά την ακόλουθη γενική αντίδραση:

αλδολάση

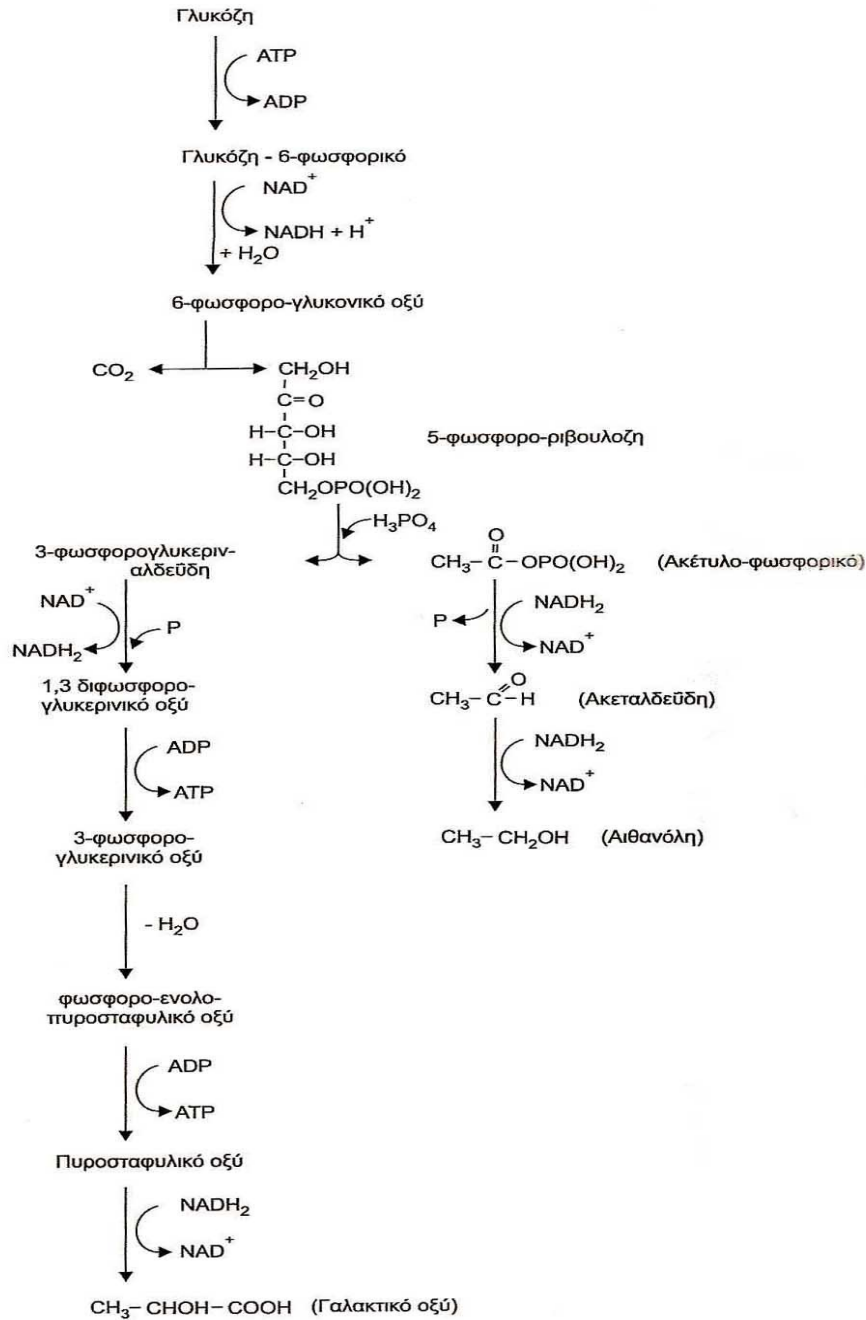
Φρουκτόζη-1,6-διφωσφορικό \longrightarrow 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΐδη+1-φωσφοροδιοξυ-ακετόνη.

Στη συνέχεια η 3-φωσφοτο-γλυκεριναλδεΐδη με τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης ((NADH₂) αρχικά ζυμώνεται προς πυροσταφυλικό οξύ και τέλος ανάγεται σε γαλακτικό οξύ το οποίο είναι και το μοναδικό τελικό προϊόν αυτής της διάσπασης κατά Embdaen-Mayerhof (5, 45, 81).

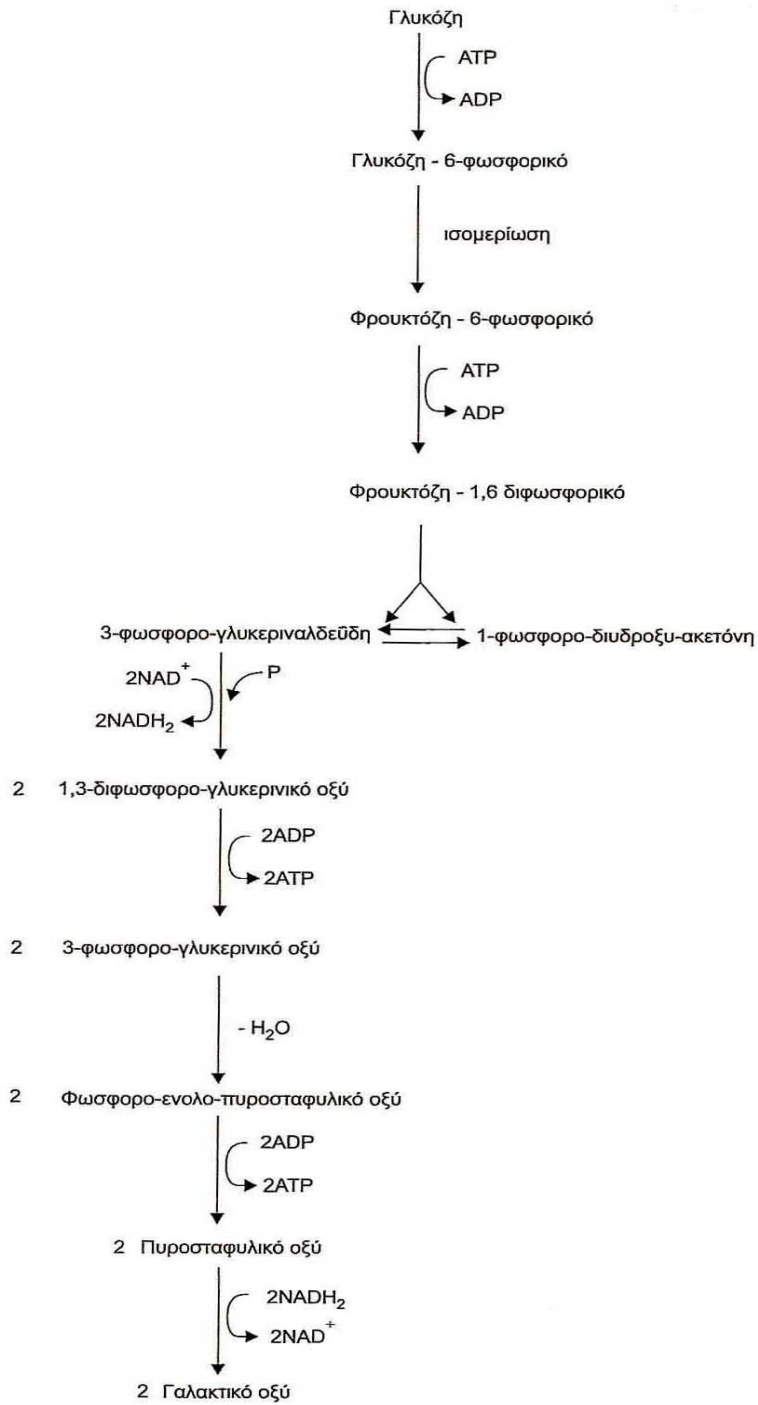
Αντίθετα τα ετεροζυμωτικά γαλακτοβακτήρια δεν συνθέτουν φρουκτο-διφωσφορική αλδολάση και δεν διασπών την εξόζη προς δύο τριόζες. Έτσι με οξειδωση σχηματίζουν σε πρώτο στάδιο γλυκονικό οξύ και στη συνέχεια διασπών το μόριο προς διοξείδιο του άνθρακος και 5-φωσφορο-ριβουλόζη. Η τελευταία διασπάται προς ένα μόριο τριόζης (3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΐδη) κι ένα μόριο ακετυλοφωσφορικού οξέος. Το ακετυλοφωσφορικό οξύ μετατρέπεται προς αιθανόλη με δύο επάλληλες αναγωγές, που αντισταθμίζουν τις δύο προηγούμενες οξειδώσεις μετατροπής της εξόζης προς πεντόζη και διοξείδιο του άνθρακος. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην ακολουθία αυτήν των αντιδράσεων το ακετυλοφωσφορικό οξύ μετέχει στο σχηματισμό της αιθανόλης χωρίς να αυξάνει τα ενεργειακά αποθέματα του μικροοργανισμού. Έτσι στην ετερογαλακτική ζύμωση ένα μόριο εξόζης μετατρέπεται προς ισομοριακό μείγμα γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξείδιο του άνθρακος τα οποία είναι και τα τελικά προϊόντα αυτής της ζύμωσης. Η μετατροπή της τριόζης προς γαλακτικό οξύ

πραγματοποιείται μέσω της ίδιας διαδικασίας, όπως στην περίπτωση της ομογαλακτικής ζυμώσεως. Τέλος, από πλευράς ισοζυγίου ενεργείας, η ομογαλακτική ζύμωση εξασφαλίζει στον μικροοργανισμό δύο φωσφορικούς δεσμούς υψηλής ενεργείας κατά μόριο εξόζης, ενώ η ετερογαλακτική ζύμωση μόνο ένα (5, 45, 81, 82).

Πίνακας 1: Ομοζυμωτική κατά Embdaen-Mayerhot διάσπαση της γλυκόζης (5,81)



Πίνακας 2: Ετεροζυμωτική διάσπαση της γλυκόζης (5, 81)



1.1.1.2. Βιοχημικές δραστηριότητες των LAB

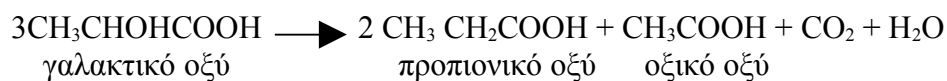
Οι κυριότερες βιοχημικές δραστηριότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι οι παρακάτω(5, 42, 83):

- **Ζύμωση της λακτόζης ή γαλακτική ζύμωση.** Το θέμα αναπτύχθηκε στο σημείο 1.1.1.1.
- **Ζύμωση κιτρικών αλάτων:** Τα κιτρικά άλατα υπάρχουν σε μικρή ποσότητα στο γάλα και ο μεταβολισμός του συμβάλλει στο σχηματισμό αρώματος των γαλακτοκομικών προϊόντων. Μερικά LAB (*Leuconostoc sp.* και *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*) μεταβολίζουν το κιτρικό οξύ κυρίως σε διακετύλιο και CO₂(1, 5, 84).
- **Πρωτεόλυση :** Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ασθενώς πρωτεολυτικά και διαθέτουν ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα που αποτελείται από πρωτεΐνάσες του κυτταρικού τοιχώματος και πολλές πεπτιδάσες του κυτταροπλάσματος. Επιδεικνύουν μικρή ενδοπεπτιδασική δραστηριότητα με ασήμαντη παραγωγή πεπτιδίων αλλά μεγάλη αμινοπεπτιδιακή δραστηριότητα με σημαντική παραγωγή αμινοξέων. Τα θερμοφιλα στελέχη του γένους *Lactobacillus sp.* προκαλούν εντονότερη πρωτεόλυση απ' τα μεσόφιλα του γένους *Lactococcus sp.* και τα θερμοφιλα του γένους *Streptococcus sp.* (207) Το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να αποτελείται από (5, 48, 49) :
 1. Σύστημα πρωτεΐνασών ή ενδοπεπτιδασών που υδρολύουν την καζεΐνη (κύρια πρωτεΐνη στο τυρί και στο γάλα) και τους εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια.
 2. Σύστημα εξωπεπτιδασών που υδρολύουν τα πεπτίδια, σε μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι αμινοπεπτιδάσες, καρβοξυπεπτιδάσες, δι- ή τρι-πεπτιδυλικές-πεπτιδάσες.
 3. Σύστημα μεταφοράς αμινοξέων και πεπτιδίων στο κύτταρο των οξυγαλακτικών βακτηρίων.
 4. Ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες μέσα στο κυτταρόπλασμα που υδρολύουν τα μικρά πεπτίδια σε αμινοξέα.
 - 5.

- **Καταβολισμός λιπών (λιπόλυση) και εστέρων:** Η λιπολυτική δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι περιορισμένη, γιατί αφ' ενός το λιπολυτικό τους

σύστημα είναι ασθενές, αφ' ετέρου γιατί έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τα μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια, (83,84) ενώ όπως είναι γνωστό το λίπος του γάλακτος αποτελούν σχεδόν αποκλειστικά τα τριγλυκερίδια (46). Ενδοκυτταρική λιπολυτική δραστηριότητα επιδεικνύουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και αυτά των γενών *Micrococcus sp.* και *Probionibacterium sp.*, ενώ οι μύκητες και τα ψυχοτρόπα βακτήρια παράγουν εξωκυτταρικές λιπάσες. Τα είδη του γένους *Streptococcus sp.* είναι περισσότερο λιπολυτικά συγκριτικά με τα είδη του γένους *Lactobacillus sp.*

- **Προπιονική ζύμωση:** Τα βακτήρια του γένους *Propionibacterium sp.* έχουν την ικανότητα να παράγουν προπιονικό οξύ χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα (γλυκόζη, πυροσταφυλικό) και κυρίως γαλακτικό οξύ. Η ζύμωση αυτή προεξέχει σε ορισμένους τύπους ελβετικών τυριών. Στα τυριά αυτά μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ που παράγεται από άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια προς προπιονικό οξύ, οξικό οξύ, CO₂ και H₂O κατά το σχήμα (5, 42, 81, 83, 84) :



1.1.1.3. Μεταβολίτες (αντιβακτηριακές ουσίες) που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια

Οι ουσίες αυτές είναι οι παρακάτω (5, 11, 18, 85):

- α) Οργανικά οξέα
- β) Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)
- γ) Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και οι ελεύθερες ρίζες
- δ) Διακετύλιο
- ε) Ακεταλδεΐδη
- στ) Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής
- ζ) Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες.

Οι μεταβολίτες αυτοί παρέχουν ασφάλεια και σταθερότητα στα ζυμωμένα τρόφιμα, και η οξυγαλακτική ζύμωση ως μια διεργασία συντήρησης βασίζεται μερικά σ' αυτούς τους μεταβολίτες, οι οποίοι συναθροίζονται σε παρεμποδιστικά επίπεδα έναντι παθογόνων

βακτηρίων στα διάφορα τρόφιμα και ποτά. Η αντιμικροβιακή δράση όλων των παραπάνω παραγόντων είναι συνήθως συνεργετική (11, 18).

Μερικοί από τους παραπάνω μεταβολίτες των οξυγαλακτικών μικροοργανισμών έχουν ήδη γίνει αποδεκτοί για χρήση στα τρόφιμα ως συντηρητικά τροφίμων. Παραδείγματα αποτελούν το γαλακτικό οξύ, το διακετύλιο, το προπιονικό οξύ και το οξικό οξύ (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Επίσης, η βακτηριοσίνη "νισίνη" από το στέλεχος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, έχει εγκριθεί σε πολλές χώρες, ως ένα αντιμικροβιακό βιολογικό συντηρητικό για χρήση σε πολλά τρόφιμα, κυρίως γαλακτοκομικά(86, 87, 88, 89). Παρακάτω παρατίθενται στοιχεία για τους μεταβολίτες αυτούς:

α. Οργανικά οξέα

Το γαλακτικό, κατά κύριο λόγο αλλά και το οξικό και το προπιονικό οξύ, που είναι τα κύρια παραγόμενα οργανικά οξέα από τα γαλακτικά βακτήρια, αποτελούν έναν από τους πιο βασικούς και αποτελεσματικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες σε όξινα τρόφιμα(11, 47, 83, 90).

Τα οργανικά οξέα παρεμποδίζουν την βακτηριακή ανάπτυξη με δύο τρόπους (9, 11, 39, 90, 91):

- 1) με την μείωση της τιμής του pH
- 2) με την παρουσία της αδιάστατης μορφής τους.

Στην πρώτη περίπτωση, η αύξηση της οξύτητας δημιουργεί αντίξοες συνθήκες ανάπτυξης για τα περισσότερα βακτήρια, αναλόγως με το βαθμό ευαισθησίας τους σε χαμηλό pH. Όλοι οι μικροοργανισμοί έχουν μια μέγιστη, μια ελάχιστη και μια άριστη τιμή pH για την ανάπτυξη τους. Γενικά τα βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα και προτιμούν ένα pH περίξ της ουδέτερης περιοχής (6,5-7,5), με μια ανοχή σε ένα εύρος pH (4-9). Οι ζύμες είναι περισσότερο ανθεκτικές σε χαμηλότερες τιμές pH, απ' ότι τα βακτήρια και τέλος οι μύκητες έχουν ένα ευρύτερα αποδεκτό εύρος pH(90, 91).

Η παρεμπόδιση των μικροοργανισμών εξαρτάται επίσης από το είδος του οργανικού οξέος, την συγκέντρωση και το χρόνο επαφής με αυτό. Οι μικροοργανισμοί επιδεικνύουν μια διαφορετική ανοχή έναντι των διαφόρων οργανικών οξέων. Για παράδειγμα, τα ίδια τα

οξυγαλακτικά βακτήρια δεν είναι μόνο ανθεκτικά έναντι των ασθενών λιπόφιλων οξέων, αλλά παράλληλα τα παράγουν ως δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού (92).

Με δεδομένο, ότι τα οργανικά οξέα σε αδιάστατη μορφή μπορούν να διέλθουν εύκολα δια μέσου της λιπόφιλης κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου με αποτέλεσμα

την οξίνιση του εσωτερικού του κυττάρου, η παρεμποδιστική ικανότητα ενός οργανικού οξέος είναι συνάρτηση της σταθεράς διαστάσεως (pK_a). Όσο πιο υψηλή είναι αυτή, τόσο πιο υψηλό το ποσοστό του οξέος που παραμένει αδιάστατο για δεδομένη τιμή pH, άρα τόσο μεγαλύτερη και η δραστηριότητα του (89, 90).

β. Διοξείδιο του άνθρακα

Το διοξείδιο του άνθρακος αποτελεί ένα από τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των εξοζών από ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια.

Η συσσώρευση CO_2 επιδρά στην ικανότητα συντήρησης ενός τροφίμου με δύο τρόπους (93) :

α) Δημιουργεί αναερόβιο περιβάλλον αντικαθιστώντας το ατμοσφαιρικό οξυγόνο εντός της μάζας του προϊόντος.

β) Αποτελεί το ίδιο έναν αντιμικροβιακό παράγοντα (95). Χαμηλές συγκεντρώσεις CO_2 ευνοούν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων (93).

Ο μηχανισμός δράσης του CO_2 δεν είναι απόλυτα γνωστός. Δύο πιθανές εξηγήσεις έχουν διατυπωθεί:

1. το CO_2 παρεμποδίζει ενζυμικές αντιδράσεις καρβοξυλίωσης (94)
2. η συσσώρευση του CO_2 στη λιπιδιακή στρώση της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί προβλήματα στη λειτουργικότητά της (95).

γ. Υπεροξείδιο του υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες

Η παρουσία της βακτηριακής υπεροξειδάσης αρχικά παρατηρήθηκε από τους Gunsalus et Ubreith (1945), οι οποίοι διαπίστωσαν την παραγωγή τους από τα στελέχη του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *L. helveticus*. Αργότερα, άφθονη παραγωγή της υπεροξειδάσης παρατηρήθηκε σε χλωρίδα γαλακτικών γενών όπως: *Lactobacillus* sp.,

Lactococcus sp. και *Pediococcus sp.* Διαπιστώθηκε επίσης, ότι οι λακτοβάκιλλοι παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα υπεροξειδάσης από τα άλλα γένη.

Η δράση της υπεροξειδάσης συμπληρώνεται από την παρουσία ελεύθερων ριζών (O και OH) του οξυγόνου (2, 97). Τόσο το H₂O₂ όσο και οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν ειδικές περιοχές του βακτηριακού DNA (π.χ. την μεθυλική ομάδα της θυμίνης και τα μόρια της γουανίνης) και προκαλούν αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές βλάβες, όπως απελευθέρωση νουκλεοτιδίων ή απόσπαση ολόκληρων τεμαχίων DNA (98, 99). Η παραγωγή H₂O₂ από τα γαλακτικά βακτήρια δεν εξαρτάται μόνον από την παρουσία οξυγόνου στο μέσο ανάπτυξης, αλλά και από το είδος των στελεχών (100, 101). Οι Price et Lee (1990) συμπέραναν ότι το H₂O₂ ήταν υπεύθυνο για την παρεμπόδιση ανάπτυξης στελεχών των γενών *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* και *Proteus sp.* από τον *Lactobacillus plantarum*. Μελέτες έδειξαν ότι ο *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* μπορεί να παρεμποδίσει την *Pseudomonas fluorescens* σε θερμοκρασία ψύξης, λόγω της παραγωγής υπεροξειδάσης (101).

Τέλος, ειδικά στο φρέσκο γάλα, το H₂O₂ ενεργοποιεί το ισχυρό, φυσικό αντιμικροβιακό σύστημα της λακτο-υπεροξειδάσης-θειοκυανίου (LPS) που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αντιβακτηριακών παραγωγών, όπως οξυοξέων OSCN-, O₂SCN- και O₃SCN-, που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυρίως των κατά Gram(-) *E.coli*, *Salmonella sp.* και *Pseudomonas sp.* (103, 104).

δ. Διακετύλιο

Το διακετύλιο (2,3-βουτανοδιόνη) είναι το πιο γνωστό τελικό μεταβολικό προϊόν που συντίθεται από το πυροσταφιλικό οξύ τόσο αερόβια όσο και αναερόβια (2) και ευθύνεται για το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση κυρίως στο βούτυρο, αλλά και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ένωση αυτή παράγεται από πλήθος στελεχών των LAB που ζυμώνουν το κιτρικό οξύ, όπως *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.*, και *Pediococcus sp.* και αποτελεί προϊόν δευτερογενούς ζύμωσης (81). Η επίδραση του διακετυλίου έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* έχει ήδη μελετηθεί από το 1938 (105). Μελέτες έδειξαν ότι το διακετύλιο σε συγκέντρωση 500-2500 (μg/ml) είναι πιο αποτελεσματικό έναντι των Gram(-) μικροοργανισμών. Μελέτες έδειξαν ότι α) το διακετύλιο σε συγκέντρωση από 258-344 mg/ml προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης σε καλλιέργειες Gram(-) βακτηρίων, β) ελάχιστα ppm διακετυλίου ήταν αρκετά να προκαλέσουν ισχυρή παρεμπόδιση της ανάπτυξης στελεχών της *E. coli*, και γ) συγκέντρωση 344 ppm διακετυλίου επέδειξε βακτηριοκτόνο δράση έναντι στελεχών της *Yersinia enterocolytica*, *Aeromonas hydrophila* και *Salmonella anatum* (106).

ε. Ακεταλδεΐδη

Η ακεταλδεΐδη παράγεται κατά την παρασκευή του γιαουρτιού, από την δράση του ενζύμου αλδοδάση της θρεονίνης που παράγεται από τον *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Το ένζυμο αυτό μετατρέπει τη θρεονίνη σε ακεταλδεΐδη και γλυκίνη. Η ακεταλδεΐδη είναι υπεύθυνη για το τυπικό άρωμα του γιαουρτιού, στο οποίο βρίσκεται σε συγκέντρωση γύρω στα 225 ppm στο τελικό προϊόν (85). Από τον Egyad L.G. (1967) έχει αναφερθεί, ότι ποσότητα 44 ppm ακεταλδεΐδης μπορεί να παρεμποδίσει την κυτταρική διαίρεση στελεχών της *E. coli*.

στ. Αντιμικροβιακές ουσίες μικρού μοριακού βάρους, μη πρωτεϊνικής φύσεως (εξωπολυσακχαρίτες EPS's)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μερικές ουσίες (οι εξωπολυσακχαρίτες και η reuterin που παράγονται από ορισμένα στελέχη και χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης (85). Οι κυριότερες από αυτές είναι:

1. Μια ουσία από στέλεχος του *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, μοριακού βάρους 100-300 Da, βιολογικά ενεργή έναντι των στελεχών *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putrefaciens* και *E.coli* (108).
2. Μια ουσία από στέλεχος του *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, δραστική έναντι των *L. lactis*, *E.coli*, *S.typhimurium*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* (109).
3. Μια παρόμοια ουσία παράγεται από στέλεχος του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, με μοριακό βάρος γύρω στα 700 Da, η οποία είναι δραστική έναντι των *Pseudomonas fragi*, *Achromobacter liquefaciens* και *S.aureus*, με άριστο pH δράσης 4.0 (110, 111).
4. Η αντιμικροβιακή ουσία "reuterin", η οποία παράγεται από το στέλεχος του *Lactobacillus reuterii* (112, 113), το οποίο ενδημεί στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των άλλων θηλαστικών. Το παρεμποδιστικό φάσμα αυτής είναι κατά εξαίρεση ευρύ και περιλαμβάνει Gram(+) (π.χ. *Clostridium sp.*, *Staphylococcus sp.* και *Listeria sp.*) και Gram(-) βακτήρια (π.χ. *Salmonella sp.* και *Shigella sp.*), ζύμες, μύκητες και πρωτόζωα (114). Έχει προταθεί η εφαρμογή της reuterin και των παραγωγών στελεχών στην συντήρηση τροφίμων και ενσιρωμάτων για τη μείωση παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Προσθήκη reuterin στον μитτωτό έδειξε παρεμπόδιση ανάπτυξης στελεχών της *E.coli* και προσθήκη

μίγματος που προήρχετο από το στέλεχος *L. reuteri* με γλυκερόλη έδειξε σωματική αύξηση του χρόνου συντήρησης σαρδελών και καθυστέρηση της ανάπτυξης βακτηρίων που επέφεραν αλλοιώσεις στο είδος αυτό των ιχθύων (11).

Κατά συνέπεια, η reuterin μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα φυσικό συντηρητικό τροφίμων (11,112,113,114).

ζ. Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιβακτηριακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών, που περιλαμβάνουν και παθογόνα στελέχη από Gram(+) και Gram(-) μικροοργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές διακρίνονται για την μεγάλη ετερογένεια, ως προς την δομή τους, τις φυσικοχημικές και γενετικές τους ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους (5, 85, 88, 115).

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι πρωτεϊνικής φύσεως ουσίες, οι οποίες κατατάσσονται σε κατηγορίες (κλάσεις) ανάλογα με: τη δομή τους, το μοριακό τους βάρος και τη θερμοανθεκτικότητα τους (8, 16). Η παραγωγή των βακτηριοσινών σχετίζεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη και εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ανάπτυξης, όπως pH, θερμοκρασία, αερισμός και θρεπτικά συστατικά.

Η βακτηριοκτόνος δράση των βακτηριοσινών είναι υψηλότερη σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης, απ' ό,τι σε κύτταρα της στατικής φάσης ανάπτυξης (117, 118, 119). Τα περισσότερα LAB παράγουν βακτηριοσίνες που είναι δραστικές κυρίως έναντι στελεχών της ίδιας οξυγαλακτικής γλωρίδας. Παρ' όλα αυτά τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί βακτηριοσίνες με ευρύτερο φάσμα παρεμπόδισης που περιλαμβάνει και παθογόνα Gram(+), σπάνια όμως και Gram(-) βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά γένη από τα LAB (8). Η ιδιότητα των βακτηριοσινών αυτών να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, είχε ως αποτέλεσμα οι επιστήμονες να επικεντρώσουν το ενδιαφέρον τους στην αναζήτηση εναλλακτικών μορφών συντήρησης των τροφίμων με πιο φυσικό τρόπο, χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών. Αυτό σημαίνει την εφαρμογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ως προστατευτικών καλλιιεργειών (protective cultures) ή των μεταβολικών τους προϊόντων, κυρίως βακτηριοσινών (8, 57, 58, 88, 115, 116, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134).

Οι βακτηριοσίνες που βρίσκουν εφαρμογή στην τεχνολογία των τροφίμων, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα LAB. Ένας μεγάλος αριθμός βακτηριοσινών παράγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Enterococcus sp.* και *Carnobacterium sp.* Οι περισσότερες από αυτές παρουσιάζουν στενό φάσμα δράσης και μόνο μερικές έχουν δράση εναντίον και παθογόνων βακτηρίων (8, 55, 116, 123, 124, 135).

Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των βακτηριοσινών που έχουν βρεθεί, θα αναφερθούν παρακάτω μόνο κάποιες από τις ιδιότητες των διαφόρων βακτηριοσινών (Πίνακες 1-5) και ορισμένα γενικά στοιχεία για την κάθε κατηγορία μικροοργανισμών που τις παράγουν. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι αρκετές έρευνες λαμβάνουν χώρα τα τελευταία χρόνια και νέες βακτηριοσίνες εντοπίζονται από διάφορα στελέχη LAB, χωρίς όμως να έχουν μελετηθεί πλήρως οι αντιβακτηρικές τους ιδιότητες και η ασφάλειά τους ως προβιοτικά. Π.χ. η enteracin 226 NWC που αποτυπώθηκε από τον *E. faecalis* 226 (136), η thermophilicin 347 από τον *S. thermophilus* (Villani 1995), η lactocin 705 από τον *L. casei* CRL 705 (137), μια βακτηριοσίνη από τον *S. thermophilus* ST 134 (138) κ.α.

Πίνακας 3: Βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Lactococcus sp.* (7, 8, 55, 56, 85, 135, 139)

Βακτηριοσίνη	Παραγωγό στέλεχος	Τρόπος δράσης	Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης
Diplococcin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346	Αναστολή σύνθεσης DNA, RNA, μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> και <i>cremoris</i>
Lactostrepcin	Στελέχη του <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>diacetylactis</i> , <i>lactis</i> που δεν παράγουν νισίνη	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , (Group A, C, G) <i>Bacillus cereus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. citrovorum</i> , <i>L. paracitrovorum</i>
Lactostrepcin 5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 202	Απώλεια ιόντων, διακοπή της μεταφοράς ουριδίνης, αναστολή σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνικής σύνθεσης	<i>Lactococcus sp.</i>
Lactococcin 1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AC1	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i>
Lactococcin A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2130,9BA <i>Lactococcus lactis susp. diacetylactis</i> WM4	Απώλεια των ενδοκυτταρικών συστατικών	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> και <i>diacetylactis</i> , <i>clostridium sp.</i>
Lactococcins Μ και Ν	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Δεν έχει καθοριστεί	Δεν έχει καθοριστεί
Lactococcin Β	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Δεν έχει καθοριστεί	Δεν έχει καθοριστεί
Nisin	Διάφορα στελέχη <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Εκροή των αμινοξέων και των κατιόντων, διαταραχή του δυναμικού της μεμβράνης	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimutium</i>
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ 481	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>C. tyrobutyricum</i>

Πίνακας 4: Βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Lactobacillus* sp. (7, 8, 85, 139, 140, 141)

Βακτηριοσίνη	Παραγωγό στέλεχος	Τρόπος δράσης	Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης
Fermenticin	<i>Lactobacillus fermenti</i>	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp.
Plantaricin A	<i>L. plantarum</i> C-11	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.
Plantaricin B	<i>L. plantarum</i> NCDO1103	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesederoides</i> , <i>P. damnosus</i>
Sakacin A	<i>L.sakei</i> 706	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
Sakacin M	<i>L.sakei</i> 184	Βακτηριοστατική	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>
Sakacin P	<i>L.sakei</i> LTH673	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Brochothrix thermo-</i> <i>sphacta</i>
Lactocin S	<i>L.sake</i> L45	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
Curvacin A	<i>L.curvatus</i> LTH1174	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
Brevicin	<i>L.brevis</i> 37	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
Caseicin 80	<i>L.casei</i> B80	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. casei</i>
Plantaricin BN	<i>L.plantarum</i> BN	Βακτηριοκτόνος	<i>L. sakei</i>
Bavaracin MN	<i>L.bavaricus</i> MN	Βακτηριοκτόνος	<i>L. sakei</i>
Lactocin 27	<i>L.helveticus</i> LP27	Εκροή ιόντων από τα κύτταρα	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i>
Helveticin J	<i>L.helveticus</i> 481	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. helveticus</i>

Εισαγωγή–Χαρακτηριστικά των LAB

Helveticin V-1829	<i>L.helveticus</i> V-1829	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp.
Lactacin F	<i>L.acidophilus</i> 11088	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>E. faecalis</i>
Lactacin B	<i>L.acidophilus</i> N2	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp.

Πίνακας 5: Βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Pediococcus* sp.(7, 8, 85, 139)

Βακτηριοσίνη	Παραγωγό στέλεχος	Τρόπος δράσης	Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης
Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	Αναστολή της σύνθεσης ATP, διακοπή του συστήματος μεταφοράς	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. putida</i>
Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PA1.0	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Pediocin A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>

Πίνακας 6: Βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Carnobacterium* sp.(7, 8, 85, 139)

Βακτηριοσίνη	Παραγωγό στέλεχος	Τρόπος δράσης	Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης
Carnobacteriocin A1, A2, A3	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	Δεν έχει καθοριστεί	LAB
Carnobacteriocin B1, B2	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	Δεν έχει καθοριστεί	LAB
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp.

Οι εφαρμογές των Βακτηριοσινών ως συντηρητικών είναι πολλές.

Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω:

1.Γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι προσπάθειες εφαρμογής των βακτηριοσινών ως συντηρητικών των γαλακτοκομικών προϊόντων ξεκίνησαν με τη χρήση της νισίνης με ικανοποιητικά αποτελέσματα (131, 142).

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την τυροκόμηση του τυριού Gouda, με συνενοφθάμιση καλλιεργείων που παράγουν νισίνη, σε ποσοστό 10% του εκκινητού, δεν παρατηρήθηκε εκβλάστηση των σπορίων του κλωστηριδίου (143). Η νισίνη έχει αναγνωριστεί ως το πλέον αποτελεσματικό συντηρητικό στα παστεριωμένα μετουσιωμένα τυριά και χρησιμοποιείται εναλλακτικά υποκαθιστώντας τα νιτρικά άλατα (144, 145). Προβλήματα στην τυροκομία επίσης παρουσιάζει το βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Τα προβλήματα αυτά συνδέονται ιδιαίτερα με προϊόντα στα οποία κατά την ωρίμανση τους παρατηρείται αύξηση της τιμής του pH, όπως για παράδειγμα στα ιταλικά τυριά Taleggio, Gorgonzola και Mozzarella. Κατά την τυροκόμηση του ιταλικού τυριού Taleggio με συνενοφθάμιση του βακτηρίου *Enterococcus faecium* και εκκινητή, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της βακτηριοσίνης του πρώτου έναντι των θερμοφίλων στελεχών του εκκινητή. Επιπλέον, η δράση της βακτηριοσίνης ήταν σταθερή κατά την ωρίμανση του τυριού και παρεμπόδισε σημαντικά την αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes*. (146). Σε έρευνες διαπιστώθηκε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (κατά των *L. monocytogenes*, *Bacillus* sp.) της νισίνης, βακτηριοσίνης των στελεχών του γένους *Lactobacillus* sp. όταν ενοφθαλμίζεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα (115, 145, 147, 148, 149).

Τέλος η προσθήκη εκκινητού *Lactococcus lactis* ύστερα από θερμική επεξεργασία του (heat-treated) κατά την παραγωγή του τυριού Mozzarella, ενοφθαλμισμένου με το βακτήριο *Listeria*

monocytogenes και συντήρηση σε θερμοκρασία 5°C για 2 έως 3 εβδομάδες, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του πληθυσμού του παθογόνου σημαντικά μειωμένου από τον αντίστοιχο πληθυσμό του μάρτυρα (παραγωγή τυριού ενοφθαλμισμένου με το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, χωρίς όμως την προσθήκη του εκκινητού) (19).

2. Προϊόντα κρέατος.

Πρόσφατα, ορισμένες από τις τεχνικές βιοσυντήρησης που έχουν εφαρμοστεί στη βιομηχανία κρέατος είναι η χρήση ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας οξυγαλακτικών βακτηρίων ως προστατευτικής καλλιέργειας και η ενσωμάτωση καθαρών βακτηριοσινών με αντιλιστερική δράση μέσα στα τρόφιμα (131, 150, 151). Ο *Lactobacillus sakei* Lb674 απομονώθηκε από το κρέας και βρέθηκε να παράγει μια βακτηριοσίνη, τη *Sakacin 674*, που παρουσιάζει αντιλιστερική δράση, όπως συμβαίνει και με τις βακτηριοσίνες *sakacin P* και *pediocin PA-1* (152, 153). Η ενοφθάμιση του βακτηρίου *Lactobacillus sakei* Lb674 σε επίπεδο 10^5 - 10^6 μικρ./γρ. παρεμπόδισε την αύξηση του πληθυσμού των στελεχών της *Listeria sp.* σε αλλαντικά τύπου *Bologna*, συσκευασμένα υπό κενό και συντηρούμενα σε θερμοκρασία 7°C (131). Η προσθήκη στελεχών του μικροοργανισμού *Pediococcus acidilactici* JDI-23 σε αλλαντικά τύπου *Φρανκφούρτης* (με υψηλό αρχικό ενοφθάμισμα, 10^7 μικρ./γρ.), συντηρούμενα σε θερμοκρασία 4°C, παρεμπόδισε πλήρως την αύξηση της *Listeria monocytogenes* για περισσότερες από 60 ημέρες, ενώ στο μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη των στελεχών του γένους *Pediococcus sp.*, ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε από 10^4 μικρ./γρ. στην αρχή του πειράματος, σε 10^6 μικρ./γρ. στο τέλος της περιόδου επώασης (154). Όταν ο *Pediococcus acidilactici* JDI-23 ενοφθαλμίστηκε σε επίπεδο 10^3 - 10^4 μικρ./γρ., η αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* δεν παρεμποδίστηκε πλήρως (154). Η αντιλιστερική δράση της *pediocin A1* που παράγεται από το στέλεχος *P. acidilactis* έχει τεκμηριωθεί με πειραματισμούς σε ζυμώμενα αλλαντικά (20, 127).

Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η βακτηριοσίνη νισίνη έχει και παρεμποδιστική δράση κατά της ανάπτυξης του *Cl. batulinum* σε προϊόντα κρέατος (155, 156, 157, 158, 159).

3. Ιχθύες και προϊόντα τους.

Από τα αποτελέσματα της χρησιμοποίησης τριών διαφορετικών βακτηριοσινών (της νισίνης Z, της καρνοσίνης U149 του *Carnobacterium piscicola* U149 και της μπαβαρισίνης A του *Lactobacillus bavaricus* MI401) προέκυψε ότι στην περίπτωση της νισίνης Z υπήρξε καθυστέρηση στην αύξηση παθογόνων βακτηρίων και βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις. Ο χρόνος συντήρησης του προϊόντος επιμηκύνθηκε από 10 ημέρες (που ήταν ο χρόνος συντήρησης του μάρτυρα) σε 31 ημέρες. Οι άλλες δύο βακτηριοσίνες ήταν λιγότερο δραστικές (123).

4. Λαχανικά που έχουν υποστεί γαλακτική ζύμωση.

Σε σχετική έρευνα παρατηρήθηκε μείωση του σχετικά υψηλού αρχικού μικροβιακού φορτίου, σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες, όταν προστέθηκαν σε αυτές LAB που παράγουν βακτηριοσίνες (160). Η χρήση βακτηριοσινών δραστικών έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, έχει μελετηθεί για την παραγωγή του Kimchi, ενός παραδοσιακού πικάντικου κορεάτικου προϊόντος αποτελούμενο από λαχανικό που έχει υποστεί ζύμωση. Η χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών βακτηριοσινών παρουσίασε αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά την παρεμπόδιση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Η προσθήκη της σακακίνης A που παράγεται από το βακτήριο *Lactobacillus sakei* Lb706 δεν παρεμπόδισε την αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* σε θερμοκρασία ζύμωσης, 14°C, του Kimchi, ενώ η βακτηριοσίνη του *Pediococcus acidilactici* M προκάλεσε γρήγορη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου και ήταν ικανή να ελέγξει την αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* μέχρι τη 16^η ημέρα της ζύμωσης(161).

Παράγοντες που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των βακτηριοσινών στα τρόφιμα

Μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετές βακτηριοσίνες είναι λιγότερο αποτελεσματικές στα τρόφιμα από ό,τι στα διάφορα συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στα πειράματα κατά τη μελέτη των βακτηριοσινών. Αυτό συμβαίνει γιατί το τρόφιμο είναι ένα πολυσύνθετο σύστημα που αποτελείται από διάφορα μικροπεριβάλλοντα τα οποία επηρεάζουν το ένα το άλλο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγωγών στελεχών καθώς και των μορίων

των βακτηριοσινών με συστατικά των τροφίμων έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας των βακτηριοσινών (142).

Οι παράγοντες που επιδρούν αρνητικά στο μόριο της βακτηριοσίνης (και όχι στην ανάπτυξη του LAB) είναι οι παρακάτω (142, 162, 163) :

- Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών παθογόνων βακτηρίων ή βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στις βακτηριοσίνες.
- Η ύπαρξη διαφόρων παραγόντων, όπως ενζύμων (πρωτεάσες), αλλά και φυσιολογικών μηχανισμών, όπως η οξείδωση των λιπών, που αποσταθεροποιούν τη βιολογική δραστηριότητα των βακτηριοσινών.
- Η δέσμευση των βακτηριοσινών από διάφορα συστατικά του τροφίμου, όπως είναι τα σωματίδια του λίπους.
- Η απενεργοποίηση των βακτηριοσινών από τα πρόσθετα των τροφίμων.
- Η χαμηλή διαλυτότητα, η ανεπαρκής και άνιση διάχυση των βακτηριοσινών μέσα στη μάζα των τροφίμων.
- Η επίδραση του pH στη σταθερότητα και δραστηριότητα των βακτηριοσινών.

Οι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των LAB που παράγουν βακτηριοσίνες είναι (142, 162, 163) :

- Οι ανεπαρκείς συνθήκες περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία, το pH και τα θρεπτικά συστατικά, για την παραγωγή των βακτηριοσινών.
- Η απώλεια της ικανότητας παραγωγής των βακτηριοσινών.
- Η μόλυνση από βακτηριοφάγους.
- Ο ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στα τρόφιμα.

Προοπτικές χρήσης των βακτηριοσινών ως βιοσυντηρητικών

Όπως είναι γνωστό τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (starters) σε διάφορα προϊόντα ζυμώσεως, επειδή διαμορφώνουν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και παράλληλα παρεμποδίζουν την αύξηση των παθογόνων βακτηρίων. Ορισμένες φορές γίνεται ένας διαχωρισμός μεταξύ των εκκινητών και των προστατευτικών καλλιέργειών. Στην πραγματικότητα όμως μπορεί να είναι η ίδια καλλιέργεια, η οποία χρησιμοποιείται για διαφορετικούς σκοπούς και κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Για τους εκκινητές η παραγωγή οξέων έχει μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον, ενώ η αντιβακτηριακή

δράση τους μπορεί να αποτελεί ένα δευτερεύον χαρακτηριστικό, αλλά για τις προστατευτικές καλλιέργειες αυτό αποτελεί τον πρώτο και κύριο στόχο της εφαρμογής τους, δηλαδή να έχουν την ικανότητα παραγωγής αντιβακτηριακών ουσιών (1, 44, 45, 46). Η συντήρηση των τροφίμων με τη χρήση προστατευτικών καλλιεργειών που παράγουν βακτηριοσίνες ονομάζεται βιοσυντήρηση και αναφέρεται στην επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων, χρησιμοποιώντας τη φυσική αυτόχθονη μικροχλωρίδα του προϊόντος ή κάποια καθαρή καλλιέργεια, ως εκκινήτη ή και χρησιμοποιώντας τους βακτηριακούς μεταβολίτες των μικροοργανισμών (44). Σε αρκετές περιπτώσεις η χρήση LAB που παράγουν βακτηριοσίνες ως συντηρητικών στα τρόφιμα, σε αντικατάσταση των χημικών συντηρητικών που χρησιμοποιούνται σήμερα κυρίως στο κρέας και τα προϊόντα είναι πιο επιθυμητή από τους καταναλωτές (139, 156). Σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα η εφαρμογή των LAB που παράγουν βακτηριοσίνες και είναι δραστικά έναντι των σπορογόνων βακτηρίων (*Clostridium botulinum*), είναι δυνατόν να επιτρέπει την ηπιότερη θερμική επεξεργασία τους, προς όφελος της θρεπτικής τους αξίας και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους (131, 142, 155).

Με την εφαρμογή των βακτηριοσινών των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης και με την εφαρμογή της ορθής υγιεινής, είναι δυνατός ο αποτελεσματικός έλεγχος των παθογόνων βακτηρίων, ιδιαίτερα της *Listeria monocytogenes*, καθώς και των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε διάφορα προϊόντα (20, 131, 152, 153, 154, 161, 164).

Ορισμένα στελέχη των LAB που παράγουν βακτηριοσίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες σε ποικιλία προϊόντων. Όμως πριν από τη χρησιμοποίηση των βακτηριοσινών στα τρόφιμα θα πρέπει να μελετηθεί ένας αριθμός προβλημάτων που είναι δυνατόν να ανακύψουν, όπως, η χαμηλή παραγωγή τους από τους μικροοργανισμούς και η αστάθεια των ουσιών αυτών (131). Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα της αποτελεσματικότητας των βακτηριοσινών, καθώς και για τον καλύτερο έλεγχο της βιοσυντήρησης, περισσότερο αποτελεσματική μέθοδο αποτελεί η απευθείας προσθήκη των βακτηριοσινών σε καθαρή μορφή, την οποία όμως δεν χρησιμοποιεί η βιομηχανία τροφίμων λόγω του υψηλού κόστους της(131).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση των βακτηριοσινών έναντι Gram(-) βακτηρίων. Διάφορα Gram(-) βακτήρια, όπως η *Salmonella sp.* και η *Shigella sp.* είναι ανθεκτικά στις βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, λόγω της σύστασης του

κυτταρικού τους τοιχώματος. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην επέκταση του φάσματος της δράσης των βακτηριοσινών με την τροποποίηση της δομής του μορίου της βακτηριοσίνης ή την ευαισθητοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών των Gram(-) βακτηρίων στις διάφορες βακτηριοσίνες με τη χρήση ουσιών που αποτελούν συστατικά των τροφίμων (πρόσθετα) (131,142)

1.1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ LAB

Γενικά

Τα LAB δεν είναι με απόλυτη ευκρίνεια μια ταξινομημένη φυλογενετική ομάδα αλλά μια μεγάλη ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει γένη βακτηρίων με διάφορα χαρακτηριστικά. Τα γενικά αυτά χαρακτηριστικά περιγράφονται στο σημείο 1.1.1. Άλλα βακτήρια τα οποία συνήθως συνδέονται με τα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι βακτήρια των γενών τα *Bifidobacterium sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Micrococcus sp.* και *Propionibacterium sp.* τα οποία είναι Gram+ και δεν σχηματίζουν σπόρους, αλλά βιοχημικώς δεν μπορούν να χαρακτηριστούν LAB και επίσης να τοποθετηθούν στην LAB ομάδα φυλογενετικά (4, 83).

1.1.2.1. Γένος *Lactobacillus sp.*

Τα βακτηριακά κύτταρα είναι μακρά και λεπτά ραβδία (π.χ. *L. bulgaricus*) που σε ορισμένα είδη (π.χ. *L. plantarum*) σμικρύνονται και ενίοτε φθάνουν στο σχήμα κορυνόμορφου κοκκοβάκιλλου σε ορισμένα είδη. Έχουν διαστάσεις 0,5-1,2 X 1,0-10 μm. Τα κύτταρα σχηματίζουν αλυσίδες ιδιαίτερα στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Δεν ρευστοποιούν την ζελατίνη και κατά κανόνα δεν ανάγουν τα νιτρικά άλατα και δεν σχηματίζουν ινδόλη, ούτε υδρόθειο. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία από 2°-53° C με άριστη μεταξύ 30° και 40° C. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C στα DNA κυμαίνεται μεταξύ 32 και 53 mol%. Το γεγονός αυτό δείχνει την μεγάλη ετερογένεια του γένους και αυτό είναι ένα θέμα συζήτησης και αντικείμενο έρευνας από τους ερευνητές – ταξινομητές (4). Είναι ανθεκτικά στα οξέα και έχουν άριστο pH για την ανάπτυξή τους την τιμή 5,0 ή και κατώτερη. Σε ουδέτερη ή ελαφρά αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται (43, 165, 166, 167, 168). Πάνω από 80 είδη και υποείδη είναι γνωστά σήμερα, ο κατάλογος όμως συχνά ανανεώνεται. Στην τελευταία κατά Bergey's (1984) κλείδα ταξινόμησης έχουν γίνει αποδεκτά 44 είδη με επιπλέον 8 είδη με αμφισβητούμενη κατάταξη και αρκετά υποείδη.

Όσον αφορά το πρότυπο διάσπασης των υδατανθράκων τα στελέχη ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: (166,167)

I. Είδη υποχρεωτικά ομοζυμωτικά: δέκα πέντε (15)

II. Είδη υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά: δέκα οχτώ (18).

III. Είδη προαιρετικά ετεροζυμωτικά: έντεκα (11).

Είδη του γένους *Lactobacillus sp.*, απομονώνονται από ζυμούμενα φυτικά προϊόντα, κρέατα, ιχθυρά, νερό, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, απόβλητα, κόπρανα ανθρώπων και ζώων, μπίρα, κρασί και χυμούς φρούτων. Η ύπαρξη τους συνδέεται με την μικροχλωρίδα ανθρώπων και ζώων (στοματική κοιλότητα, γαστρεντερικός σωλήνας, κόλπος) (81, 83). Τα είδη και υποείδη που ενδιαφέρουν την βιοχημεία τροφίμων είναι τα ακόλουθα:

- ***L. delbrueckii***: Βακτηριακά κύτταρα ραβδιόμορφα με στρογγυλεμένα άκρα, διαστάσεων 0,5-0,8 X 2-9 μm, διατασσόμενα μεμονωμένα ή υπό μορφή βραχέων αλύσεων. Έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 45° C, αλλά αναπτύσσονται και στους 48°-52° C. Άθροισμα αζωτούχων βάσεων G + C μεταξύ 49-51 mol%. Υποχρεωτικά ομοζυμωτικά. Γνωστά υποείδη του τα:

- *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*

- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και

- *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (είναι ο *L. lactis* της παλιάς βιβλιογραφίας) (169).

- ***L. casei***: Βακτηριακά κύτταρα ραβδιόμορφα με συχνά τετραγωνισμένα άκρα διαστάσεων 0,7-1,1 X 2,0-4,0 μm, διατασσόμενα υπό μορφή βραχείων αλύσεων. Δεν αναπτύσσεται στους 45° C (με εξαίρεση τον *L. casei* subsp. *rhamnosus*). Έχει ανάγκη βιταμινών του συμπλέγματος B για την ανάπτυξή του. Άθροισμα αζωτούχων βάσεων G + C μεταξύ 45-47 mol%. Γνωστά υποείδη του τα:

- *L. casei* subsp. *casei*

- *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*

- *L. casei* subsp. *tolerans*

- *L. casei* subsp. *rhamnosus*

Όλα τα υποείδη είναι μεσόφιλα και ζυμώνουν σε χαμηλή θερμοκρασία 15° C ή και χαμηλότερη. Στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες (Πίνακας 4) (166, 167).

- ***L. paracasei* subsp. *paracasei*:** Η πλειοψηφία των στελεχών του γένους *L. casei* έχουν τελευταία επαναταξινομηθεί ως *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Αναπτύσσεται στους 10° C όχι όμως και στους 45° C, γεγονός που είναι χαρακτηριστικό και κοινό γνώρισμα στον *L. casei* και *L. paracasei* subsp. *tolerans*. Η αδυναμία ζύμωσης της ραμνόζης και η δυνατότητα ανάπτυξης στους 45° C διακρίνει αυτά τα στελέχη από τα στελέχη του *L. rhamnosus*. Μερικά στελέχη παράγουν ρακεμικό γαλακτικό οξύ, γεγονός που οφείλεται τόσο στη δράση των L όσο και των D λακτικών δεϋδρογονασών (166, 167, 170).

Πίνακας 8: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LACTOBACILLUS* SP. (167, 171)

Είδος	Είδος γαλακτικού οξέος	Άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως (°C)	Όρια θερμοκρασίας αναπτύξεως (°C)	Μέγεθος (μm)	Γλυκόζη (οξύ)	Γλυκόζη (οξύ + αέριο)	Γαλακτόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Ζακχαρόζη	Λακτόζη	ομοζυμοτικοί
<i>L. delbrueckii</i>	D (-)	40-44	20-52	2-9	+	-	±	+	±	+	-	
<i>L. lactis</i>	D (-)	40-43	20-52	2-8	+	-	+	+	+	+	+	
<i>L. bulgaricus</i>	D (-)	40-43	20-52	2-8	+	-	+	±	-	-	+	
<i>L. helveticus</i>	DL	40-42	20-52	2-6	+	-	+	+	+	-	+	
<i>L. acidophilus</i>	DL	35-38	25-48	1,5-6	+	-	+	+	+	+	+	
<i>L. salivarius</i>	L (+)	35-40	20-45	1,5-5	+	-	+	+	±	+	+	
<i>L. casei</i>	L (+)		15-45	2-4	+	-	+	+	+	+	+	
<i>L. plantarum</i>	DL	30-35	15-45	3-8	+	-	+	+	+	+	+	
<i>L. curvarius</i>	DL	30-37	15-45	1-1,2	+	-	+	+	+	-	+	

Εισαγωγή–Χαρακτηριστικά των LAB

Species	DL	40-42	20-45	3-4	+	+	+	+	+	+	+	ετεροζυμωτικοί
<i>L. fermentum</i>	DL	40-42	20-45	3-4	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. brevis</i>	DL	30	20-42	2-4	+	+	±	+	+	±	±	
<i>L. buchneri</i>	DL	30	20-42	2-4	+	+	±	+	+	±	±	
<i>L. viridescens</i>	DL	30	5-40	2-4	+	+	-	+	+	±	-	
<i>L. hilgardii</i>	DL	28-34	20-42	2-4	+	+	±	+	+	±	±	

- ***L. acodophilus*** (Curry 2002, Gopal 2002): Βακτηριακά κύτταρα ραβδιόμορφα διαστάσεων 0,6-0,9 X 1,5-6 μm, διατασσόμενα σε ζεύγη ή βραχείες αλύσεις. Υποχρεωτικά ομοζυμωτικά σχηματίζουν DL – γαλακτικό οξύ και μετέχουν στην αυτόματη οξίνιση του γάλακτος. Έχουν θερμοκρασία ανάπτυξης από 22-48° C με άριστη τους 37° C. Άριστο pH 5,5-6,0. Άθροισμα αζωτούχων βάσεων G + C 32-37 mol%. Στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες (Πίνακας 4) (165, 166, 167).

- ***L. plantarum***: Βακτηριακά κύτταρα ραβδιόμορφα διαστάσεων 0,9 X 3-8 μm, που απαντούν μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε βραχείες αλύσεις. Βακτήριο ομοζυμωτικό και προαιρετικά ετεροζυμωτικό, μεσόφιλο, εμφανίζει άριστον ανάπτυξης τους 30-35° C. Είναι ικανό όμως να αναπτύσσεται και στους 15° C αλλά όχι στους 45° C. Άθροισμα G + C μεταξύ 44-46 mol%. Ανθεκτικό στο άλας σε αυξημένη οξύτητα, άνω του 1% μετέχει ενεργά σε όλες τις ζυμώσεις και τις προωθεί μέχρις εξαντλήσεως των σακχάρων. Παράγει βακτηριοσίνες (τις A και B plantaricin από το στέλεχος *L. plantarum* C-11 S και *L. plantarum* NCDO 1103 αντίστοιχα, T plantaricin από το στέλεχος *L. plantarum* LP CO10 και BN plantaricin από το στέλεχος *L. plantarum* NB. (Πίνακας 4). Παράγει DL – γαλακτικό οξύ (166, 172).

- ***L. brevis***: Βακτηριακά κύτταρα ραβδιόμορφα, διαστάσεων 0,7-1,0 X 2-4 μm που απαντούν μεμονωμένα ή υπό μορφή βραχέων αλύσεων. Παράγει DL – γαλακτικό οξύ και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία άνω των 15° C, με άριστη τους 30° C, αναπτύσσεται όμως και στους 45° C. Έχει άθροισμα G + C 45-47 mol% και είναι ετεροζυμωτικό (167).

- ***L. buchneri***: Συγκεντρώνει τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του *L. brevis* με την διαφορά ότι ζυμώνει την μελεξιτόζη. Έχει άθροισμα αζωτούχων βάσεων G + C μεταξύ 44-46 mol% (167).

- *L. viridencens*: Βακτηριακά κύτταρα ραβδίομορφα, που πλησιάζουν το σχήμα του κόκκου, διαστάσεων 0,8 X 2,0 – 4,0μm και απαντούν μεμονωμένα ή κατά ζεύγη. Είδος ετεροζυμωτικό σχηματίζει DL – γαλακτικό οξύ (167).

- *L. helveticus*: Βακτηριακά κύτταρα που έχουν το σχήμα του βακίλλου, διαστάσεων 0,6-1,0 X 2,0-6,0 μm και διατάσσονται μεμονωμένα ή σε αλύσεις. Απαιτεί για την ανάπτυξη του νιασίνη, ριβοφλαβίνη, παντοθενικό ασβέστιο και είτε πυριδοξαμίνη, είτε πυριδοξάλη ως απαραίτητα συστατικά ανάπτυξης. Κανένα στέλεχος δεν παράγει αμμωνία από την ζύμωση της αργινίνης. Το βακτήριο έχει σημαντική πρωτεολυτική δραστηριότητα στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια του γάλακτος περισσότερη από τους λοιπούς λακτοβακίλλους που χρησιμοποιούνται ως starters στην τεχνολογία γάλακτος. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται στο 37-40 mol%. Δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία κατώτερη των 15° C. Είναι ομοζυμωτικό βακτήριο, ζυμώνοντας τις εξόζες κυρίως σε γαλακτικό οξύ D- και L+. Αρκετά στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες (Πίνακας 4). Χρησιμοποιείται ευρέως ως starter στην τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων (169).

- *L. hilgardii*

- *L. fructivorans*

- *L. sakei*

-*L. curvatus*: Στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες (Πίνακας 4)

1.1.2.2. Γένος *Streptococcus sp.*

Πάνω από 50 είδη και υποείδη *Streptococcus sp.* είναι διεθνώς γνωστά. Είναι σφαιρικά ή ωοειδή κύτταρα μεγέθους 0,5 – 2 μm που διατάσσονται σε ζεύγη ή αλύσεις. Είναι ακίνητα εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, θετικά κατά Gram, ομοζυμωτικά, σχηματίζουν D(+) γαλακτικό οξύ, αρνητικά στην καταλάση, προαιρετικά αναερόβια. Έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37° C.

Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται μεταξύ 34-46 mol%. Απαντούν σε υποστρώματα με μεγάλη ευρύτητα από πλευράς συνθέσεων όπως οι βλεννογόνοι ανθρώπων και ζώων, τα φυτά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ταξινόμησή τους είναι πολύπλοκο θέμα και δεν θεωρείται ολοκληρωμένη. Στην τελευταία κλείδα ταξινόμησης των βακτηρίων κατά Bergey's έχουν γίνει αποδεκτά 37 είδη στρεπτόκοκκων με επιπλέον άλλα 10 με αβέβαιη ταξινομική θέση (4, 41, 167) .

Την Τεχνολογία Τροφίμων ενδιαφέρει μόνον ένα είδος (4) :

- ***S. thermophilus***: Κύτταρα σφαιρικά με διάμετρο 0,7-0,9 μm, που απαντούν σε ζεύγη ή μακρές αλύσεις. Ζυμώνει τα απλά ζάχαρα και τους δισακχαρίτες σακχαρόζη και λακτόζη μέχρι να διαμορφωθεί η τιμή pH 4,0 – 4,5. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 43-44° C, η ελάχιστη 19-21° C και η μέγιστη 52° C. Είναι καθαρά θερμοφιλο βακτήριο.

Είναι ευαίσθητος στο NaCl, δεν αναπτύσσεται ούτε στο 2%. Έχει αυξημένες απαιτήσεις σε διατροφικούς παράγοντες του υποστρώματος και κυρίως σε 6 βιταμίνες του συμπλόκου B και σε πολλά αμινοξέα.

Αναπτύσσεται σε ζυμό γλυκόζης με 2,5% άλας, αλλά όχι με 4% άλας, δεν ρευστοποιεί την ζελατίνη και δεν αποικοδομεί την καζεΐνη. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C είναι 40 mol% (167). Ανεύρσκεται στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και συχνά χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης (starter culture) στην παραγωγή των παραπάνω προϊόντων.

1.1.2.3. Γένος *Enterococcus* sp.

Τα κύτταρα του γένους είναι τυπικά σφαιρικά ή ωοειδή μεγέθους 0,6-2,0 X 0,6-2,5 μm και διατάσσονται σε ζεύγη ή βραχείες αλύσεις. Διαβιούν κατά κύριο λόγο στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ανώτερων ζώων. Τα στελέχη του γένους είναι τα περισσότερο θερμοανθεκτικά βακτήρια από το σύνολο των ασποριογόνων βακτηρίων (173). Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται μεταξύ 33,5 και 38 mol%.

Την Μικροβιολογία Τροφίμων ενδιαφέρουν οι Εντερόκοκκοι επειδή μεταφέρονται με τα κόπρανα των ζώων στο γάλα. Είναι γενικά μη παθογόνοι, αλλά τα στελέχη που παράγουν αιμολυσίνες προκαλούν λοιμώξεις (4, 41, 81) . Οι Εντερόκοκκοι που ενδιαφέρουν την Τεχνολογία Τροφίμων είναι οι:

- ***E. faecalis***: Βακτηριακά κύτταρα σφαιρικά ή ωσειδή, που απαντούν σε ζεύγη ή υπό μορφή βραχέων αλύσεων με διάμετρο 0,5-1 μm. Οι αποικίες τους σε στερεό θρεπτικό υλικό είναι ομαλές με πλήρη περιφέρεια λευκού χρώματος. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία από 10 έως 45° C. Αναπτύσσονται σε ρευστό θρεπτικό υπόστρωμα με 6,5% σε άλας. Ο *E. faecalis* εξελίσσεται σε ευκαιριακό παθογόνο και η χρήση του ως LAB στην τεχνολογία γαλακτοκομικών προϊόντων αν και χρησιμοποιείται ως «εκκινητής (starter), συγκεντρώνει αμφισβητήσεις (4, 167).

- ***E. faecium***: Παρουσιάζει τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με τον προηγούμενο εκτός του ότι σχηματίζει πιο επιμήκη κύτταρα. Το άθροισμα G + C κυμαίνεται μεταξύ 38-39 mol%. Το είδος αυτό είναι πιο θερμοανθεκτικό από το προηγούμενο. Αντέχει σε διάλυμα άλατος 6,5% και αναπτύσσεται μέχρι pH 9,6. Μετέχει ενεργά στην ζύμωση ορισμένων τυρών (174), όπως και το προηγούμενο είδος, συγκεντρώνει αμφισβητήσεις για την τεχνολογική του καταλληλότητα στην παραγωγή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, ως ευκαιριακά παθογόνο αν και χρησιμοποιείται ήδη ως «εκκινητής» (starter) (4, 167).

1.1.2.4. Γένος *Lactococcus sp.*

Τα βακτήρια είναι κύτταρα ωσειδή ή σφαιρικά (κόκκοι), διαστάσεων 0,5-1,2 X 0,5-1,5 μm και διατάσσονται ανά ζεύγη ή σε αλύσεις. Αναπτύσσονται εύκολα στο γάλα και σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα σε θερμοκρασία 10-45° C. Ανέχονται 0,1% κυανού του μεθυλενίου στο γάλα, το οποίο ανάγουν σε σύντομο χρονικό διάστημα, αλλά δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικό ζωμό (nutrient broth) αν η περιεκτικότητα σε άλας είναι 6,5% και το pH 9,6. Τα στελέχη του γένους είναι οι πλέον κοινοί μεσόφιλοι «εκκινητές» που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία παρασκευής πολλών τυρών.

Παλαιότερα τα στελέχη του γένους *Lactococcus sp.* είχαν τοποθετηθεί ταξινομικά στο είδος *Streptococcus lactis*, εφ' όσον παρήγαγαν αμμωνία από την αργινίνη και εάν δεν

παρήγαγαν στο είδος *Streptococcus cremoris* (4, 167, 175). Αρκετά στελέχη παράγουν βακτηριοσίνες (πίνακας 3). Σήμερα τα παρακάτω είδη χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων:

- ***Lc. lactis***: Τα βακτηριακά κύτταρα είναι ωοειδή, επιμηκυσμένα στο σημείο σύνδεσής τους στην άλυσσο. Συνήθως εμφανίζονται με τη μορφή διπλόκοκκου. Είναι μικροαερόφιλα και ομοζυμωτικά. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C είναι 38,6 mol%. Σε ζωμό γλυκόζης κατεβάζουν το pH μέχρι 4,0 έως 4,5. Είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά και στις ενώσεις του τετρασθενούς αμμωνίου. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ 10° και 40° C με άριστη τους 30° C.

Αναπτύσσονται ακόμη και παρουσία 4% άλατος. Παράγουν γαλακτικό οξύ μέχρι 1% μορφής L+. Για την ανάπτυξή τους σε θρεπτικά υποστρώματα απαιτούν 4-5 βιταμίνες του συμπλόκου B και 10-13 αμινοξέα. Μερικά στελέχη του εκκρίνουν την βακτηριοσίνη νισίνη που παρεμποδίζει την ανάπτυξη αρκετών Gram + βακτηρίων. Τα στελέχη ευθύνονται για την ταχεία οξίνιση του γάλακτος (167).

Τα κυριότερα υποείδη του που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων είναι τα :

- ***Lc. lactis subsp. lactis***: Μερικά στελέχη του υποείδους είναι ικανά να μεταβολίσουν το κιτρικό οξύ παράγοντας CO₂, διακετύλιο και άλλα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα, που είναι χρήσιμα για τις οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων (167).

- ***Lc. lactis subsp. cremoris***

- ***Lc. lactis subsp. diacetylactis***

1.1.2.5. Γένος *Pediococcus sp.*

Τα βακτηριακά κύτταρα είναι σφαιρικά και απαντούν σε ζεύγη ή σε τετράδες, έχοντας την ικανότητα να διαιρούνται σε δύο επίπεδα, ενώ σπάνια απαντώνται απλά κύτταρα και ουδέποτε σε αλύσεις. Ασποριογόνα, θετικά κατά Gram, είναι ομοζυμωτικά και παράγουν DL ή L+ γαλακτικό οξύ. Φυλογενετικά τοποθετούνται με το γένος *Lactobacillus sp.*

Απαιτούν για την ανάπτυξή τους βιοτίνη, νικοτινικό και παντοθενικό οξύ. Είναι μικροαερόφιλα και αναπτύσσονται καλύτερα αν υπάρχει μικρή ποσότητα CO₂. Το άθροισμα

των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται μεταξύ 34-42 Mol%. Είναι αρνητικά ως προς την καταλάση, μη πρωτεολυτικά και μη παθογόνα. Απαντώνται ευρύτατα σε φυτικά προϊόντα που υφίστανται γαλακτική ζύμωση, σε ζυμούμενα προϊόντα κρέατος και ψαριών και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Παράγουν βακτηριοσίνες (πίνακας 6) (4, 167).

Από τα 7 είδη που είναι γνωστά, εκείνα που ενδιαφέρουν την τεχνολογία των τροφίμων είναι τα παρακάτω:

- *Pediococcus dextranicus*: Έχει άριστο θερμοκρασίας ανάπτυξης μεταξύ 30 και 35° C και υποβιβάζει την τιμή του pH έως το 4. παράγει διακετύλιο (167).

- *Pediococcus acidilactici*

- *Pediococcus pentasaceus*

1.1.2.6. Γένος *Leuconostoc* sp.

Τα βακτήρια είναι σφαιρικά ή επιμήκη κύτταρα μεγέθους 0,5-0,7 X 0,7-1,2 μm που σχηματίζουν ζεύγη και αλύσει μικρού μήκους. Όλα τα είδη του γένους είναι ετεροζυμωτικά και διασπούν τις εξόζες κατά το ήμισυ προς γαλακτικό οξύ D (-) και κατά το υπόλοιπο προς CO₂ και αιθανόλη ή CO₂ και οξεικό οξύ, ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής που επικρατεί, σε βάρος της σακχαρόζης. Σχηματίζουν μαννίτη σε βάρος της φρουκτόζης.

Όλα τα είδη είναι αρνητικά στην καταλάση και δεν έχουν κυτοχρώματα. Δεν είναι πρωτεολυτικά, ούτε αιμολυτικά. Δεν σχηματίζουν ινδόλη και δεν ανάγουν τα νιτρικά άλατα. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται μεταξύ 30 και 44 mol% (167). Στην Βιομηχανία γάλακτος τα είδη *Lc. lactis* και *Lc. mesenteroides* είναι σημαντικά γιατί παράγουν CO₂ που προσδίδει τις χαρακτηριστικές οπές στα τυροκομικά προϊόντα και διακετύλιο που ενισχύει την γεύση του βουτύρου και της κρέμας. Όλα τα είδη του γένους έχουν ανάγκη για την ανάπτυξή τους από νισίνη, θειαμίνη, βιοτίνη και παντοθενικό οξύ (4, 142). Απαντούν με μορφή βλενωδους υφής επάνω σε υποστρώματα πλούσια σε σακχαρόζη, επάνω σε φρούτα και λαχανικά (επίφυτα) καθώς και σε ζυμωμένα φυτικά και ζωικά προϊόντα (ελιές, τουρσιά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα).

Σήμερα έχουν γίνει αποδεκτά τέσσερα (4) είδη *Leuconostoc* από τα οποία το πρώτο, όπως αναφέρεται παρακάτω έχει τρία υποείδη (4, 81).

- ***Leuconostoc mesenteroides***: Αναπτύσσεται μεταξύ 10 και 37° C, με άριστο θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25° C. Γνωστά υποείδη του είναι τα:

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

- ***Leuconostoc paramesenteroides***: Εμφανίζει άριστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 18-24° C. Δεν σχηματίζει δεξτράνη σε βάρος της σακχαρόζης σε αντίθεση με τα άλλα είδη.

- ***Leuconostoc lactis***: Έχει αυξημένες απαιτήσεις σε διατροφικούς παράγοντες κυρίως αμινοξέα. Ζυμώνει εύκολα τη λακτόζη και μπορεί να οδηγήσει σε θρόμβωση.

- ***Leuconostoc oenos***: Αναπτύσσεται καλύτερα σε θρεπτικά υλικά με βάση το χυμό τομάτας σε pH 4,2-4,8. Είναι προαιρετικά αναερόβιο. Αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασίας από 10-35° C με άριστο τους 21° C.

1.1.2.7. Άλλα γένη LAB

Η αποδοχή άλλων LAB στη βιομηχανία καλλιιεργειών ζύμωσης και η παρασκευή ζυμούμενων τροφίμων έχει πρόσφατα εδραιωθεί και βασίζεται στην ανάλυση αλληλουχιών rRna. Τα είδη αυτά δεν αναγνωρίζονται πλήρως στα προσδιορισμένα είδη που εισέρχονται στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (4, 40, 41, 83). Τα είδη αυτά των LAB είναι:

Γένος *Carnobacterium* sp.

Βακτηριακά κύτταρα σε μορφή βακίλλων, μεγέθους 0,15-0,7 X 1,0-2,0 μm διαταγμένα μεμονωμένα, σε ζεύγη ή βραχείες αλύσεις. Μερικά στελέχη είναι κινητά. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι ομοζυμωτικός και τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υψηλό pH, περίπου 9 και σε χαμηλή θερμοκρασία. Μορφολογικά θεωρούνται στελέχη *Lactobacillus* sp., ενώ φυλογενετικά είναι πλησιέστερα στα στελέχη *Enterococcus* sp. και προς τα στελέχη *Lactococcus* sp. Σήμερα είναι αναγνωρισμένα 7 είδη.

Μερικά στελέχη παράγουν βακτηριοσίνες (πίνακας 6). Τα είδη του γένους *Cornobacterium* έχουν απομονωθεί από κατεργασμένο κρέας μόσχου και πουλερικών, το γαστρεντερικό σωλήνα ιχθύων και από μαλακά τυριά (4, 176).

Γένος *Vagococcus* sp.

Βακτηριακά κύτταρα σφαιρικά, ελαφρά επιμήκη, μεγέθους 0,5-1,2 X 0,5-2,0 μm, που διατάσσονται μεμονωμένα σε ζεύγη ή βραχείες αλύσεις. Αρχικά περιγράφηκαν ως κινητά στελέχη της ομάδας N των *Streptococcus* sp. Η κινητικότητα τους ποικίλλει. Πηγές προέλευσής του τα νερά, και κόπρανα πουλερικών και ιχθύων (4).

Γένος *Tetragenococcus* sp. και γένος *Aerococcus* sp.

Βακτηριακά κύτταρα υπό μορφή κόκκων, διατεταγμένων σε τετράδες. Μορφολογικά μοιάζουν με τα κύτταρα του γένους *Pediococcus* sp., όμως φυσιολογικά μοιάζουν με τα κύτταρα του γένους *Enterococcus* sp. Και άλλα είδη βακτηρίων μπορεί να θεωρηθούν ως LAB εφ' όσον η ταξινόμησή τους γίνει φυλογενετικά και όχι στηριζόμενη σε βιοχημικές ιδιότητες, όπως π.χ. *Allococcus otis*, *Desemzia incenta*, *Dolosigranulum pigrum*, *Melissococcus plutonius*, *Clobicatella sanguinis* και *Ignavigranum nuoffiae*. Τα παραπάνω είδη συνεχώς αλλάζουν θέση στην ταξινόμηση των βακτηρίων, όσο περισσότερα στοιχεία γίνονται γνωστά γι' αυτά(4, 41).

1.1.2.8. Άλλα βακτήρια από γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα γένη *Brevibacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Propionibacterium* sp. και *Bifidobacterium* sp. είναι Gram+ βακτήρια (4).

Γένος *Brevibacterium* sp.

Η ταξινόμηση τους έχει υποστεί τελευταία πολλές αλλαγές. Είναι αποδεκτά σήμερα τουλάχιστον 11 είδη. Είναι αναερόβια και παράγουν λίγο ή καθόλου γαλακτικό από τον μεταβολισμό των σακχάρων. Ανιχνεύονται κυρίως στο δέρμα των ανθρώπων και στα γαλακτοκομικά προϊόντα (4).

Γένος *Micrococcus* sp.

Είναι αυστηρά αερόβια βακτήρια. Μετά από αρκετές αλλαγές στην ταξινόμηση σήμερα αναγνωρίζονται μόνο 3 είδη. Βρίσκονται σε διάφορα περιβάλλοντα όπως δέρμα των ανθρώπων, απόβλητα ποταμών, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα και κρεατοσκευάσματα (4).

Γένος *Propionibacterium* sp.

Τα είδη του γένους *Propionibacterium* sp. χωρίς να ανήκουν στα LAB, γιατί δεν παράγουν γαλακτικό οξύ κατά την ζύμωση των εξόζων χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων γιατί μετέχουν κατά την δευτερογενή ζύμωση (ενισχυτικά των starters) μεταβολίζοντας το γαλακτικό οξύ των LAB προς προπιονικό οξύ, οξεικό οξύ και CO₂, με σύγχρονη παραγωγή μικροποσοτήτων ηλεκτρικού οξέος (41).

Συμμετέχουν στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των γαλακτοκομικών προϊόντων. Σήμερα είναι γνωστά 11 είδη μερικά από τα οποία παράγουν βακτηριοσίνες (41).

Γένος *Bifidobacterium* sp.

Κύτταρα ραβδιόμορφα με ποικίλη εμφάνιση που είναι μονοστέλεχη ή διακλαδισμένη σχήματος V ή Y ή ακόμη μορφής ροπάλου ή μορφής σπάτουλας. Η μορφολογία τους επηρεάζεται από τη σύνθεση του υποστρώματος. Θετικά κατά Gram, με δύσκολη χρώση, που καθιστά εμφανή την ύπαρξη κοκκίων (granules) εντός των κυττάρων. Αναερόβια βακτήρια παράγουν γαλακτικό και οξεικό οξύ από την ζύμωση των σακχάρων (41).

Μικροποσότητες μυρμηγκικού οξέος, αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος σχηματίζονται κατά την ζύμωση, αλλά ποτέ CO₂ και βουτυρικό ή προπιονικό οξύ (41, 177). Η διάσπαση των σακχάρων γίνεται μέσω ειδικού σχήματος έτσι ώστε να μην μπορεί να χαρακτηριστεί ούτε σαν ομογαλακτική ούτε ετερογαλακτική. Το γενικό σχήμα της ζύμωσης είναι: (81, 178)

2 mol γλυκόζης \longrightarrow 3 mol οξεικού οξέος + 2 mol L+ γαλακτικού οξέος

Τα κύτταρα είναι αρνητικά ως προς την καταλάση. Το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξης κυμαίνεται από 25 έως 45° C. Οι κύριοι ξενιστές τους είναι ο πεπτικός σωλήνας των βρεφών κατά τη διάρκεια του θηλασμού, αλλά και των ενήλικων ανθρώπων και των ζώων (41).

Το λιγότερο 32 είδη και υποείδη είναι γνωστά σήμερα από τα οποία αρκετά χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων και ως προβιοτικά (4, 39, 178, 179, 180) (πίνακας 10). Εκείνα που ενδιαφέρουν την τεχνολογία τροφίμων είναι τα παρακάτω:

Bif. animalis,

Bif. breve,

Bif. infantis,

Bif. longum,

Bif. adofescentis,

Bif. lactis,

Bif.bifid

1.1.3. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

1.1.3.1. Γενικά περί προβιοτικών - Ορισμός

Στην παραγωγική διαδικασία παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης, τα οξύγαλακτικά βακτήρια επιλέγονται με βάση την ικανότητά τους να αναπτύσσονται, να παράγουν οργανικά οξέα στο γάλα και να προσδίδουν στα τελικά προϊόντα επιθυμητές φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες (1, 44, 45, 46), ενώ στην περίπτωση των προβιοτικών προϊόντων τα βακτήρια επιλέγονται κυρίως με βάση τις δυνατότητες να παρουσιάζουν ιδιότητες που να συνδέονται με την υγεία του οργανισμού πρωταρχικά αλλά συγχρόνως να παρουσιάζουν και όλα τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των LAB (30, 39).

Η λέξη probiotic είναι σύνθετη από τη λέξη pro που σημαίνει για και τη λέξη biotic που σημαίνει βιοτικός-ζωή. Δηλαδή προβιοτικά = για τη ζωή (181). Πρώτος ο Metchnikoff το 1908 αναφέρεται στη διατροφή των Βουλγάρων με γιαούρτι εμπλουτισμένο με στελέχη του γένους *Lactobacillus sp.* και στην παράταση του χρόνου ζωής τους για το λόγο αυτό.

Τα LAB αναφέρθηκαν ως προβιοτικά από τους Lilley et Stiwell το 1965. Ο Parker το 1974 επαναπροσδιορίζει τον ορισμό προβιοτικά ως «μικροοργανισμούς και συστατικά τα οποία συνεισφέρουν στη διατήρηση της φυσιολογικής ενότητας και ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας». Από τον Fuller το 1989 δόθηκε για τα προβιοτικά ο παρακάτω ορισμός «Προβιοτικά είναι ένα διατροφικό συμπλήρωμα αποτελούμενο από ζωντανή καλλιέργεια μικροβίων και το οποίο δρα ευεργετικά στον ξενιστή με το να βελτιώνει την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας εντός του σώματος».

Αυτή η διατήρηση ισορροπίας μικροχλωρίδας επιτυγχάνεται με τις ανασταλτικές ιδιότητες των προβιοτικών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να αποικίσουν τον εντερικό σωλήνα (24).

Σήμερα ως προβιοτικά ορίζονται «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται ασκούν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου πέραν της εγγενούς επίδρασης της γενικής διατροφής» (184). Ο ορισμός αυτός δεν προϋποθέτει μεταβολές της εντερικής χλωρίδας, δηλαδή αποίκηση του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος από τα προβιοτικά βακτήρια, καθώς θεωρείται ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να δράσουν ευεργετικά απλά διαβαίνοντας το πεπτικό σωλήνα. Προϋποθέτει όμως ότι οι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι ζωντανοί.

Επίσης δεν καθορίζει κάποιο συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων που πρέπει να καταναλώνονται ημερησίως, αλλά γενικά είναι αποδεκτό ότι πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον 10^6 - 10^8 κύτταρα/ml την ημέρα προκειμένου να έχουμε ευεργετικά αποτελέσματα (6, 185, 186, 187). Τέλος τα όποια ευεργετικά αποτελέσματα εφ' όσον υπάρχουν πρέπει να τεκμηριώνονται με καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους (188). Η κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας στο όργανο στόχος των LAB και των αιτιών δημιουργίας ενδεχόμενων προβλημάτων είναι σημαντικό προαπαιτούμενο (33) για την χρήση των προβιοτικών. Σταδιακά όμως ο ορισμός των προβιοτικών αλλάζει καθώς από νέα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι ακόμη και νεκρά κύτταρα προβιοτικών μικροοργανισμών είναι δυνατόν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία (189, 190, 191). Με αυτή την έννοια, ήδη πρέπει να αρχίσουμε να οριοθετούμε τα προβιοτικά του μέλλοντος (3, 54, 192).

Προκειμένου να σχεδιαστούν τα προβιοτικά του μέλλοντος πρέπει να διερευνηθούν λεπτομερέστερα τα κριτήρια επιλογής τους, επομένως να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών. Αυτό θα διευκολύνει στην επιλογή προβιοτικών με πιο εξειδικευμένα χαρακτηριστικά και άρα πιο εξειδικευμένες εφαρμογές, όπως π.χ. για συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες ή για συγκεκριμένες ομάδες ασθενών. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών είναι διαφορετική στο εντερικό επιθήλιο ανθρώπων διαφορετικής ηλικίας (189) και ότι επηρεάζεται από τη φυσιολογία του επιθηλίου ανάλογα με το αν ο άνθρωπος ασθενεί ή είναι υγιής (10).

Ως προβιοτικά χρησιμοποιούνται σήμερα διάφορα είδη και γένη μικροοργανισμών. Μεταξύ αυτών κυριαρχούν τα LAB και ειδικότερα τα είδη των γενών *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.* και *Bifidobacterium sp.* (3, 31, 39, 179, 193, 194). Τα LAB απαντώνται σε μεγάλους πληθυσμούς στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Άλλωστε ακόμη και σήμερα τα προβιοτικά βακτήρια καταναλώνονται κυρίως υπό μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων. Δεν είναι τυχαίο ότι οι ίδιες ομάδες βακτηρίων αποτελούν ταυτόχρονα σημαντικό τμήμα της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου. Η ασφάλεια των LAB – προβιοτικών έχει απασχολήσει ερευνητές αλλά και κρατικούς παράγοντες και το γενικό συμπέρασμα που έχει εξαχθεί είναι ότι δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι τα LAB εκτός από τα παθογόνα είδη και ενδεχομένως μερικά στελέχη του γένους *Enterococcus sp.* έχουν κάποιο παθογόνο δυναμικό ή ότι είναι δυνατόν να δημιουργήσουν προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό (3, 33, 195, 196).

1.1.3.2. Κριτήρια επιλογής LAB με προβιοτική δράση

Η επιλογή ενός μικροοργανισμού προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό στηρίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια όπως περιγράφονται στη συνέχεια (179, 180, 197). Οι μικροοργανισμοί πρέπει να μπορούν να επιβιώσουν στις συνθήκες του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος, άρα η ανθεκτικότητα τους σε χαμηλές τιμές pH, αλλά και έναντι των υδρολυτικών ενζύμων του πεπτικού σωλήνα και των χολικών αλάτων είναι σημαντική. Η ικανότητα προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο θεωρείται επίσης σημαντικό κριτήριο σε σχέση με την ικανότητα των οξυγαλακτικών είτε να εμποδίζουν τη προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών, είτε να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο έντερο και να λειτουργούν ανοσορρυθμιστικά (83, 198).

Η ικανότητα επιβίωσης και ανθεκτικότητας σε δυσμενείς συνθήκες των LAB ποικίλει. Φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από τα γαστρικά υγρά κυρίως υδροχλωρικό οξύ, αλλά και τα παγκρεατικά ένζυμα (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες και τη χολή), όσο και από τη διαδικασία παρασκευής των ίδιων των οξυγαλακτικών (10, 83, 198, 199, 200). Η ικανότητα προσκόλλησης εξαρτάται επίσης από τις συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους, τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και τη χρησιμοποίηση κρυοπροστατευτικών κατά τη λυοφιλίωση, προκειμένου να συντηρηθούν (201). Ικανότητες επιβίωσης και προσωρινής αποίκησης στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου έχουν παρουσιάσει αρκετά LAB (179, 202, 203).

Ταυτόχρονα, τα LAB πρέπει να είναι ασφαλή για τον άνθρωπο, αν και δεν είναι εύκολο να «μετρηθεί» η ασφάλεια μικροοργανισμών που γενικά δεν θεωρούνται παθογόνοι (3, 31, 33, 195). Η πρώτη κλινική μελέτη σε ανθρώπους είναι ίσως και η πρώτη πραγματική δοκιμασία της ασφάλειας ενός μικροοργανισμού, εν τούτοις σύμφωνα με έρευνες οι αντιβακτηριακές δραστηριότητες οι οποίες παρατηρούνται με *in vitro* δοκιμές, μπορούν να επιβεβαιωθούν και σε *in vivo* δοκιμές (204, 205, 206).

Τέλος, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να διαθέτουν καλό τεχνολογικό δυναμικό, δηλαδή να μπορούν να καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα, να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης να συμβάλλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των προϊόντων (207). Η βιοσιμότητα των προβιοτικών θεωρείται κριτήριο καθώς οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν γίνει με τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών και υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες τα ζωντανά κύτταρα είναι βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ανοσορρυθμιστικής δράσης (17, 183,

193). Παρ' όλα αυτά τελευταία ερευνάται η αντιμικροβιακή δράση νεκρών στελεχών LAB – προβιοτικών (189, 190, 191). Σε μια πρόσφατη καταγραφή που έγινε στις ΗΠΑ βρέθηκε ότι από τα 30 σκευάσματα που εξετάστηκαν τα 11 δεν περιείχαν ζωντανά κύτταρα, ενώ στη Μ. Βρετανία μόνο 6 στα 13 περιείχαν ζωντανά κύτταρα σε ικανοποιητικό επίπεδο (208, 209).

Τα στελέχη του *Lactobacillus sp.* είναι γενικά ανθεκτικά στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και ταυτόχρονα διαθέτουν τεχνολογικό δυναμικό. Έτσι εξηγείται η ευρεία χρήση τους ως προβιοτικά(210). Τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium sp.* αντίθετα είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο (αναερόβια) και έχουν μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται λιγότερο από τους γαλακτοβακίλλους (41).

Οι ιδιότητες των προβιοτικών πρέπει να παραμένουν σταθερές τόσο κατά τη διαδικασία παραγωγής του τροφίμου ή του σκευάσματος, όσο και κατά τη συντήρησή τους. Πολύ σημαντική είναι επίσης η καθαρότητα των προβιοτικών στελεχών. Έχουν αναφερθεί επιμολύνσεις σε προβιοτικά σκευάσματα. Τίθεται λοιπόν θέμα τήρησης των κανόνων υγιεινής κατά τη παρασκευή, αλλά και σωστής ταυτοποίησης των στελεχών (17, 183).

Κατά τον Fuller υπάρχουν πολλές αιτίες που συντελούν στην διαφοροποίηση της δράσης των προβιοτικών γεγονός που συχνά συντελεί στην μη αξιόπιστη αξιολόγηση των πειραματικών συμπερασμάτων. Αυτές είναι:

1. Μέθοδοι προπαρασκευής.
2. Συνθήκες συντήρησης-αποθήκευσης.
3. Ενδεχόμενη βακτηριακή επιμόλυνση.
4. Χαμηλή βιωσιμότητα.
5. Μη σωστή ταξινόμηση.
6. Καθεστώς εντερικού σωλήνα.
7. Συχνότητα δόσεων.
8. Φάση (ηλικία) ανάπτυξης του ξενιστή.
9. Δυνατότητα επιβίωσης στον εντερικό σωλήνα.
10. Αλλαγές διατροφικών συνηθειών.
11. Βαθμός stress του ξενιστή.

Εισαγωγή – LAB & Προβιοτικά

Όλα τα προβιοτικά στελέχη που κυκλοφορούν στο εμπόριο πρέπει να είναι καταχωρημένα σε μια διεθνώς αναγνωρισμένη συλλογή μικροοργανισμών, έτσι ώστε να είναι δυνατός ανά πάσα στιγμή ο έλεγχος της ταυτότητας και των ιδιοτήτων τους.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σήμερα ως προβιοτικά φαίνονται στους πίνακες 9 και 10.

Πίνακας 9: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (30, 33, 39)

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Άλλα LAB	Όχι LAB
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. reuterii</i>	<i>B. longum</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. crispatus</i>			
<i>L. gasseri</i>			

Πίνακας 10: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (179, 211)

<i>Lactobacillus sp.</i> (LAB)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>L.gasseri</i>
	<i>L.jonhonii</i>

Εισαγωγή – LAB & Προβιοτικά

	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	<i>L.helveticus</i>
	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
	<i>L.casei</i> subsp. <i>casei</i>
	<i>L.plantarum</i>
	<i>L.GG</i>
	<i>L.rhamnosus</i>
	<i>L.curvatus</i>
	<i>L.brevis</i>
	<i>L.fermentum</i> ,
	<i>L.reuterii</i> ,
	<i>L.cellobiosus</i>
<i>Lactococcus sp. .(LAB)</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>L.lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i>
<i>Leuconostoc sp. .(LAB)</i>	<i>Leuc.mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicus</i>
	<i>Leuc.mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Streptococcus sp. .(LAB)</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Enterococcus sp. .(LAB)</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>E.faecalis</i>
<i>Pediococcus sp. .(LAB)</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Propionibacterium sp.</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	<i>P.shermanii</i>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>B.infantis</i> , <i>B.longum</i>
	<i>B.breve</i> , <i>B.adolescentis</i>
Ζύμες	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>S.boulardii</i>

1.1.3.3. Τρόπος δράσης των LAB στην υγεία του ανθρώπου

α)Ρύθμιση της εντερικής χλωρίδας. Η βασική διαπίστωση για τη δράση των προβιοτικών ήταν η δυνατότητα να επηρεάζουν τη σύσταση της εντερικής χλωρίδας ευνοώντας την επικράτηση των ευεργετικών μικροοργανισμών έναντι των επιβλαβών, ιδιαίτερα όταν οι αρχικοί πληθυσμοί των πρώτων είναι χαμηλοί (51, 54).

Στελέχη των *L. paracasei*, subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri* που απομονώθηκαν από κόπρανα νεογέννητων, δοκιμάστηκαν στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να μεταβολίζονται στο γάλα και στη συνέχεια εξετάστηκαν με επιτυχή αποτελέσματα χορηγούμενα μέσα σε γαλακτοκομικά προϊόντα, για την ικανότητά τους να δημιουργούν ειδικές συνθήκες εγκαθιστάμενα στα κύτταρα του εντερικού σωλήνα εις βάρος παθογόνων βακτηρίων του εντέρου(212).

Εξ' άλλου είναι πλέον γνωστό ότι η παρουσία στελεχών LAB, όπως εκείνων του γένους *Lactobacillus* sp. είναι σημαντικότερη για τη διατήρηση του φυσιολογικού εντερικού μικροσυστήματος (50). Το γένος *Lactobacillus* sp. έχει παρουσιάσει ανασταλτικές δραστηριότητες έναντι της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων όπως *Listeria monocytogenes* (18, 162, 213, 214), *Escherichia coli* και *Salmonella* sp. (21, 22, 206) και άλλων βακτηρίων (83, 205, 215).

Τα επίπεδα των λιγότερο επιθυμητών βακτηρίων μειώνονται είτε εξ' αιτίας του ανταγωνισμού για διατροφικά στοιχεία αλλά και για σημεία προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο, είτε λόγω της παραγωγής μεταβολιτών με αντιμικροβιακή δράση (π.χ. οργανικά οξέα, βακτηριοσίνες, υπεροξειδίο του υδρογόνου) από τα προβιοτικά (54, 216).

Ο Heyman M. αναφέρει χαρακτηριστικά ότι «Η διέλευση των LAB δια του εντερικού σωλήνα, όπου επιτελείται η σημαντική λειτουργία της πέψης και της απορρόφησης, μπορεί να αποτελεί ένα χαρακτηριστικό πειραματικό μοντέλο μικροβιακού φράκτη έναντι της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων».

Πειράματα *in vitro* με LAB ανέστειλλαν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων υπεύθυνων για τροφικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων και της *S. typhimurium* (52). Φυσικά αντισώματα όπως η *bulgarica* που συντίθεται από τον *L.delbruckii* subsp. *bulgaricus* έδειξαν αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση κατά της *Salmonella* sp. (217).

Οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών στον εντερικό σωλήνα είναι οι παρακάτω: (24, 27, 28, 29, 218):

- Τα προβιοτικά LAB εγκαθίστανται στα κύτταρα του εντερικού σωλήνα εμποδίζοντας την σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων αυτών, των παθογόνων βακτηρίων (83, 219, 220).
- Αναστέλλεται ή περιορίζεται η αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών του εντερικού αυλού λόγω (5, 9, 39) :
 - α) Ανταγωνισμού με τα LAB για θρεπτικά συστατικά
 - β) Εκκρίσεων μεταβολιτών από τα LAB και
 - γ) Πτώσης του pH του εντερικού αυλού λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος από τα LAB
- Ενισχύεται ο επιθηλιακός φραγμός του εντερικού βλενογόνου και
- Τροποποιείται η ανοσορρύθμιση στην οποία μετέχει η εντερική μικροχλωρίδα ως σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού του εντέρου (27).

Η βιολογική δράση των LAB – προβιοτικών οφείλεται εν μέρει και στην ικανότητά τους να προσκολλώνται και να συνδέονται με τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Η προσκόλληση των LAB με τους υποδοχείς των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου σηματοδοτεί την αποστολή χημικού σήματος ώστε να ξεκινήσει η σύνθεση των κυτταροκινών (194).

Σε περιπτώσεις φλεγμονής του εντέρου οι αλληλοεπιδράσεις ξενιστή- μικροοργανισμών διαταράσσονται και η φλεγμονή συνοδεύεται από διατάραξη της ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας, με αποτέλεσμα οι ενδογενείς μικροοργανισμοί του εντέρου να επάγουν ανοσοαπόκριση (27).

Η θεραπεία με προβιοτικά στηρίζεται στην αποκατάσταση της μικροοικολογίας και της διαπερατότητας του εντέρου, στη βελτίωση της αμυντικής του λειτουργίας και στην εξάλειψη της φλεγμονώδους απόκρισης (51).

β) Βελτίωση κλινικών συμπτωμάτων σε περιπτώσεις δυσανεξίας στη λακτόζη. Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι μια πολύ συνηθισμένη κατάσταση που επηρεάζει ποσοστό < 70% του παγκόσμιου πληθυσμού (26) που όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί ασθένεια, αλλά δημιουργεί προβλήματα όταν παρουσιάζεται.

Σε ανθρώπους με έλλειψη β-γαλακτοζιδάσης, η λακτόζη του γάλακτος δεν αφομοιώνεται και οδηγεί σε αύξηση του οσμωτικού φορτίου στο λεπτό έντερο, με επακόλουθη έκκριση υγρών και άρα διάρροια (221).

Η βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων σε περιπτώσεις δυσανεξίας στη λακτόζη αναφέρεται συχνά από ερευνητές (222, 223, 224, 225, 226). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί και η γιαούρτη, που περιέχουν στελέχη LAB δημιουργούν λιγότερα προβλήματα και αυτό διότι αφ' ενός μεν διότι ένα μέρος της λακτόζης του γάλακτος έχει ήδη ζυμωθεί κατά την παρασκευή των προϊόντων αυτών, αφ' ετέρου δε διότι κατά τη πέψη τα ίδια τα βακτήρια λύονται και έτσι η β-γαλακτοζιδάση τους ελευθερώνεται στον πεπτικό σωλήνα (29, 226).

Επιπλέον, το αυξημένο ιξώδες των προϊόντων αυτών σε σχέση με το ίδιο το γάλα οδηγεί στην αύξηση του χρόνου διέλευσης της τροφής από το πεπτικό σωλήνα γεγονός που βοηθά στην πέψη της λακτόζης (54, 191).

γ) Θετική επίδραση στην αντιμετώπιση της οξείας γαστρεντερίτιδας προκαλούμενης από τον ρετροϊό. Ο Rotavirus είναι από τις πλέον συνηθισμένες αιτίες γαστρεντερίτιδας παιδιά στις ανεπτυγμένες χώρες (227). Μελέτες έχουν δείξει ότι επιλεγμένα προβιοτικά βακτήρια, όπως *L. rhamnosus* GG, *L.reuteri*, *L. casei shirota* και *L. lactis* Bb12, μειώνουν το χρόνο διάρκειας της διάρροιας κατά μέσο όρο από 3,5 έως 2,5 ημέρες σε νοσηλευόμενα παιδιά (23, 25, 228, 229, 230, 231).

Αρκετοί μηχανισμοί βρίσκονται ενδεχομένως πίσω από αυτό το αποτέλεσμα. Έχει παρατηρηθεί ότι μετά από χορήγηση προβιοτικών αυξάνεται η παραγωγή της ειδικής για τους Rotavirus IgA, μειώνεται η διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου και αποκαθίσταται η ισορροπία της εντερικής χλωρίδας (54, 229, 232, 233, 234, 235, 236).

Ο Isolauri E. και συνεργάτες έδειξαν ότι η ανοσολογική αντίδραση στον εμβολιασμό από το στόμα με ζωντανό στέλεχος rotavirus ήταν καλύτερη σε παιδιά που πήραν συμπλήρωμα *Lactobacillus* GG συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

Αν και οι θεραπευτικές ιδιότητες του *Lactobacillus* GG έχουν καλά θεμελιωθεί, δεν έχει ακόμα αποδειχτεί ότι μπορεί να προφυλάξει τον οργανισμό από την μόλυνση από rotavirus. Αντίθετα η στοματική χορήγηση δύο άλλων προβιοτικών *B. bifidum* και *S. thermophilus*, σε μελέτη 55 νεογνών σε νοσοκομείο μείωσε την εμφάνιση της διάρροιας (25). Σε 10 περιστατικά διάρροιας τα 7 οφείλονταν σε rotavirus.

Μελέτη σε βρέφη που σιτίζονταν με μπουκάλι στο Περού έδειξε ότι παρόμοια θετική επίδραση μείωσης της μη ιογενούς διάρροιας έχει και *Lactobacillus* GG (238).

Ο *L. acidophilus* έχει δοκιμαστεί και έχει αποδείξει τις θεραπευτικές του ιδιότητες στην οξεία διάρροια σε 2 μελέτες (25, 238). Ένα άλλο στέλεχος το οποίο εξετάστηκε για τις θεραπευτικές του ιδιότητες για την οξεία διάρροια ήταν και *Enterococcus faecium* SF 68/d. Σε μία μελέτη ασθενείς με οξεία διάρροια έλαβαν με τυχαία σειρά *Enterococcus* SF68/d (N=40) ή Placedo (N=38). Μετά από 1 μέρα, 5 ασθενείς στην πειραματική ομάδα θεραπεύτηκαν έναντι ουδενός στην ομάδα αναφοράς (239).

Σε έρευνα με χορήγηση τροφίμων GBF (Germinated Barley Food-stuff) που περιείχαν μείγμα προβιοτικών *Bifidobacterium sp.* και *Lactobacillus sp.* σε επίμυες με ελαιώδη κολίτιδα, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης κλινικά και ανατομοπαθολογικά (240).

Η ανάλυση έδειξε ότι οι νεαρότεροι ασθενείς στην πειραματική ομάδα θεραπεύτηκαν πιο γρήγορα από τους ασθενείς στην ομάδα αναφοράς. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των *Saccharomyces boulardii* και *E. faecium* SF68/d διαπιστώθηκε ελαχιστοποίηση της διάρκειας νόσησης σε περιπτώσεις παιδιών που προσβλήθηκαν από τον εντεροϊό Rotavirus (241).

Σε άλλη μελέτη 211 ενηλίκων με οξεία διάρροια η πρόσληψη *E. faecium* SF68/d μείωσε την διαρροϊκή φάση από 2.8 μέρες έως 1.7 μέρες (242).

δ) Ύφεση της διάρροιας που παρατηρείται μετά από την λήψη αντιβιοτικών

Στις περιπτώσεις που η διάρροια προκαλείται από λήψη αντιβιοτικών (Antibiotic Associated Diarrhoea, AAD), παρατηρείται υπερβολική ανάπτυξη του βακτηριδίου *Clostridium difficile*. Τα προβιοτικά μπορεί να σταματούν την ανάπτυξη αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών απελευθερώνοντας ανασταλτικά συστατικά όπως έχει αποδειχτεί για κάποια στελέχη (22, 54, 243, 244, 245, 246). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο *Lactobacillus GG* μπορεί να προφυλάξει από την διάρροια που προκαλείται από την χρήση αντιβιοτικών (236, 247).

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε 16 υγιείς ενήλικες ηλικίας 18-24 που τους χορηγήθηκε ερυθρομυκίνη για 7 μέρες. Οι 8 από αυτούς κατανάλωσαν 125 ml γιαούρτη εμπλουτισμένη με *Lactobacillus GG*, ενώ οι υπόλοιποι απλή γιαούρτη. Ο συνολικός αριθμός ημερών με διάρροια ήταν 2 μέρες για την ομάδα που έλαβε την εμπλουτισμένη γιαούρτη και 8 μέρες για την ομάδα που έλαβε την απλή γιαούρτη.

Σε δύο ακόμη μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η θεραπευτική δράση του *Lactobacillus GG* σε άτομα που είχαν προσβληθεί περιοδικά με *Clostridium difficile*, με συμπτώματα σοβαρή διάρροια και κολίτιδα, το συμπέρασμα ήταν ότι ο *Lactobacillus GG* συντέλεσε θετικά στην αποθεραπεία των προσβεβλημένων ατόμων (248, 249).

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η χορήγηση *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* μειώνει κατά 30 ως 50% τον κίνδυνο από αυτού του είδους τις διάρροιες. Παρεμπόδιση ή και θεραπεία της AAD έχει παρατηρηθεί και μετά από χορήγηση των προβιοτικών στελεχών *L. rhamnosus GG*, *L. acidophilus* και *Enterococcus faecium* SF68/d (239, 241, 250, 251, 252).

Τα συμπεράσματα από όλες τις μελέτες δείχνουν μία θετική δράση των προβιοτικών αλλά απαιτούνται παραπέρα μελέτες με μεγαλύτερα δείγματα πληθυσμού.

ε) Ύφεση της διάρροιας των ταξιδιωτών

Η διάρροια των ταξιδιωτών εμφανίζεται σε κατοίκους βιομηχανοποιημένων χωρών (Βορειοδυτικής Ευρώπης και ΗΠΑ) που ταξιδεύουν σε αναπτυσσόμενες ή τροπικές χώρες και οφείλεται κυρίως σε εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) στελέχη της *E. coli*. Διαρκεί 24-48 ώρες και επηρεάζει το 20-50% των ταξιδιωτών (252). Η προφύλαξη με την χρήση προβιοτικών αποτελεί μία ασφαλή εναλλακτική λύση στα αντιβακτηριδιακά φάρμακα.

Σε δύο μελέτες ερευνήθηκε το κατά πόσο ο *Lactobacillus GG* μπορεί να αποτρέψει την διάρροια των ταξιδιωτών. Σε ομάδα 820 ταξιδιωτών στην Τουρκία σε 2 διαφορετικά παραθεριστικά κέντρα εμφανίστηκε διάρροια στο 43% του δείγματος αναφοράς και στο 38% της ομάδας που τους χορηγήθηκε συμπλήρωμα προβιοτικών.

Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακά στο ένα από τα δύο κέντρα με ποσοστά εμφάνισης διάρροιας 40% στο δείγμα αναφοράς και 24% στο πειραματικό(253).

Αναφέρεται επίσης ότι σε τυχαία μελέτη με ένα εικονικό φάρμακο και ένα μείγμα από *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και στελέχη του γένους *Bifidobacterium sp.* σε 94 Δανούς τουρίστες που συμμετείχαν σε ταξίδι 2 εβδομάδων στην Αίγυπτο η συχνότητα της διάρροιας των ταξιδιωτών μειώθηκε από 71% σε 43% (36).

Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες που θα λαμβάνουν υπόψη τους την υποδομή του τόπου προορισμού αλλά και την προγενέστερη κατάσταση υγείας των εθελοντών(253).

στ) Συμβολή στα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου.

Με τον όρο ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD) χαρακτηρίζονται δύο αλληλοεπικαλυπτόμενοι κλινικά φαινότυποι, η ασθένεια του Crohn (Crohn's Disease, CD) και η ελκώδης κολίτιδα (ulterative colitis, UC), οι οποίοι προσβάλλουν κυρίως το κόλον και το λεπτό έντερο (CD). Παρ' ότι η αιτιολογία των ασθενειών αυτών είναι αρκετά διευκρινισμένη, πιστεύεται ότι τόσο η γενετική προδιάθεση η οποία οφείλεται σε πολυμορφισμούς NOD2/CARD15, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή ικανότητα κάθαρσης διεισδυτικών βακτηρίων και ανεπαρκή παραγωγή αμυντικών ουσιών, όσο και η διαταραχή της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας μεταξύ ωφέλιμων και δυνητικά παθογόνων βακτηρίων, η οποία καθορίζει την κατάσταση ομοιόστασης του εντερικού βλεννογόνου έναντι της φλεγμονής, παίζουν σημαντικό ρόλο (180, 209, 257).

Η διαταραχή της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου ιδιαίτερα του κόλου με διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες όπως την παρουσία παθογόνων βακτηρίων (254), τη λήψη αντιγόνων με τη διατροφή (3), και με την κατάποση βλαβερών ουσιών (247, 255) οδηγεί σε δυσλειτουργία του εντερικού συστήματος. Η τροποποίηση της σύνθεσης της εντερικής χλωρίδας είναι δυνατόν να οδηγήσει σε βελτίωση της κλινικής εικόνας (29, 34, 255).

Στελέχη των *Lactobacillus sp.* και *Bifidobacterium sp.* τα οποία έχουν ήδη μακρά και δοκιμασμένη ιστορία στον τομέα της τεχνολογίας των τροφίμων, και παραδοσιακά συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία των προβιοτικών, θεωρούνται θεραπευτική λύση, έναντι των ανωτέρω αιτιολογικών παραγόντων.

Αρκετά στελέχη από τα παραπάνω έχουν ως στόχο να αποτρέψουν την προσκόλληση, εγκατάσταση, αναπαραγωγή και τη μολυσματικότητα ειδικών εντεροπαθογόνων βακτηρίων (256).

Στελέχη του *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus plantarum* χρησιμοποιήθηκαν για να προφυλάξουν φλεγμονώδεις αλλαγές σχετιζόμενες με εντεροκολίτιδα σε ποντικούς (257).

Η χορήγηση γαλακτοβάκιλων προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης στο έντερο μυελοπεροξυδάσης, η οποία σχετίζεται με φλεγμονές, παράλληλα δε, μείωσε την παρουσία εντερικών μικροοργανισμών σε εκτός εντέρου περιοχές (257, 258).

Σε έρευνα με χρήση στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.* (*L. casei* και *L. acidophilus*) σε λυοφιλοποιημένη μορφή, χορηγούμενων per os σε ασθενείς με περιπτώσεις βακτηριακής

υπερανάπτυξης σχετιζόμενης με το σύνδρομο «χρόνιας διάρροιας», διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη μείωση της διαρροϊκής διάθεσης και της ποσότητας των κοπράνων (258).

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η χορήγηση προβιοτικών όπως π.χ. του *L.rhamnosus GG* και του *L.salivarius* UCC 118, αλλά και του *S. cerevisiae (boulardii)* μειώνει τη συχνότητα των υποτροπών και αυξάνει τη διάρκεια των περιόδων ύφεσης σε περιπτώσεις ιδιοπαθών φλεγμονών του εντέρου (180, 209, 257, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265).

Τα στελέχη *Lactobacillus salivarius* UCC 118, *Bifidobacterium longum* και *Bif. infantis* 35624 εξετάστηκαν κάτω από πειραματικές συνθήκες σε in vivo δοκιμές σε πειραματόζωα (επίμυες) και σε ανθρώπους, σε περιπτώσεις φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, όσον αφορά την δυνατότητα διόδου του γαστρεντερικού σωλήνα, την αποίκιση σε αυτόν και την εμφάνιση θετικών επιδράσεων.

Τα αποτελέσματα ήταν άκρως ενθαρρυντικά, δεδομένης της μείωσης της παρατηρούμενης φλεγμονής και της ταχείας επαναφοράς της διαταραχθείσας ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας(200).

ζ) Αντιμεταλλαξιόγonos και αντικαρκινική δράση

Η αιτιολογία του καρκίνου του εντέρου ποικίλει, αλλά φαίνεται ότι η διαίτα παίζει έναν σημαντικό ρόλο (266). Δίαιτες πλούσιες σε κρέας και λιπαρά και φτωχές σε φυτικές ίνες ενοχοποιούνται μεταξύ άλλων και για την αλλαγή της σύστασης της εντερικής χλωρίδας και πιο συγκεκριμένα για την αύξηση των γενών *Bacteroides sp.* και *Clostridium sp.* και τη μείωση των *Bifidobacterium sp.* (267, 268).

Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με την αύξηση ενζυμικών παραγόντων όπως η β-γλυκουρονιδάση, η αζωρεδουκτάση, η ουρεάση και η νιτρορεδουκτάση. Τα ένζυμα αυτά μετατρέπουν προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες και συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του εντέρου. Έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση του *L. acidophilus* αλλά και των *Bifidobacterium sp.* μειώνει την ενεργότητα των ενζύμων αυτών (179, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278).

Μία υπόθεση σχετικά με τον μηχανισμό πρόληψης ή καθυστέρησης της ανάπτυξης του όγκου από τους γαλακτοβάκιλους είναι και αυτός της πιθανής δέσμευσης μεταλλαξιόγνων συστατικών στο έντερο, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την μειωμένη τους απορρόφηση από τον οργανισμό και συγχρόνως την αυξημένη απέκρισσή τους στα ούρα (279, 280, 281).

Σύμφωνα με ερευνητές, αρκετά στελέχη των γενών *Lactobacillus sp.* και *Enterococcus sp.* παρουσιάζουν αξιόλογο αντιμεταλλαξιγόνο δράση (282).

Σε έρευνα με σκοπό την διαπίστωση της αντιμεταλλαξιγόνο δράσης των *S.salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* έναντι γνωστών μεταλλαξιγόνων τα αποτελέσματα ήταν θετικά (283).

Επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά LAB σχετίζεται με μικρά ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του εντέρου (268). Τα προβιοτικά συνδέονται ακόμη και με θετικές επιδράσεις για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (284, 285).

Αναφέρεται ότι γάλα ζυμωμένο με προβιοτικά *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO 3533, *L. lactis sp. lactis* IFO 12546 και *E. faecalis* παρουσιάζει αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε γνωστά μεταλλαξιγόνα (286).

Συμπερασματικά αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η πρόληψη γαλακτοβάκιλων μπορεί να μειώσουν την απορρόφηση μεταλλαξιγόνων συστατικών από την πεπτική οδό. Αν αυτό βοηθά στην αποφυγή ή την μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου είναι κάτι που απαιτεί παραπέρα διερεύνηση (286).

Τέλος μελέτες έδειξαν ότι ένα ευρύ φάσμα LAB παρουσίασε μια σημαντική προστατευτική δράση πάνω στο DNA των κυττάρων των ποντικών που εκτέθηκαν σε καρκινογόνα σκευάσματα. Τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη της προσθήκης προβιοτικών σε τροφές σαν μέσο πρόληψης της εμφάνισης καρκίνου και αναστολής της δράσης διαφόρων καρκινογόνων ουσιών (270, 287, 288).

η) Επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα

Υπάρχουν αποδείξεις ότι γιαούρτη ζυμωμένο με ζώντα LAB δρα κατά στελεχών των *Salmonella sp.* με αξιόλογα αποτελέσματα ακολουθώντας πιθανούς μηχανισμούς: α) με την ενεργοποίηση των PP. μονοπύρηνων κυττάρων, δράση που είναι συνδεδεμένη με την παραγωγή IgA αντισωμάτων, β) με την αύξηση του αριθμού των φαγοκυττάρικών μακροφάγων, και γ) με την σημαντική αύξηση της παραγωγής και της δράσης των κυττάρων του σπλήνα (F-cell και B-cell mitogens, όπως τα ConA LPS (289, 290).

Χορήγηση ζώντων LAB έχει δείξει αντιβακτηριακή δράση κατά της *Salmonella sp.* αρκετά πιο σημαντική απ' ό,τι η χορήγηση ειδικών αντισωμάτων.

Υπάρχουν αποδείξεις ότι το οξυγαλακτικό βακτήριο *S. salivarius* subsp. *thermophilus* είναι δυνατόν να προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-1-beta και TNF-alpha κυτοκινών (291).

Στοματική χορήγηση συμπληρωματικής τροφής που περιείχε τα οξυγαλακτικά βακτήρια *L. acidophilus*, *L. casei* και *L. plantarum* ενεργοποίησε επίσης την παραγωγή IL-1 και TNF-alpha κυτοκινών (291).

Τα προβιοτικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο – κλειδί στις φυσιολογικές ιδιότητες της ενδογενούς εντερικής μικροχλωρίδας που επηρεάζει την σωστή ανάπτυξη και εξέλιξη του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου και παρουσιάζουν ενδιαφέροντα δραστηριότητα στο να διαφοροποιούν αρκετές λειτουργίες του λεμφικού ιστού του γαστρεντερικού σωλήνα (290).

Ερευνητές αποδεικνύουν ότι η χορήγηση LAB επηρεάζει σημαντικά τον γαστρεντερικό σωλήνα και δρα ενισχυτικά στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου (24, 27, 236, 292).

Σε έρευνα, ομάδα εθελοντών κατανάλωσε ζυμούμενο γάλα που περιείχε στελέχη *Bifidobacterium sp.* και *L. acidophilus* για περίπου 3 εβδομάδες κατά την διάρκεια των οποίων υπήρχε ελεγχόμενη μόλυνση – επαφή με *S. typhi*, σε τρόπο ώστε να υπάρξει προσομοίωση με εντεροπαθόγνο λοίμωξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση στον τίτλο εξειδικευμένων αντισωμάτων IgA σε αντίθεση με την ομάδα των μαρτύρων (247).

Η ανοσομετατροπή (immunomodulatory activity) που προκαλείται από τα LAB είναι αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος. Οξυγαλακτικά βακτήρια όπως ο *L.rhammosus GG* και το *Propconibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii SS* έχουν δείξει μια ανοσομετατροπική ιδιότητα εξαρτώμενη από τη δόση και τη διάρκεια χορήγησης αυτών, πάνω σε αναπαραγωγικές σειρές B & T τύπου λεμφοκυττάρων σε πειράματα σε επίμυες (293, 294).

Μελέτες έδειξαν ότι τα LAB είναι ικανά να ευαισθητοποιήσουν και να πυροδοτήσουν την παραγωγή κυτοκινών και NO (οξειδίο του αζώτου) από μακροφάγα και πιθανόν άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (295).

Τέλος πληθώρα μελετών έδειξαν στενή σχέση χορήγησης LAB και θετικής επίδρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα (296, 297, 298, 299, 300).

θ) Άλλες επιδράσεις

Νεότερα δεδομένα αρχίζουν σταδιακά να φανερώνουν ένα νέο πεδίο δράσης των προβιοτικών. Σε έρευνα διαπιστώθηκε μία σημαντική μείωση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων της πνευμονίας σε παιδιά με κυστική ίνωση, στα οποία είχε χορηγηθεί συμπλήρωμα *Lactobacillus GG*, συγκρινόμενα με ομάδα ελέγχου (301).

Ο Ribeiro A. (1998) έδειξε ότι η χρησιμοποίηση προβιοτικών από παιδιά σε παιδικό σταθμό μείωσε την συχνότητα εμφάνισης αναπνευστικών παθήσεων.

Πρόσφατα έχει αναδειχθεί (303) ένας μηχανισμός διέγερσης της αντίδρασης των αντισωμάτων σε άτομα που είχαν προσβληθεί από τον ιό της γρίπης ή είχαν εμβολιαστεί με εμβόλιο (303). Ο μηχανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε μόνο για τις καλλιέργειες προβιοτικών με στελέχη *L. plantarum* και *Lactobacillus GG*.

Τέλος ο Jung L.K. (1999) έδειξε ότι ο *Lactobacillus GG* προκαλούσε σε ενήλικες μία καλύτερη αντίδραση παραγωγής αντισωμάτων σε εμβόλιο για τύφο συγκριτικά με ομάδα αναφοράς.

Η διάρροια είναι μια συνήθης και επικίνδυνη επιπλοκή σε ασθενείς που λαμβάνουν την τροφή τους με τη βοήθεια ρινογαστρικού καθετήρα και η οποία έχει πολυπαραγοντική αιτιολογική φύση. Σε έρευνα διαπιστώθηκε ότι η λήψη προβιοτικών σε παρόμοιες καταστάσεις είναι δυνατόν να τροποποιήσει την εντερική μικροχλωρίδα και να περιορίσει την εκδήλωση της διάρροιας (305).

Σε περιπτώσεις παιδικών διαρροιών διαφόρου αιτιολογίας έχει βρεθεί ότι στελέχη του *Lactobacillus GG* χορηγούμενα, παρέχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στον περιορισμό της διάρροιας (306).

Έχει επίσης αποδειχθεί η δραστηριότητα του *L. plantarum 299v* και *Lactobacillus GG* σε παιδιά με υπερανάπτυξη των βακτηριδίων που βρίσκονται στο λεπτό έντερο (262). Έρευνα με αντικείμενο τη διερεύνηση της υποθετικής πρότασης ότι η παρουσία *Bifidobacterium lactis*, θα προσφέρει σωματική μείωση της βακτηριακής μετακίνησης σε περιπτώσεις «συνδρόμου του παχέος εντέρου» σε πειράματα, έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα (307).

Σε μελέτη (meta-analysis) διαφόρων πειραματικών και κλινικών πρωτοκόλλων, τα δεδομένα έδειξαν ότι τα διάφορα είδη του γένους *Lactobacillus sp.* είναι απολύτως ασφαλή και εξαιρετικά αποτελεσματικοί ως θεραπευτική λύση σε περιπτώσεις παιδιών με συμπτώματα οξείας διαρροϊκής λοίμωξης (308).

Αναφέρεται ότι η περιγεννητική κατανομή συγκεκριμένων εξωγενών προς τον οργανισμό βακτηρίων και συγκεκριμένα LAB – προβιοτικών μειώνει στο ήμισυ την επακόλουθη παρουσία κληρονομικού ατοπικού εκζέματος σε βρέφη, τα οποία ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου ως προς την εμφάνιση του τελευταίου (309).

Μέχρι σήμερα η χρήση των προβιοτικών στοχεύει το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και τη μικροχλωρίδα του. Θεωρητικά, κάθε μέρος του ανθρώπινου που διαθέτει χλωρίδα θα μπορούσε να αποτελέσει πεδίο δράσης για τα προβιοτικά.

Η στοματική κοιλότητα διαθέτει μια αρκετά πολύπλοκη χλωρίδα, κάποια μέλη της οποίας δημιουργούν προβλήματα όπως τερηδόνα και περιδοντίτιδα. Έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση γιαούρτης μειώνει τους *mutans* στρεπτόκοκκους που ευθύνονται για την τερηδόνα (310).

Η φυσιολογική χλωρίδα του ουρογεννητικού συστήματος είναι λιγότερο πολύπλοκη σε σχέση με αυτή της στοματικής κοιλότητας και του εντέρου. Υπάρχουν όμως περίπου 50 διαφορετικά είδη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επικρατούν γαλακτοβακίλλοι που παράγουν H₂O₂ (311).

Η διατάραξη της χλωρίδας των γαλακτοβακίλλων έδειξαν μείωση των υποτροπών τέτοιων λοιμώξεων. Η παραγωγή H₂O₂ και τασενεργών ουσιών από τους γαλακτοβακίλλους φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο σ' αυτό (312).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει άμεση συσχέτιση της λήψης λειτουργικών τροφίμων που περιέχουν LAB, με την βελτίωση ή και την πρόληψη των κλινικών σημείων σε λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος (256).

Ο *L. casei* subsp. *shirota* είναι ένα από τα πιο γνωστά προβιοτικά που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά. Έχουν δημοσιευτεί κλινικές μελέτες με πειραματόζωα που του αποδίδουν αντιμικροβιακή, ανοσορυθμιστική και αντικαρκινική δράση. Ο ίδιος λακτοβάκιλλος παρεμποδίζει την ανάπτυξη της *E. coli* σε περιπτώσεις ουρολοίμωξης και μειώνει τη δριμύτητα της διάρροιας από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 (313, 314).

Στοματική χορήγηση του *L. casei* subsp. *shirota* διεγείρει την ανοσοαπόκριση μέσω των Th1 λεμφοκυττάρων και παρεμποδίζει την έκταση των καρκινωμάτων (313). Ο *L. casei* subsp. *shirota* χορηγούμενος σε αρουραίους επιμολυσμένους με *L. monocytogenes* ενισχύει τη κυτταρική ανοσοαπόκριση αυτών (315).

1.2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το κύριο ερώτημα που τέθηκε για την εκπόνηση αυτής της εργασίας και στο οποίο κληθήκαμε να απαντήσουμε ήταν: «Παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον η αναζήτηση αυτόχθονων (άγριων) στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων στην περιοχή μας (περιοχή Ηλείου) που να δεικνύουν αξιόλογη οξυγαλακτική και προβιοτική δράση και συγκρινόμενα με γνωστά (referens) στελέχη να διαφοροποιούνται θετικά από αυτά;».

Το γενικό αυτό ερώτημα εμπεριείχε, σαν γνήσιο υποσύνολο μια άλλη σειρά, επί μέρους ερωτημάτων όπως:

α) Γιατί να αναζητηθούν άλλα στελέχη πέραν των ήδη υπαρχόντων;

β) Που θα έπρεπε να αναζητηθούν αυτά τα στελέχη;

γ) Τι είδους στελέχη θα ήταν σκόπιμο να αναζητηθούν;

δ) Τα βακτηριακά στελέχη που θα προκύψουν από την αναζήτηση θα πληρούν τα βασικά τεχνολογικά δεδομένα ως προς την οξυγαλακτική τους δράση;

ε) Έναντι ποιών παθογόνων βακτηρίων θα δοκιμαστεί η προβιοτική (αντιβακτηριακή) δράση των στελεχών που θα ανευρεθούν.

στ) Ποιοι είναι οι παράγοντες στους οποίους οφείλεται η ενδεχόμενη προβιοτική δράση των στελεχών αυτών;

Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε έτσι ώστε να απαντά ικανοποιητικά στα βασικά αυτά ερωτήματα.

Σκοπός της εργασίας αυτής δεν ήταν να εντοπιστούν ένα ή μερικά οξυγαλακτικά βακτήρια που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως εξαιρετικά σε σχέση με την προβιοτική και οξυγαλακτική τους δράση.

Ο κίνδυνος στην περίπτωση αυτή εξ άλλου θα ήταν τα βακτήρια που ενδεχομένως ανευρεθούν να είναι τεχνολογικά ακατάλληλα για περαιτέρω καθαρισμό και επεξεργασία ή να προκαλούν νοσολογικές καταστάσεις σε περίπτωση χορήγησής τους.

Ο σκοπός μας είναι η συνολική μελέτη των αυτόχθονων οξυγαλακτικών βακτηρίων που θα προκύπτουν από την αναζήτηση δε διαφορετικά οικοσυστήματα και η αντιμετώπισή τους σαν ένα ενιαίο σύνολο το οποίο θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί περαιτέρω.

Με αυτό το πρίσμα εξ άλλου θα αντιμετωπιστεί και η σύγκριση που θα γίνει με τα γνωστά (referens) πρωτότυπα βακτήρια.

Στη συνέχεια παρατίθεται αναλυτικά το σκεπτικό της αντιμετώπισης των επί μέρους ερωτημάτων που παραπάνω περιληπτικά αναφέρθηκαν.

α) Το 1908 ο Metchnikoff αναφερόταν γενικά και αόριστα στα οξυγαλακτικά βακτήρια και τη προβιοτική δράση τους. Αργότερα αρκετοί ερευνητές σε πιο προχωρημένες ερευνητικές εργασίες ασχολήθηκαν με τα είδη των γενών των οξυγαλακτικών βακτηρίων π.χ. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* κ.α.

Σήμερα που η γνώση συσσωρεύτηκε και η έρευνα έφθασε σε υψηλά σημεία εξειδίκευσης, γίνονται συχνές αναφορές όχι απλώς σε γένη αλλά σε συγκεκριμένα στελέχη LAB π.χ. *Lactobacillus acidophilus* 1108 (7), *Lactobacillus plantarum* NC DO 1193 (135), *L. salivarius* UCC 118 (200), *Enterococcus faecium* SF 68/d (242). Αυτό αποδεικνύει μια εξαιρετικά λεπτομερή και εξειδικευμένη έρευνα και διαρκή αναζήτηση νέων στελεχών και μελέτη των οξυγαλακτικών και προβιοτικών ιδιοτήτων τους.

Σύμφωνα με τους Holzapfel et Schillinger (2001), όταν λαμβάνουμε υπ' όψη το ευρύ φάσμα των πιθανά ικανών για ζύμωση βακτηρίων και τις διαφορετικές συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στελέχη αυτά μπορούν να προκληθούν για «λειτουργική δράση» τόσο οξυγαλακτική όσο και προβιοτική, είναι ξεκάθαρο ότι η επιλογή νέων στελεχών αποτελεί μια συναρπαστική πρόκληση και για την επιστήμη και για τη βιομηχανία.

Με γνώμονα τις παραπάνω παρατηρήσεις τέθηκαν οι βάσεις της παρούσας ερευνητικής εργασίας, της οποίας σκοπός ήταν η αναζήτηση αυτόχθονων στελεχών LAB από παραδοσιακά γαλακτοκομικά τρόφιμα της περιοχής Ηπείρου (μιας έντονα κτηνοτροφικής περιοχής της χώρας μας) και από άλλες πηγές και η μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης τους.

β) Πεποίθησή μας είναι, η οποία στηρίζεται σε βιβλιογραφικές αναφορές (35, 36, 37, 38, 188, 316, 317, 318) ότι τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά τρόφιμα της χώρας μας αποτελούν ένα κοινό τόπο και ένα ενδιαφέρον πλούσιο σε αυτόχθονα οξυγαλακτικά βακτηριακά στελέχη, πέραν της προστιθέμενης αρχικής καλλιέργειας (non starter lactic acid bacteria) η οποία παίζει το ρόλο του εκκινητού (starter culture).

Τα νέα LAB από τους ερευνητές αναζητώνται παντού. Ως οικοσυστήματα αναζήτησης αναφέρονται πεδία με τεράστιες προοπτικές έρευνας όπως π.χ. τα ζυμούμενα φυτικά και γαλακτοκομικά προϊόντα, το νερό, τα απόβλητα, τα κόπρανα, η ανθρώπινη μικροχλωρίδα (4,

17, 41, 81, 83). Σαν χαρακτηριστικό παράδειγμα εξειδικευμένου πεδίου αναζήτησης αυτόχθονων στελεχών *Lactobacillus sp.* αναφέρονται τα κόπρανα ατόμων από τη Ν. Ζηλανδία (319).

Τα τρόφιμα και ειδικά εκείνα που έχουν υποστεί ζύμωση, είναι άριστα παραδείγματα πεδίων μικροβιακής οικολογίας (188, 318).

Με οδηγό τις παραπάνω διαπιστώσεις για την εκπόνηση της εργασίας αυτής αναζητήθηκαν παραδοσιακά παρασκευασμένα τυριά προερχόμενα από γάλα αιγών και προβάτων, τα οποία καταναλώνονται από αγροτικές οικογένειες που οι ίδιες τα παρασκευάζουν και τα διαθέτουν εκτός εμπορίου.

Παράλληλα εξετάστηκε γάλα απαστερίωτο πριν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των ανωτέρω προϊόντων προερχόμενο από αίγες, πρόβατα και αγελάδες.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν παραδοσιακές καλλιέργειες χωρίς περαιτέρω επεξεργασία που παρασκευάζονται από το ήνυστρο αμνοεριφίων, συμπεριλαμβανομένου και του εντερικού περιεχομένου αυτού (πυτιές), προερχόμενες από ορεινές περιοχές της Ηπείρου. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν και κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών (320, 321).

γ) Σύμφωνα με τα τεχνολογικά δεδομένα παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων (322) συχνά απαιτούνται θερμοκρασίες για την επώαση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας την έναρξη της πήξης και τον χειρισμό του πήγματος περί τους 41°-45° C. Παράλληλα πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι συχνά στην χώρα μας παρατηρούνται κατά το θέρους θερμοκρασίες που άπτονται των 40°-42° C.

Τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι θα έπρεπε να αναζητηθούν θερμόφιλα στελέχη, που θα έχουν την δυνατότητα να παραμένουν ζώντα κατά το στάδιο παρασκευής των γαλακτοκομικών προϊόντων, ώστε να μπορούν να αποικίσουν ή να προσκολληθούν απλώς στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου μετά την κατανάλωση των προϊόντων και να αποδώσουν τις προβιοτικές δράσεις τους (24, 83, 179, 198, 202).

δ) Για τον έλεγχο *in vitro* της οξυγαλακτικής δράσης των στελεχών που θα απομονώνονται προβλέφθηκαν δοκιμές (322) ελέγχου παραγωγής γαλακτικού οξέος και δυνατότητας πήξης του γάλακτος.

ε) Για τον έλεγχο της προβιοτικής δράσης των παραπάνω στελεχών σχεδιάστηκε να μελετηθεί η αντιβακτηριδιακή δράση των κατά τεσσάρων στελεχών του γένους *Salmonella sp.*. Η επιλογή για τα παθογόνα αυτά στελέχη εδράζεται στη διαπίστωση ότι τα στελέχη της

Salmonella sp. είναι το συχνότερο αίτιο γαστρεντερίτιδας της παιδικής ηλικίας στη χώρα μας, με πρωταγωνιστές τους μη παρατυφικούς οροτύπους των σαλμονελλών και από αυτούς πρώτη, ως προς τη συχνότητα, τη *S. enteritidis* και δεύτερη την *S. typhimurium* (323). Οι απομονώσεις των παραπάνω οροτύπων είναι πολύ κοινές στη χώρα μας κυρίως σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (324, 325, 326). Εξ άλλου στον τομέα της υγιεινής των τροφίμων η ισχύς των μοντέλων που χρησιμοποιούνται στην μικροβιολογία πρόβλεψης είναι κοινά αποδεκτή και παθογόνοι μικροοργανισμοί συχνόι στα τρόφιμα, όπως στελέχη της *Salmonella sp.* τυγχάνουν εξαιρετικού ενδιαφέροντος (33).

στ) Η προβιοτική (αντιβακτηριδιακή) δράση εκάστου εκ των στελεχών LAB σχεδιάστηκε ούτως ώστε να μελετηθούν (in vitro) οι επιδράσεις των παρακάτω παραγόντων.

1) Του ίδιου του βακτηριακού κυττάρου, σαν σύνολο πολυπαραγωγικό αφ' ενός και αφετέρου σαν οντότητα με συγκεκριμένες φυσιολογικές δράσεις (κυτταρικός ανταγωνισμός).

2) Του υπερκείμενου υγρού που προέρχονται από την φυγοκέντρηση θρεπτικού υποστρώματος πλούσιου σε αποικίες του υπό εξέταση στελέχους, ώστε να διαπιστωθεί η αντιβακτηριακή δράση των βακτηριοσινών που συγκεντρώνονται στο υγρό αυτό, μετά την απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων.

3) Του παραγόμενου από το στέλεχος γαλακτικού οξέος.

Το παραπάνω σκεπτικό εδράζεται στις παρατηρήσεις ερευνητών που θεωρούν αυτούς τους τρεις παράγοντες από τους σπουδαιότερους για την αντιμικροβιακή δράση των στελεχών LAB (5, 9, 39). Τα αποτελέσματα των παραπάνω ελέγχων μετά από επεξεργασία και μελέτη θα μας οδηγήσουν στο συμπέρασμα, αν υπάρχει ή όχι αξιόλογη προβιοτική δράση σε αυτόχθονα άγρια στελέχη που αναζητήθηκαν από παραδοσιακά κυρίως προϊόντα (γαλακτοκομικά) και αν αυτά παρουσιάζουν ενδιαφέρον για περαιτέρω παρατήρηση. Τα δεδομένα που θα προκύψουν από την αναζήτησή μας και που θα μελετηθούν θα συγκριθούν με τα δεδομένα γνωστών, ήδη μελετηθέντων (referens) βακτηριακών στελεχών, τα οποία θα υποστούν τις ίδιες ακριβώς δοκιμασίες. Τέλος θα μελετηθεί η ευαισθησία των στελεχών που θα προκύψουν από την αναζήτησή μας, με γνωστά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, δεδομένου ότι η αντοχή των στελεχών στην επίδραση των αντιβιοτικών που χορηγούνται σε περιπτώσεις λοιμώξεων είναι ιδιαίτερα επιθυμητό χαρακτηριστικό, γιατί σε σύγχρονη χορήγηση αντιβιοτικών και προβιοτικών στελεχών, τα τελευταία θα πρέπει να διατηρούνται ζώντα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Συνολικά εξετάστηκαν (120) δείγματα, που χωρίζονται στις εξής κατηγορίες και υποκατηγορίες (*Πίνακας 11*):

α. Τρόφιμα:

Τα δείγματα προέρχονται από:

- Πρόβειο γάλα απαστερίωτο προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου
- Αίγειο γάλα απαστερίωτο προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου
- Γάλα βόειο απαστερίωτο προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου
- Τυρί «φέτα» παραδοσιακά παρασκευασμένο από πρόβειο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου
- Τυρί άλμης παραδοσιακά παρασκευασμένο από αίγειο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου.

β. Παραδοσιακές καλλιέργειες «εκκινητές» γαλακτικής ζύμωσης «starter»

Αυτές παρασκευάστηκαν από το ήνυστρο αμνοεριφίων, συμπεριλαμβανομένου και του εντερικού περιεχομένου αυτού («πτυές»), προερχόμενες από ορεινές περιοχές της Ηπείρου.

γ. Ανθρώπινα περιττώματα:

Τα δείγματα προέρχονται από παιδιά ηλικίας 1 – 3 ετών και συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2001-2003.

Πίνακας 11: Προέλευση δειγμάτων για εξέταση.

α/α	Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
α	Τρόφιμα	
	Απαστερίωτο πρόβειο γάλα προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου	20
	Απαστερίωτο αίγιο γάλα προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου	10
	Απαστερίωτο γάλα βόειο προέλευσης ορεινών περιοχών της Ηπείρου	10
	Παραδοσιακά παρασκευασμένο τυρί «φέτα» από πρόβειο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου	20
β	Παραδοσιακά παρασκευασμένο τυρί άλμης από αίγιο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου	20
	Παραδοσιακές καλλιέργειες «εκκινητές» γαλακτικής ζύμωσης «starter», («πυτιές»)	20
γ	Ανθρώπινα περιττώματα	
	Ατόμων ηλικίας 1 – 3 ετών	20
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		120

2.1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

1. Mann Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Oxoid)

2. MRS broth (Oxoid)
3. Brain Heart Infusion Broth (Merck)
4. Nutrient Broth (Merck)
5. Coloumbia agar (Merck)
6. Αίμα προβάτου, το οποίο λήφθηκε υπό στείρες συνθήκες και τοποθετήθηκε σε φιάλη με αντιπηκτικό υγρό
7. L.S. Differential (Fluka Biochemica)
8. Litmus milk medium (Fluka Biochemica)
9. SIM (Bekton Dickinson)
10. Bile eculin agar (Difco)
11. Todd–Hewitt broth (THB) (Difco, Becton Dickinson)
12. Decarboxylase Medium (Difco)
13. Αργινίνη (Arginine - Remel, Lexena)
14. Μανιτόλη (Mannitol - Remel, Lexena)
15. Αραβινόζη (Arabinose - Remel, Lexena)
16. Σορβόζη (Sorbose - Sigma)
17. Μελομπιόζη (Melibiose - Sigma)
18. Τρεχαλόζη (Trehalose - Sigma)
19. Σαλικίνη (Salicin - Sigma)
20. Σορβιτόλη Sorbitol (Remel, Lexena)
21. Σουκρόζη (Susrose - Remel, Lexena)
22. Λακτόζη (Lactose - Remel, Lexena)
23. Ραφινόζη (Raffinose - Remel, Lexena)
24. Ινουλίνη (Inulin - Remel, Lexena)
25. Triple Soya Broth (Oxoid)
26. Trypticase Soy Broth (Oxoid) εμπλουτισμένο με Yeast Extract (TSYE)
27. Mueller – Hinton II agar (Becton, Dickinson, Cockeysville, Md.)
28. Glucoze (γλυκόζη, Merck)

2.1.3 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Υγρό ομογενοποίησης του δείγματος.

Για τα δείγματα γάλακτος και τυριού χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ομογενοποίησης το πεπτονούχο νερό G. Για τα δείγματα ανθρώπινων περιττωμάτων χρησιμοποιήθηκε το αραιωτικό μέσο PBS, pH 7,5

2. Oxgall (Ox-Bile LP0055, Oxoid)
3. Φαινόλη (Phenol, Sigma, St. Louis., MO, USA)
4. Λυσοζύμη (Lysozyme, Sigma, St. Louis., MO, USA)
5. Δείκτης (Ιώδες της βρωμοθυμόλης, Merck)
6. Καταλάση (Catalase enzyme, Sigma)
7. H₂O₂ (Sigma)
8. Αντιδραστήριο Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma)
9. Methylene blue (0,1 %) (Sigma)
10. NaCl (Merck)
11. NaOH (Merck)
12. KCl Merck)
13. HCl (Merck)
14. Κιτρικό οξύ (Citric acid, Merck)
15. Na₂HPO₄ Merck)
16. Καθαρή αλκοόλη (absolute ethanol, Merck)
17. BBL™ DrySlide™ PYR Kit (BBL™)
18. API 50 CHL Medium (API-BioMerieux, France)
19. API 20 SREPT και Rapid ID32 Strep Apitests microsystem (API-BioMerieux, France)
20. «Κάρτα» απομόνωσης του συστήματος«κάρτας» απομόνωσης του συστήματος Vitek 2 (BioMerieux, France)
21. Γαλακτικό οξύ (Fluka Biochemica)

2.1.4 ΛΟΙΠΑ ΥΛΙΚΑ

1. Τρυβλία petri χωρητικότητας 20 ml μιας χρήσης.
2. Σιφόνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα για μικροβιολογική χρήση και χωρητικότητα από 1 ml έως 11 ml.
3. Στείρες ευρύστομες φιάλες ή στείρα ποτήρια ζέσης.
4. Στείρο ψαλίδι.
5. Σακούλες για τον ηλεκτρικό ομογενοποιητή τύπου Stomacher.
6. Φιάλες αραιώσης με βιδωτό πώμα βαθμολογημένες για όγκο 100ml.
7. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000μl).
8. Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα 10-100μl και μπλε 100-1000μl για τις παραπάνω πιπέτες.
9. Σιφόνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0,1ml έως 11ml.
10. Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10 ml.
11. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες.
12. Χάρτινοι δίσκοι (3 MM Chr filter paper disk, διαμέτρου 6,35 mm, Whatman[®] International)
13. Φίλτρα διήθησης με οπές διαμέτρου, 20-25μm και 0,45μm
14. Φίλτρα διήθησης με οπές διαμέτρου 0,2 μm
15. Αυτόματη συσκευή διήθησης ύδατος.
16. Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
17. Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
18. Σωλήνες durham
19. Συστήματα συνθηκών αναεροβίωσης (Gas – Pack anaerobic system, BBL; Cockeysville, Maryland)
20. Μετρητής της τιμής του pH (WTW PH meter, Germany)
21. Φωτόμετρο (συσκευή μέτρησης της O.D.
22. Σύστημα Vitek 2 - Compact (BioMerieux, France)
23. Αυτόματη συσκευή διήθησης ύδατος.
24. Αναδευτήρας τύπου Vortex (GENIE-2).
25. Ζυγός ακριβείας με ευαισθησία 0,1gr.
26. Ηλεκτρικός ομογενοποιητής τύπου Stomacher τύπου IYL (929/470/CE 2004).

27. Υδατόλουτρο.

28. Επωαστικός θάλαμος (IPS DIAGNOSTICS Pasteur).

29. Φυγόκεντρος.

30. Στατιστικά πρωτόκολλα επεξεργασίας των αποτελεσμάτων: [Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson - Ανάλυση διασποράς of Variance (ANOVA)]

Χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία σε θερμοκρασία 2-4°C και καταψύκτες σε θερμοκρασία -20°C για την διατήρηση των διαφόρων αντιδραστηρίων και δειγμάτων, επιτραπέζια χρονόμετρα για την τήρηση του χρόνου, συσκευή παροχής απεσταγμένου νερού και συσκευή απιονισμένου νερού και διάφορα γυάλινα σκεύη.

Ανάλογα με το είδος του δείγματος που πρόκειται να εξετασθεί έγινε και ο κατάλληλος χειρισμός του.

2.1.5 ΠΡΟΤΥΠΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.5.1 Στελέχη αναφοράς (references) οξυγαλακτικών βακτηρίων

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη αναφοράς (references) οξυγαλακτικών βακτηρίων:

- στέλεχος *L. plantarum*, (DSM No.: 16365)
- στέλεχος *L.paracasei subsp. paracasei* (ACA – DC 022), το οποίο προσφέρθηκε ευγενικά από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- στέλεχος *E.faecium* (ACA-DC 0225), το οποίο προσφέρθηκε ευγενικά από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- στέλεχος *E.faecalis* (ACA-DC 0240), το οποίο προσφέρθηκε ευγενικά από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- τρία στελέχη, γνωστά ως ανθεκτικά στελέχη αναφοράς ως προς την ανθεκτικότητά τους στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, *S.aureus* ATCC 2593 και NCTC 6571 και *E.coli* ATCC 25922

2.1.5.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα παθογόνα μικροβιακά στελέχη του γένους *Salmonella sp.* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα έρευνα με στόχο να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των επιλεγμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα εξής: *S.typhi* (ATCC 19430), *S.typhimurium* (ATCC 13311), *S.arizonae* (ATCC 25922), *S.enteritidis* (ATCC 13076).

2.1.6 ANTIBIOTIKA ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ANTIBIOΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma υπό τη μορφή σκόνης (powder), εκτός από το αντιβιοτικό Vancomycin, το οποίο χρησιμοποιήθηκε επίσης και υπό τη μορφή δίσκων των 30 µg προερχόμενοι από την εταιρεία Oxoid (Hampshire England).

Τα αντιβιοτικά έχουν ως εξής:

- Vancomycin (30 µg) Oxoid (Hampshire England)
- Penicillin G (Sigma)
- Ampicillin (Sigma)
- Tetracycline (Sigma)
- Gentamycin (Sigma)
- Amoxicillin plus Clavulanic Acid (Sigma)
- Teicoplanin (Sigma)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Απαστερίωτο γάλα:

Αρχικά διενεργήθηκε επιμελής ανάμειξη του γάλακτος με κατάλληλο αναδευτήρα για να εξασφαλισθεί ομοιογένεια σε ολόκληρη τη μάζα της εξεταζόμενης ποσότητας. Αμέσως μετά την πλήρη ανάμειξη λήφθηκε με το δειγματολήπτη δείγμα των 100 ml, το οποίο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο δειγματοληψίας.

Τυρί:

Τεμάχια βάρους 50g το καθένα, λήφθηκαν άσηπτα από 5 διαφορετικά σημεία από τεμάχιο τυριού άλμης και «φέτας» συνολικού βάρους 4 κιλών. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο συλλέκτη, στον οποίο προστέθηκε επαρκής ποσότητα άλμης, για να καλύπτει το τυρί. Πριν από την ανάλυση το δείγμα εξήχθη από την άλμη και τοποθετήθηκε πάνω σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για 1 ώρα στο ψυγείο.

Ανθρώπινα περιττώματα:

Ανθρώπινα περιττώματα, προερχόμενα από παιδιά ηλικίας 1 – 3 ετών, βάρους 100g τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες.

Παραδοσιακά κατασκευασμένες καλλιέργειες, «εκκινητές» γαλακτικής ζύμωσης «starter», («πυτιές»):

Λήφθηκαν άσηπτα ολόκληρα τεμάχια παραδοσιακά κατασκευασμένων καλλιιεργειών («πυτιές») βάρους 200 – 250 g, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους γυάλινους περιέκτες.

2.2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.2.2.1 Τεχνική χειρισμού και ομογενοποίησης των δειγμάτων

Η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο των αναλύσεων έγινε με τη βοήθεια φορητού ψυγείου. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν την ίδια μέρα. Τα δείγματα όταν τούτο δεν ήταν δυνατό, διατηρήθηκαν σε ψυγείο θερμοκρασίας 2-4° C. Συντηρητικές ουσίες δεν χρησιμοποιήθηκαν σε καμία περίπτωση.

Απαστερίωτο γάλα: Το κάθε δείγμα αναμειχθηκε καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 1 min). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, λήφθηκε η απαραίτητη ποσότητα και ομογενοποιήθηκε με το αραιωτικό υγρό. Στη συνέχεια λήφθηκαν με στείρο σιφόνιο 10ml και μεταφέρθηκαν σε φιάλη αραιώσης που περιέχει 90ml υγρού ομογενοποίησης (πεπτονούχο νερό G). Ακολούθησε έντονη ανακίνηση της φιάλης με το χέρι σε τόξο 30-35 cm επί 1 min. Η ομογενοποίηση του δείγματος με το μέσο ομογενοποίησης έγινε με τέτοιες αναλογίες ώστε να προκύψει αραιώση του δείγματος 1:10. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκε η πρώτη αραιώση του δείγματος (10^{-1}).

Τυρί: Από διάφορα σημεία του κάθε δείγματος συλλέχθηκαν ασηπτικά τεμάχια συνολικού βάρους 100g και μεταφέρθηκαν σε στείρα ευρύστομη φιάλη, όπου με τη βοήθεια στείρου ψαλιδιού, λεπτοτεμαχίστηκαν. Από το δείγμα ζυγίστηκαν απευθείας σε αποστειρωμένη σακούλα, ειδική για συσκευή ομοιογενοποίησης τύπου Stomacher O, 50 g και ομογενοποιήθηκαν με 450 ml υγρού μέσου (πεπτονούχο νερό G).

Η ομογενοποίηση έγινε με την τεχνική Stomacher O. Όταν το δείγμα χρειάζονταν περισσότερο χρόνο για να ομογενοποιηθεί, τότε γινόνταν ενδιάμεση διακοπή στη λειτουργία του οργάνου για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.

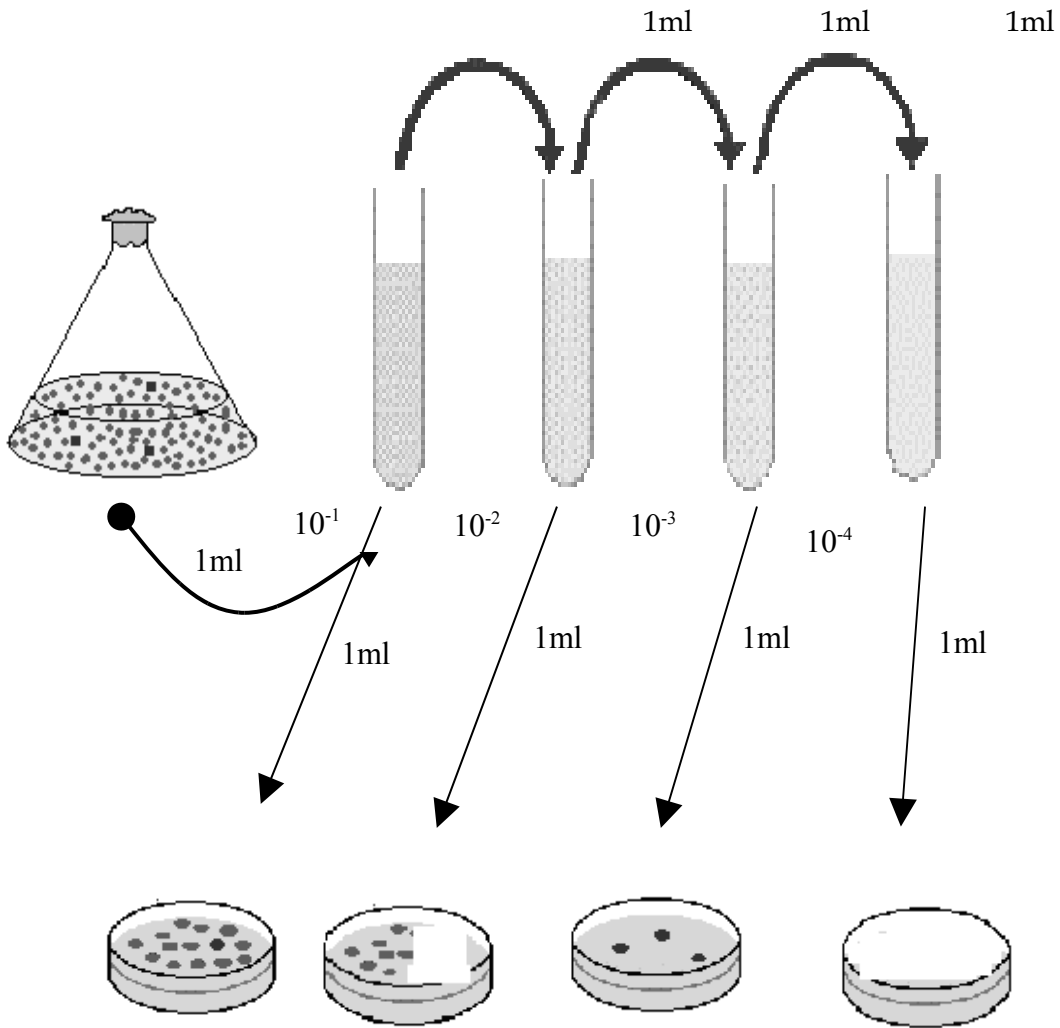
Ανθρώπινα περιττώματα: Από κάθε δείγμα κοπράνων τοποθετήθηκαν 1 g αυτών σε γυάλινο αποστειρωμένο σωλήνα που περιέχει 9 ml PBS, pH:7,5. Ακολούθησε ανάδευση του σωλήνα με τη βοήθεια Vortex για 1 min. Στη συνέχεια ο γυάλινος σωλήνας τοποθετήθηκε σε φυγόκεντρο και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Στο πέρας της διαδικασίας της φυγοκέντρωσης συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό.

Παραδοσιακά κατασκευασμένες καλλιέργειες, «εκκινητές» γαλακτικής ζύμωσης «starter», («πυτιές»): Από διάφορα σημεία του κάθε δείγματος συλλέχθηκαν ασηπτικά τεμάχια συνολικού βάρους 100g και μεταφέρθηκαν σε στείρα ευρύστομη φιάλη, όπου, με τη βοήθεια στείρου ψαλιδιού, λεπτοτεμαχίστηκαν. Από το αντιπροσωπευτικό αυτό δείγμα ζυγίστηκαν απευθείας σε αποστειρωμένη σακούλα, ειδική για συσκευή ομοιογενοποίησης τύπου Stomacher O, 50 g και ομογενοποιήθηκαν με 450 ml υγρού μέσου (πεπτονούχο νερό G). Η ομογενοποίηση έγινε με την τεχνική Stomacher O. Όταν το δείγμα χρειάζονταν

περισσότερο χρόνο για να ομογενοποιηθεί, τότε γίνονταν ενδιάμεση διακοπή στη λειτουργία του οργάνου για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.

2.2.2.2 Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

- Μετά την ομοιογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της αραιώσεως 1:10 έγιναν οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (1:100, 1:1000 κ.λ.π.) με μεταφορά 1 ml σε 9 ml Ringer's solution. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις μέχρι τη 10^{-4} .
- Η μεταφορά της ποσότητας του δείγματος από τον ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον επόμενο έγινε με το κατάλληλο ογκομετρικό σιφώνιο, με κατάλληλους χειρισμούς ώστε να μην έρθει σε επαφή με το αραιωτικό υγρό του δοκιμαστικού σωλήνα στον οποίο μεταφέρθηκε το υλικό του, ούτε να αδειάζεται η τελευταία σταγόνα με φύσημα του σιφωνίου.
- Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας, αμέσως με τη μεταφορά του δείγματος από τον προηγούμενο ανακινήθηκε με την χρήση κυκλομίκτη.
- Όλες οι αραιώσεις παρασκευάστηκαν εντός χρόνου 15 min από τη στιγμή της ομοιογενοποίησης του δείγματος (Σχήμα 1).



Επώαση στους 37°C και 45°C για 48 ώρες

Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και σποράς στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα.

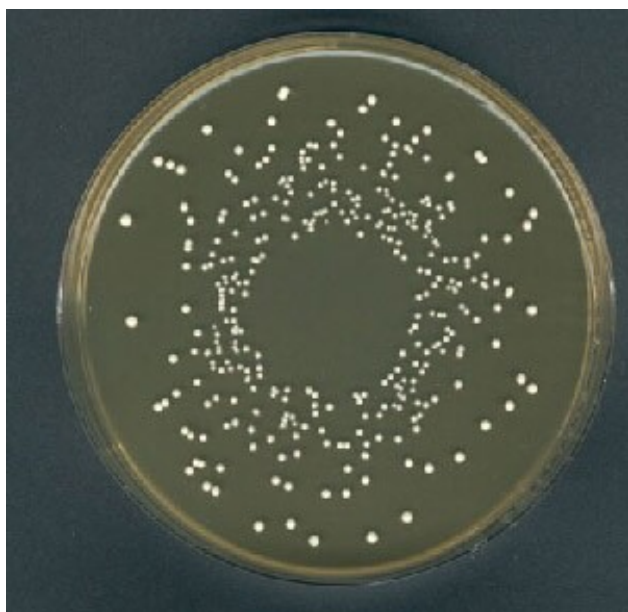
2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (LAB)

2.2.3.1 Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.*

Στην έρευνά μας για την απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε MRS Agar. Προετοιμάστηκαν τρυβλία Petri με υπόστρωμα που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί. Η επιφάνεια του υποστρώματος ξηράνθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C για 30 min και τα τρυβλία ενοφθαλμίστηκαν επιφανειακά, με τη βοήθεια κεκκαμένης γυάλινης ράβδου, με 0,1 – 0,2 ml από τις αντίστοιχες αραιώσεις. Τοποθετήθηκαν για 2 ώρες στον επωαστικό κλίβανο ώστε να στεγνώσει καλά το ενοφθάλμισμα και στη συνέχεια δημιουργήθηκε στιβάδα επικάλυψης από το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C και 45°C για 48 ώρες.

Η ταυτοποίηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactobacills* έγινε σύμφωνα με τις δικλίδες του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9th Edition, 1986). Από τις χαρακτηριστικές αποικίες κάθε τρυβλίου (Εικόνα 1) έγιναν παρασκευάσματα χρώσης κατά Gram. Οι αποικίες που παρουσίαζαν κατά τη μικροσκόπηση, Gram (+) βακτηρίδια μέσου μήκους και διαμέτρου, μεμονωμένα, ανά δυάδες ή σε αλύσους, εξετάστηκαν ως προς το αποτέλεσμα που δίνουν στη δοκιμή καταλάσης, οξειδάσης και παραγωγής αερίου από τη ζύμωση της γλυκόζης. Οι χαρακτηριστικές αποικίες διατηρήθηκαν σε ζωμό Brain heart infusion Broth στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C.

Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Lactobacills sp.* έγινε η χρήση συστημάτων API 50 CHL Medium σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας (API-BioMerieux, Vitek Inc. France). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τις δικλίδες της βάση δεδομένων του συστήματος (Minitab version 12.0).



Εικόνα 1: Απεικόνιση τυπικών αποικιών στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.* στην επιφάνεια MRS Agar

2.2.3.2 Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του γένους *Enterococcus sp.*

Για την απομόνωση των στελεχών του γένους *Enterococcus sp.* και τη διαφοροποίηση αλλά και απομόνωση στελεχών του γένους *Streptococcus sp.* που ανήκουν στο group D χρησιμοποιήθηκαν οι δικλείδες του σχήματος του Facklam (Facklam scheme) (327, 328). Προετοιμάστηκαν τρυβλία Petri έχοντας ως θρεπτικό υπόστρωμα Αιματούχο Άγαρ (Blood Agar) με ναλιδιζικό οξύ (0,01%) (ως ανασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης στελεχών της Οικογένειας *Enterobacteriaceae*) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επίστρωση του εξεταζόμενου δείγματος από τις διάφορες αραιώσεις με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης, όπως έχει προαναφερθεί στο παράγραφο 2.2.3.1 «Μέθοδοι απομόνωσης των στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.*».

Τα τρυβλία επώστηκαν στους 37°C και 45°C για 48 ώρες. Από τις χαρακτηριστικές αποικίες κάθε τρυβλίου έγιναν παρασκευάσματα Gram χρώσης.

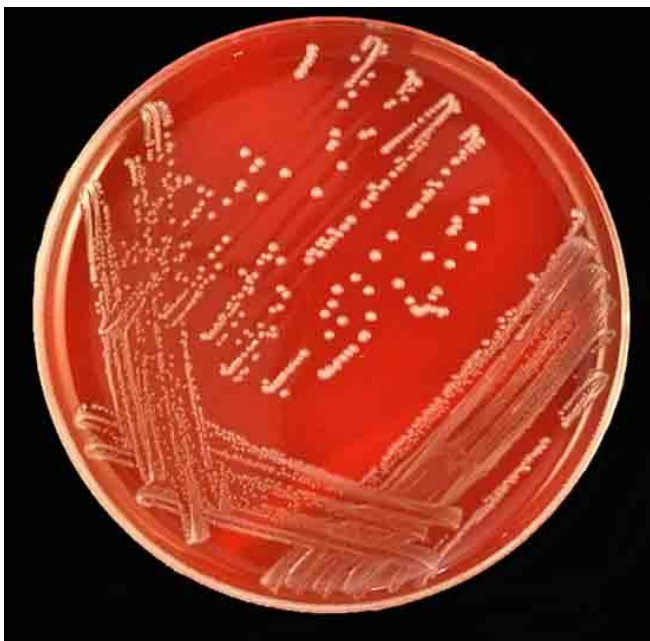
- Στη συνέχεια επιλέχθηκαν Gram (+) κόκκοι, οι οποίοι έδωσαν τη δοκιμή της καταλάσης αρνητική και ενοφθαλμίστηκαν σε ειδικά εκλεκτικά υγρά ή στερεά θρεπτικά υποστρώματα όπως παρουσιάζεται παρακάτω και καταγράφηκε η συμπεριφορά τους όπως αναφέρεται στη συνέχεια (327, 328, 329).

- Παραγωγή οξέους από τη ζύμωση της γλυκόζης με τη χρήση του Man, Rogosa και Sharpe ζωμό (MRS Broth).
- Ενεργότητα της porrolidonylarylamidase, η οποία προσδιορίστηκε τη χρήση του PYR Kit της εταιρείας BBL (βλέπε στο παράρτημα βιοχημικές δοκιμές)
- Ανθεκτικότητα στη παρουσία 40 % χολής στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, η οποία προσδιορίζεται με τη χρήση του Bile Esculine agar.
- Εμφάνιση ανάπτυξης στο θρεπτικό υπόστρωμα THB, το οποίο περιέχει 6.5 % NaCL.
- Προσδιορισμός κινητικότητας (βλέπε στο παράρτημα βιοχημικές δοκιμές)
- Αποδόμηση της αργινίνης (βλέπε στο παράρτημα βιοχημικές δοκιμές)

Τέλος εκτελέστηκαν δοκιμές για το προσδιορισμό της ζύμωσης των εξής υδρογονανθράκων:

μανιτόλη, σορβιτόλη, σορβόζη, ιουλίνη, αραβινόζη, μελομπιόζη, σουκρόζη, ραφινόζη, λακτόζη, τρεχαλόζη και σαλικίνη (βλέπε στο παράρτημα βιοχημικές δοκιμές).

- Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Enterococcus sp.* έγινε η χρήση συστημάτων API 20 SREPT microsystem και Rapid ID32 Strep Apitests, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας (API-BioMerieux, Marcy l'Etoile, France).
- Τέλος έγινε η χρήση του συστήματος απομόνωσης και ταυτοποίησης VITEK 2 (bio-Mérieux) και συγκεκριμένα η χρήση της «κάρτας» απομόνωσης του συστήματος (330, 331).
- Οι χαρακτηριστικές αποικίες διατηρήθηκαν σε ζωμό Brain heart infusion Broth στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C .



Εικόνα 2: Ανάπτυξη χαρακτηριστικών αποικιών στελεχούς του είδους *Enterococcus faecium* στην επιφάνεια αιματούχο άγαρ.

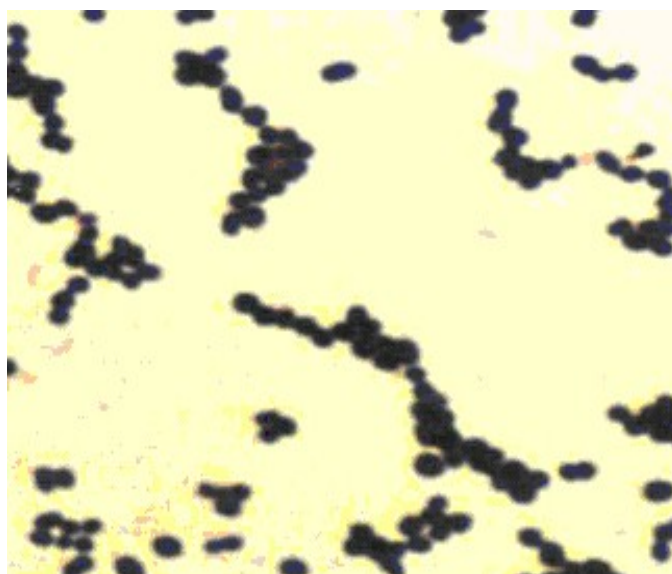
2.2.3.3 Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* και *Pediococcus sp.*

Στην έρευνά μας για την απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* και *Pediococcus sp.* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε MRS Agar και Αιματούχο Άγαρ (Blood Agar) με ναλιδιζικό οξύ (0,01%). Τα τρυβλία Petri με τα υποστρώματα, όπως επίσης και ο ενοφθαλμισμός επιφανειακά πραγματοποιήθηκε όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 2.2.3.1. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών του γένους *Lactococcus sp.* παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με αυτά του γένους *Streptococcus sp.*

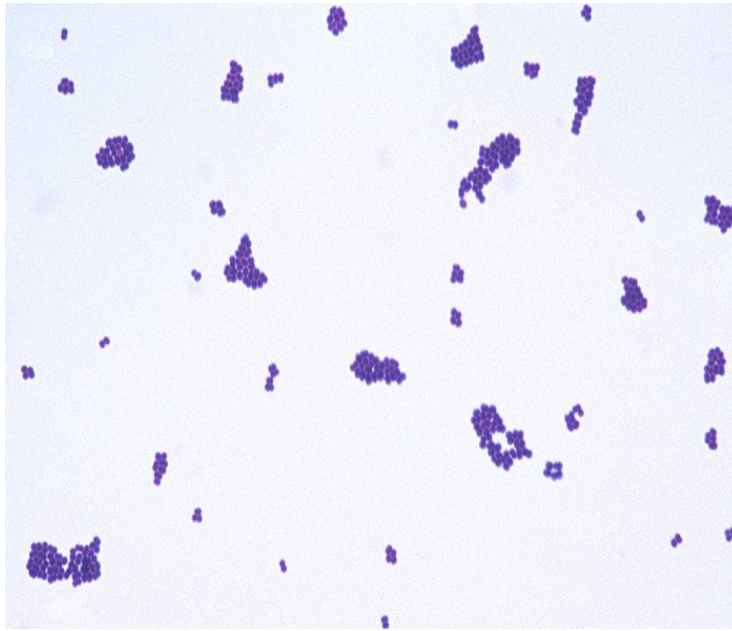
Από τις χαρακτηριστικές αποικίες κάθε τρυβλίου μετά από την πραγματοποίηση χρώσεων Gram οι αναυρεθέντες Gram (+) κόκκοι εισήλθαν στις εξής δοκιμές:

Δοκιμή της καταλάσης, δοκιμή της οξειδάσης, παραγωγή αερίου κατά την ανάπτυξή τους σε MRS broth, ανάπτυξη ή όχι στους 10°C και 45°C, έλεγχος ανθεκτικότητας παρουσία βανκομυκίνης, έλεγχος ανθεκτικότητας παρουσία 6.5 % NaCL, έλεγχος παραγωγής και ενεργότητας της pyrrrolidonylarylamidase (βλέπε στο παράρτημα βιοχημικές δοκιμές).

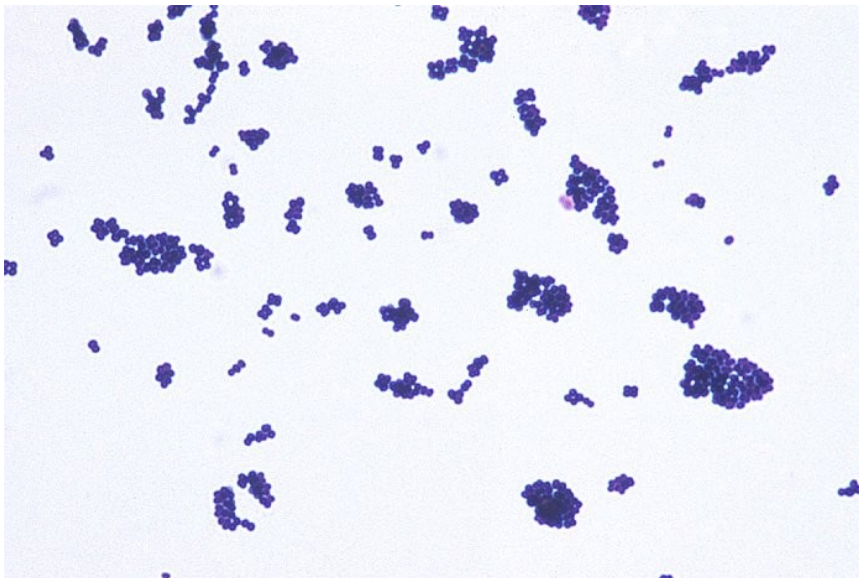
Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Lactococcus sp.* έγινε η χρήση συστημάτων API 20 SREPT microsystem και API SO CHL Medium σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας (API-BioMerieux, France). Οι χαρακτηριστικές αποικίες διατηρήθηκαν σε ζωμό Brain heart infusion Broth στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C .



Εικόνα 3: Εμφάνιση κυττάρων στελεχών του γένους *Lactococcus sp.* κατά τη μικροσκόπηση μετά την εκτέλεση χρώσης κατά Gram.



Εικόνα 4: Εμφάνιση κυττάρων στελεχών του γένους *Pediococcus* *sp.* κατά τη μικροσκόπηση μετά την εκτέλεση χρώσης κατά Gram.



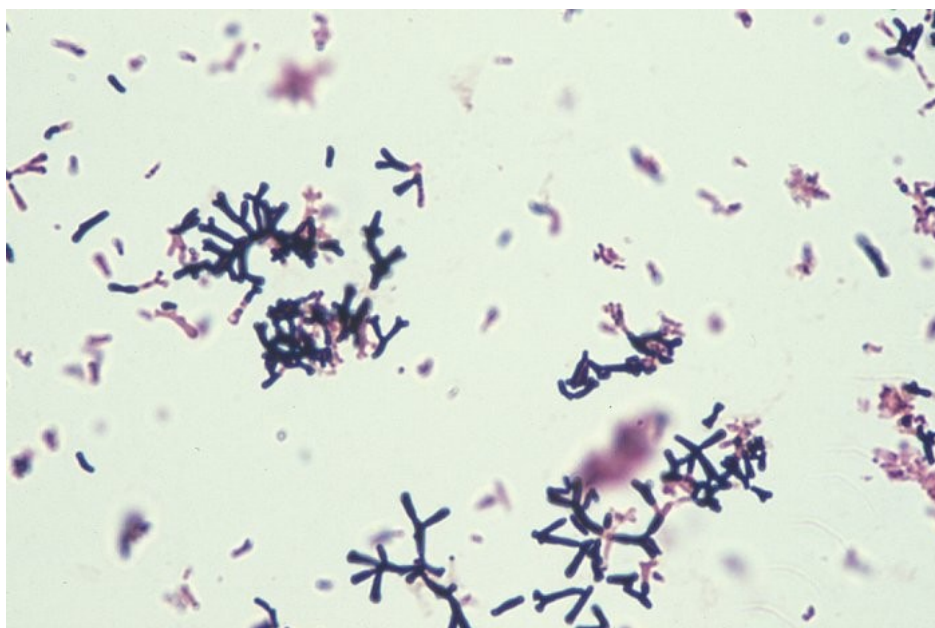
Εικόνα 5: Εμφάνιση κυττάρων στελεχών του γένους *Leuconostoc* *sp.* κατά τη μικροσκόπηση μετά την εκτέλεση χρώσης κατά Gram.

2.2.3.4 Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του γένους *Bifidobacterium sp.*

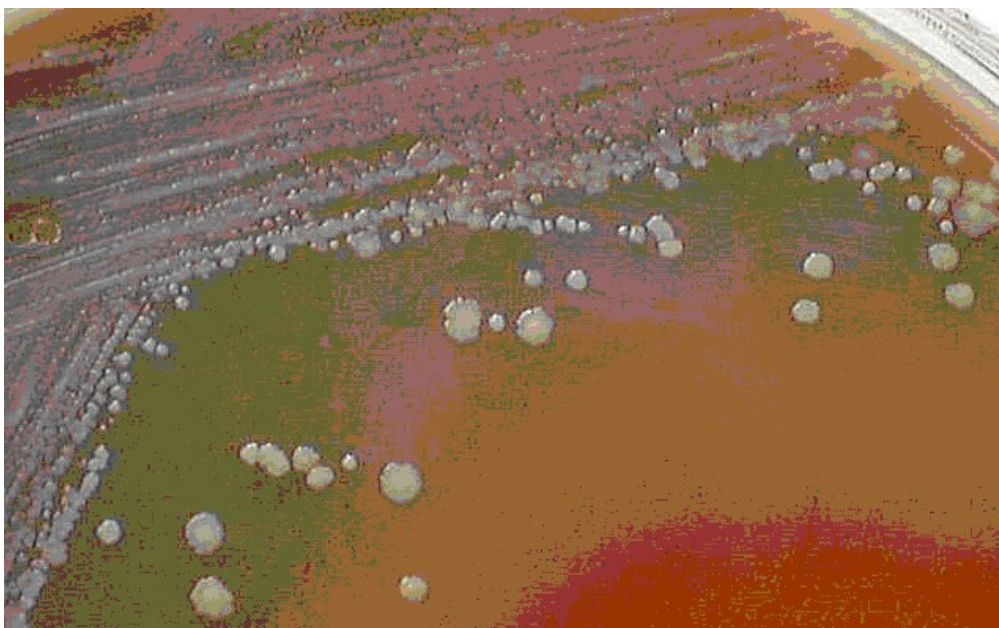
Στην έρευνά μας για την απομόνωση των στελεχών του *Bifidobacterium sp.* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε Αιματούχο Άγαρ (Blood Agar) με ναλιδιξικό οξύ (0,01%). Τα τρυβλία Petri με το υπόστρωμα, όπως επίσης και ο ενοφθαλμισμός επιφανειακά, πραγματοποιήθηκε όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 2.2.3.1.

Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C και 45°C για 5 ημέρες υπό αναερόβιες συνθήκες με τη χρήση συστημάτων συνθηκών αναεροβίωσης (Gas – Pack anaerobic system, BBL; Cockeysville, Maryland). Από τις χαρακτηριστικές αποικίες κάθε τρυβλίου έγιναν παρασκευάσματα Gram χρώσης. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν βάκιλλοι Gram + , που παρουσίαζαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Bifidobacterium sp.* ελέγχθηκαν για την ταυτότητά τους ως αυστηρά αναερόβιοι με τη δοκιμή του ελέγχου αναεροβίωσης και χαρακτηρίστηκαν ως προς την παραγωγή του ενζύμου καταλάσης (αρνητική).

Τέλος στελέχη που κρίθηκαν με τα αρχικά τεστ ότι ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium sp.* στάλθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Lille στην Γαλλία για την πλήρη ταυτοποίηση τους.



Εικόνα 6: Εμφάνιση κυττάρων στελεχών του γένους *Bifidobacterium sp.* κατά τη μικροσκόπηση μετά την εκτέλεση χρώσης κατά Gram



Εικόνα 7: Ανάπτυξη χαρακτηριστικών αποικιών στελέχους του γένους *Bifidobacterium sp.* στην επιφάνεια αιματούχο άγαρ.

2.2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

2.2.4.1 Προσδιορισμός παραγωγής οξέος και πρόκλησης ζύμωσης

Υάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 50 ml, που περιείχαν ως υπόστρωμα 10 ml Litmus milk medium (Fluka Biochemica), το οποίο περιείχε Methylene blue (0,1 %), με τοποθετημένο ανεστραμμένο σωλήνα durham, ενοφθαλμίστηκαν με ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους και ακολούθως έγινε επώαση στους 37⁰ C και στους 45⁰ C για 24 ώρες (322).

Με τη χρήση του προαναφερόμενου υποστρώματος μελετήθηκε η εμφάνιση των παρακάτω αντιδράσεων (322):

- α. Παραγωγή οξέος, η οποία γίνεται αντιληπτή από το κόκκινο χρώμα του υποστρώματος.
- β. Αναγωγή του δείκτη, η οποία γίνεται αντιληπτή από τον αποχρωματισμό του υποστρώματος.

γ. Όξινη πήξη, η οποία γίνεται αντιληπτή από την παρουσία συμπαγούς ροζ πύργματος το οποίο δεν συστέλλεται και διαλύεται στα αλκάλια.

δ. «θυελλώδης ζύμωση» (Stormy fermentation), η οποία γίνεται αντιληπτή από την όξινη πήξη, το σχηματισμό πύργματος και την παραγωγή αερίου.

2.2.4.2 Προσδιορισμός ικανότητας αποδομής του αμινοξέους τρυπτοφάνη, παραγωγής H₂S και έλεγχος κινητικότητας

Τα απομονωθέντα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποδομούν το αμινοξύ τρυπτοφάνη προς ινδόλη, τη παραγωγή H₂S και τον έλεγχο της κινητικότητάς τους. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SIM Medium (Bekton Dickinson). Γυάλινοι σωλήνες που περιείχαν 10 ml με θρεπτικό υπόστρωμα SIM ενοφθαλμίστηκαν, με τη χρήση μεταλλικού κρίκου, με ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους και ακολούθως έγινε επώαση στους 37°C. Οι παρατηρούμενες αντιδράσεις εξετάζονταν καθημερινά για 1 εβδομάδα (332, 333).

Το προαναφερόμενο θρεπτικό υποστρώμα εξετάστηκε μετά την επώαση και:

- Εμφάνιση ερυθρού δακτυλίου στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος (μετά την προσθήκη 3 σταγόνων αντιδραστήριου Kovacs) υποδήλωνε θετική δοκιμή στη ικανότητα αποδόμησης του αμινοξέους τρυπτοφάνη προς ινδόλη.
- Εμφάνιση μαύρου διάχυτου χρωματισμού του υποστρώματος, υποδήλωνε θετική δοκιμή στη παραγωγή H₂S.
- Εμφάνιση διάχυτης θόλωσης υποδήλωνε ανάπτυξη κινητού βακτηρίου, σε αντίθεση με το ακίνητο που θα αναπτυχθεί μόνο κατά μήκος της διόδου ενοφθαλμισμού.

2.2.4.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας και επιβίωσης σε διαφορετικές τιμές pH (Survival at low pH)

Η επιβίωση σε χαμηλές τιμές pH εξετάστηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από την ερευνητική ομάδα του Conway (Conway et al., 1987). Ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους (30 ml) φυγοκεντρήθηκε (στους 3000 g, 10 min, 4 °C) και το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με στείρο PBS (Puffered Saline, NaCl 0,8 % - 0,1 M; pH 7,2). Στη συνέχεια το ίζημα μοιράστηκε στο 1/10 του αρχικού όγκου (0,3 ml) σε

σωλήνες. Το υλικό κάθε σωλήνα ενοφθαλμίστηκε σε 6 ml PBS σε pH 3,0 και στη συνέχεια επώαστηκε στους 37°C. Ζωντανές αποικίες καταμετρήθηκαν σε 0, 1/2 και 2 ώρες σε τρυβλία με MRS Agar και Blood Agar, τα οποία επώαστηκαν αναερόβια στους 37°C για 3 ημέρες (Gas – Pack anaerobic system, BBL; Cockeysville, Maryland).

Η ανάπτυξη σε συνθήκες με διαφορετικές τιμές pH προσδιορίστηκε με τη χρήση MRS Broth (250 ml) και Brain Heart Infusion Broth (250 ml) όπου το pH ρυθμίστηκε σε διάφορες τιμές (pH 1,0 έως 6,5). Το υλικό MRS Broth και Brain Heart Infusion Broth περιείχε τα εξής διαλύματα: 200 mM KCl/HCl και 100 mM citric acid/200 mM Na₂HPO₄. Η ανάπτυξη εξετάστηκε με την καταμέτρηση ζωντανών αποικιών μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες (335).

2.2.4.4 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε περιβάλλον χολικών αλάτων

Η ανθεκτικότητα στην παρουσία χολικών αλάτων μελετήθηκε ως εξής: Ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους ενοφθαλμίστηκε σε MRS Broth και Brain Heart Infusion Broth, το οποίο δεν περιείχε ή περιείχε oxgall (Ox-Bile LP0055, Oxoid) σε συγκέντρωση 0.15 και 0,5 %, και επώαστηκε στους 37°C. Η ανάπτυξη εξετάστηκε με την καταμέτρηση ζωντανών αποικιών μετά από επώαση στους 37°C για 0 ώρες και 24 ώρες, σε τρυβλία με MRS Agar (335).

2.2.4.5 Έλεγχος ανάπτυξης σε παρουσία φαινόλης (phenol)

Η ανθεκτικότητα σε παρουσία phenol μελετήθηκε ως εξής: Ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους ενοφθαλμίστηκε σε MRS Broth και σε Brain Heart Infusion Broth (10 ml), το οποίο δεν περιείχε ή περιείχε phenol (Sigma, St. Louis., MO, USA) σε συγκέντρωση 0,4 % (336), και επώαστηκε στους 37°C. Η ανάπτυξη εξετάστηκε με την καταμέτρηση ζωντανών αποικιών μετά από επώαση στους 37°C για 0 ώρες και 24 ώρες, σε τρυβλία με MRS Agar

2.2.4.6 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε πρωτεολυτικά ένζυμα (λυσοζύμη)

Η ανθεκτικότητα στην παρουσία λυσοζύμης μελετήθηκε ως εξής: Ενεργοποιημένη («activated») καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους ενοφθαλμίστηκε σε MRS Broth και

σε Brain Heart Infusion Broth h (10 ml), το οποίο δεν περιείχε ή περιείχε λυσοζύμη (Sigma, St. Louis., MO, USA) σε συγκέντρωση 100 ppm (337), και επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Η ανάπτυξη εξετάστηκε με την καταμέτρηση ζωντανών αποικιών μετά από επώαση στους 37°C για 0 ώρες και 24 ώρες, σε τρυβλία με MRS Agar.

2.2.4.7 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

α. Στελέχη του γένους *Lactobacillus* sp.

Όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma. Στόκ διαλυμάτων των αντιβιοτικών παράχθηκαν και η αποστείρωσή τους πραγματοποιήθηκε με διήθηση αυτών των διαλυμάτων με τη χρήση φίλτρων με διάμετρο 0,2 μm. Τα παρασκευασμένα διαλύματα διατηρήθηκαν υπό συνθήκες κατάψυξης στους -20°C. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν διαλύματα των αντιβιοτικών, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση, που επρόκειτο να εισέλθουν καθημερινά στη παρούσα μελέτη, έτσι ώστε ίσοι όγκοι των παραχθέντων διαλυμάτων να μπορούν να τοποθετηθούν πάνω σε ειδικούς χάρτινους δίσκους, οι οποίοι μπορούν να μεταφέρουν αντιβιοτικά (3 MM Chr filter paper disk, διαμέτρου 6,35 mm, Whatman^R International) ώστε να δίνουν τα ενδεικνύμενα ποσά συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών σε mg, τα οποία φαίνονται στον πίνακα 12.

Μόνο το αντιβιοτικό Vancomycin προμηθεύτηκε υπό τη μορφή έτοιμων δισκίων (VA30, 30 μg) από την εταιρεία OXOID.

Η ανίχνευση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου «disk diffusion method», σύμφωνα με τα δεδομένα της National Committee for Clinical Laboratory Standards (338) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997). Όγκος 100 μl από «πρόσφατη καλλιέργεια 24 ωρών» (overnight culture) αραιώθηκε σε διάλυμα άλατος (saline solution) ώστε να έχουμε 1,5 X CFU/ml (0,5 McFarland turbidity standard). Τρυβλία με Mueller – Hinton agar II(BBL) επιστρώθηκαν επιφανειακά με το προαναφερόμενο διάλυμα, ώστε να έχουμε πλήρη ανάπτυξη αποικιών σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Τα τρυβλία έμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.

Στη συνέχεια αφού η επιφάνεια των τρυβλίων – petri, είχε στεγνώσει και εξαφανισθεί η υγρασία τοποθετήθηκαν άσηπτα 4 δίσκοι αποστειρωμένοι και ακολούθως 5 μl από κάθε διάλυμα των αντιβιοτικών τοποθετήθηκε στην επιφάνεια κάθε δίσκου. Τα τρυβλία – petri με

τα αντιβιοτικά επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Η διάμετρος των παρατηρούμενων ζωνών αναστολής καταμετρήθηκε με τη χρήση ειδικού χάρακα που υπάρχει σε καταμετρητή αποικιών (Gallenkamp, England). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (μέσος όρος 5 καταγραφών) στη συνέχεια ερμηνεύτηκαν και εκφράστηκαν ως S (ευαίσθητο), I (ενδιάμεση ευαισθησία) και R (ανθεκτικό), όπως συνιστούν δεδομένες αναφορές (340), ως επίπεδα αναστολής λειτουργίας, έτσι ώστε να θεωρούμε ανθεκτικά τα στελέχη με ζώνες αναστολής ίσες ή μικρότερες των 19 mm για την Penicillin G, την Ampicillin και την Amoxicillin plus Clavulanic Acid, 14 mm για την Vancomycin, την Teicoplanin και την Tetracycline και 13 mm για την Gentamycin και την Ciproflaxacin.

Τρία στελέχη, γνωστά ως ανθεκτικά στελέχη αναφοράς), *S.aureus* ATCC 2593 και NCTC 6571 και *E.coli* ATCC 25922 (341, 342) συμπεριλήφθηκαν στις δοκιμές ευαισθησίας των αντιβιοτικών ως θετικά στελέχη αναφοράς. Τέλος πρότυπα προβιοτικά στελέχη αναφοράς *L. plantarum*, (εμπορική ονομασία Biomax S₂) και *L.paracasei subsp. paracasei* (ACA – DC 022) εισήλθαν στη παρούσα δοκιμή.

- Για τα στελέχη *Enterococcus sp.*

Για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας, στους εξεταζόμενους προαναφερθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες, των εξεταζόμενων απομονωθέντων στελεχών του γένους *Enterococcus sp.* σε συνδυασμό με την ανωτέρω μέθοδο «disk diffusion method», χρησιμοποιήθηκε και μια επιπλέον μέθοδος ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η παρουσία ανθεκτικότητας ως προς την Vancomycin.

Στόκ διαλυμάτων των αντιβιοτικών παράχθηκαν και η αποστείρωσή τους πραγματοποιήθηκε με διήθηση αυτών των διαλυμάτων με τη χρήση φίλτρων με διάμετρο 0,2 μm. Τα παρασκευασμένα διαλύματα διατηρήθηκαν υπό συνθήκες κατάψυξης στους -20°C.

Μετά από συνεχόμενες καλλιέργειες τυπικών αποικιών των εξεταζόμενων στελεχών σε σωλήνες με Trypticase Soy Broth εμπλουτισμένο με Yeast Extract (TSYE), οι οποίοι περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών Vancomycin ή Teicoplanin, προσδιορίστηκε η MIC (Minimal Inhibitory Concentration) (Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) αυτών των αντιβιοτικών όπως έχει προκαθορισθεί σύμφωνα με δεδομένα πρωτόκολλα (343). Ο συνδυασμός των καταγραφόμενων τιμών MIC και για τα δύο

εξεταζόμενα αντιβιοτικά θεωρήθηκε ενδεικτικός και ικανός ώστε να κατηγοριοποιηθεί το εξεταζόμενο στέλεχος ως προς την ανθεκτικότητά του στο αντιβιοτικό Vancomycin.

Πίνακας 12: Αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη του ελέγχου της ευαισθησίας στελεχών του γένους *Lactobacillus sp.* ως προς αυτά.

Αντιβιοτικά	μg/δίσκο
Penicillin G	10
Ampicillin	10
Vancomycin	30
Teicoplanin	30
Tetracycline	30
Gentamycin	10
Amoxicillin plus Clavulanic Acid	30

2.2.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

▪ Καλλιέργειες στελεχών

Μελετήθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των επιλεγμένων απομονωθέντων στελεχών έναντι των εξής παθογόνων βακτηρίων: *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. ancona* και *S. enteridis*, με τη χρήση της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ (163, 344).

Τα παθογόνα βακτήρια επώαστηκαν σε T.S.B. (Triple Soya Broth - Oxoid) στους 37°C για 24 h και πραγματοποιήθηκαν 3 συνεχείς ανακαλλιέργειες για την ενεργοποίησή τους.

Περίπου 10^5 - 10^7 CFU/ml παθογόνου βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ευαισθησίας τους ως προς τα εξεταζόμενα στελέχη.

Για τον προσδιορισμό των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων των επιλεγμένων οξυγαλακτικών στελεχών και των προτύπων βακτηριακών στελεχών, καθένα ξεχωριστά ενοφθαλμίστηκαν

σε MRS broth και επώστηκαν στους 37°C και 45°C για 3,6,24 και 48 ώρες. Ακολούθως έγινε καταμέτρηση και καταγραφή του pH (με τη χρήση ευαίσθητου πεχάμετρου), της O.D. και της ικανότητας παραγωγής γαλακτικού οξέος (οξύτητα) για κάθε καλλιέργεια ξεχωριστά είτε στους 37°C είτε στους 45°C για τις 3, 6, 24 και 48 ώρες. Σε τρυβλία petri με Mueller Hinton Agar έγινε επιφανειακή επίστρωση καθενός παθογόνου βακτηρίου ξεχωριστά και ακολούθως ανοίχθηκαν άσηπτα φρεάτια διαμέτρου 5 mm και βάθος 2 mm. Τα φρεάτια πληρώθηκαν με 50 μl από την καλλιέργεια του εξεταζόμενου οξυγαλακτικού στελέχους για τις θερμοκρασίες 37^o και 45^oC ξεχωριστά και αντιστοίχως για καλλιέργεια στις 3, 6, 24 και 48 ωρών. Τα τρυβλία petri με το Mueller Hinton Agar τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα με σκοπό την μερική απορρόφηση των διαλυμάτων από το άγαρ. Μετά σφραγίστηκαν και ακολούθησε επώαση στους 37^o C και 45^o C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης έγινε μέτρηση των σχηματιζόμενων διαυγών ζωνών (zones) γύρω από κάθε φρεάτιο και καταγράφηκε η μέτρηση (διάμετρος). Οι δοκιμές επαναλήφθηκαν τρεις (3) φορές και οι αναγραφόμενες τιμές στους πίνακες που ακολουθούν είναι οι μέσες τιμές των μετρήσεων.

▪ Υπερκείμενο υγρό των καλλιεργειών

Για κάθε καλλιέργεια επιλεγμένων οξυγαλακτικών στελεχών, όπως επίσης και των προτύπων βακτηριακών στελεχών, στους 37°C και 45°C στις 3, 6, 24 και 48 ώρες, έγινε φυγοκέντρηση (5000xg για 20 min στους 4^o C) ώστε να ληφθεί διάλυμα ελεύθερο από βακτηριακά κύτταρα και κατασυνέπεια πλούσιο σε βακτηριοσίνες (7, 345). Στο υπερκείμενο υγρό που λήφθηκε μετά τη φυγοκέντρηση ρυθμίστηκε η τιμή του pH στο 6,2 με τη χρήση διαλύματος 5 N NaOH και έγινε κατεργασία με τη χρήση διαλύματος 1mg/ml καταλάσης (catalase enzyme, Sigma) στους 18°C για 30min. Τέλος ακολούθησε διήθηση του υγρού με τη χρήση φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,22μm (Millipore) (163, 344).

Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση 50μl επεξεργασμένου υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας των επιλεγμένων οξυγαλακτικών στελεχών, όπως επίσης και των προτύπων βακτηριακών στελεχών, είτε στους 37^o C είτε στους 45^oC, στις 3, 6, 24 και 48 ώρες σε φρεάτια που είχαν ανοιχθεί σε τρυβλία Mueller Hinton Z agar και έχει προηγηθεί επίστρωση του εξεταζόμενου παθογόνου βακτηρίου όπως έχει προαναφερθεί.

Τα τρυβλία petri ακολουθώς τοποθετήθηκαν στους 4°C για 2 ώρες για τη διάχυση του διαλύματος εντός του agar και μετά έγινε επώαση στους 37°C και 45°C για 24 ώρες.

Τέλος έγινε μέτρηση των ζωνών που αναπτύχθηκαν γύρω από τα φρεάτια των τρυβλίων.

Οι δοκιμές επαναλήφθηκαν τρεις (3) φορές και οι αναγραφόμενες τιμές στους πίνακες που ακολουθούν είναι οι μέσες τιμές των μετρήσεων.

▪ **Γαλακτικό οξύ**

Βάσει των καταγραφόμενων τιμών οξύτητας των καλλιεργειών στις 3,6,24,48 ώρες στους 37°C και 45°C, τιτλοποιήθηκε γαλακτικό οξύ ρακεμικής μορφής αντίστοιχης με το παραγόμενο από τα επιλεγμένα απομονωθέντα οξυγαλακτικά στελέχη, όπως επίσης και των προτύπων βακτηριακών στελεχών, στις ίδιες τιμές και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε φρεάτια, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία που περιγράφεται ανωτέρω. Η τιμή μέτρησης των διαυγών ζωνών που αναπτύχθηκαν γύρω από τα φρεάτια των τρυβλίων δεικνύει, θεωρητικά τουλάχιστον, την αντιμικροβιακή δράση του γαλακτικού οξέους που παρήχθη από τα απομονωθέντα οξυγαλακτικά στελέχη που εισήλθαν στη παρούσα μελέτη.

Οι δοκιμές επαναλήφθηκαν τρεις (3) φορές και οι αναγραφόμενες τιμές στους πίνακες που ακολουθούν είναι οι μέσες τιμές των μετρήσεων.

2.2.6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

2.2.6.1 Βιοχημικές δοκιμασίες

A. Δοκιμή παραγωγής καταλάσης (catalase test)

Τοποθετήθηκε μία σταγόνα 3% H₂O₂ επάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Με τη βοήθεια κρίκου μεταφέρθηκε από στερεά καλλιέργεια μικρή ποσότητα και αναμείχθηκε με τη σταγόνα του H₂O₂. Η παραγωγή φυσαλίδων υποδήλωνε θετική δοκιμή.

B. Δοκιμή οξειδάσης (oxidase activity)

Ορισμένα βακτήρια παράγουν το ένζυμο οξειδάση το οποίο ανάγει το αντιδραστήριο Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride σε ένωση με χρώμα πορφυρό.

Διηθητικό χαρτί διαμέτρου 7 cm τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri και πάνω σ' αυτό τοποθετήθηκαν 2-3 σταγόνες αντιδραστήριου οξειδάσης. Προτού στεγνώσει το αντιδραστήριο μεταφέρθηκε με κρίκο πλατίνας καλλιέργεια του στελέχους, που αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα το οποίο δεν περιείχε γλυκόζη και νιτρικά, και απλώθηκε στο σημείο που βρίσκονταν το αντιδραστήριο. Η ανάπτυξη σκοτεινού πορφυρού χρώματος μέσα σε 10 sec υποδήλωνε θετική αντίδραση.

Γ. Δοκιμή ανοχής σε 6,5% NaCl

Με τη δοκιμή αυτή εξετάζεται η ικανότητα των μικροβίων να αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά όπου υπάρχει συγκέντρωση 6,5% NaCl. Αποτελεί μια προκαταρκτική δοκιμή κατά την ταυτοποίηση μερικών ομάδων μικροβίων όπως των καταλάση αρνητικών Gram θετικών κόκκων, των Gram αρνητικών αζυμωτικών βακτηριδίων κ.ά. Προκειμένου για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων η δοκιμή γίνεται ως εξής:

Σε 1000 ml θρεπτικού ζωμού προστέθηκαν 60 g NaCl, 1 g γλυκόζη και 1 ml δείκτης (οινοπνευματικό διάλυμα ιώδους της βρωμοθυμόλης 1,6%). Μοιράστηκαν σε βιδωτά φιαλίδια ανά 15 ml, και αποστειρώθηκαν στο αυτόκαστο στους 121° C για 15 min. Σε ένα τέτοιο φιαλίδιο ενοφθαλμίστηκαν δύο-τρεις αποικίες του υπό εξέταση βακτηρίου, επώαστηκαν στους 35° C για 72 ώρες και καταγράφηκε η ανάπτυξη ή μη ανάπτυξη από την αλλαγή χροιάς από ιώδες σε κίτρινο (θετική αντίδραση) ή απλώς θόλωση χωρίς αλλαγή χροιάς. Σε αρνητική αντίδραση δεν παρατηρήθηκε θόλωση του ζωμού.

Θετική δίνουν τη δοκιμή οι περισσότεροι εντερόκοκκοι και ο αερόκοκκος. Μερικά είδη δίνουν θετική την αντίδραση μέσα σε 24 ώρες. Αρνητική δίνουν τη δοκιμή οι μη-βαιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι και η *Gemella* sp..

Δ. Δοκιμή ελέγχου της κινητικότητας

Ενοφθαλμίστηκε καθαρή αποικία, από 24ωρη καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους, σε Motility Medium. Ο ενοφθαλμισμός έγινε με νύξη σε βάθος 1,5 – 2 cm από την επιφάνεια του υποστρώματος και η επώαση έγινε στους 37° C για 24 ώρες.

Η κινητικότητα διαπιστώθηκε από την ανάπτυξη του βακτηρίου και εκτός της διόδου ενοφθαλμισμού.

Ε. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης του αμινοξέους αργινίνη (arginine)

Ενοφθαλμίστηκε ο ειδικός ζυμός Decarboxylase Medium, από 18ωρη καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους σε κεκλιμένο θρεπτικό άγαρ. Μετά τον ενοφθαλμισμό, ο οποίος ήταν έντονος, επιστιβαδεύθηκε σε κάθε σωλήνα, στοιβάδα στείρου παραφινέλαιου ύψους 4 – 5 cm. Ενοφθαλμίστηκαν συνολικά 2 σωλήνες (ο ένας σωλήνες αποτελούσε το μάρτυρα). Οι σωλήνες επώαστηκαν στους 37⁰ C για 4 ημέρες.

Το υπόστρωμα αρχικά λάμβανε κίτρινο χρώμα (όξινο pH από τη ζύμωση της γλυκόζης), το οποίο συνέχεια μετατρέπονταν σε ιώδες κατά την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέους. Τα χρώμα του σωλήνα μάρτυρα παρέμεινε κίτρινο.

ΣΤ. Έλεγχος παραγωγής και ενεργότητας της porrolidonylarylamidase,

Ο έλεγχος παραγωγής και ενεργότητας της porrolidonylarylamidase, προσδιορίστηκε με το PYR Test. Το PYR Test πραγματοποιήθηκε με το PYR Kit, όπου συμπεριλαμβάνεται PYR δίσκους και αντιδραστήριο (Cinnamaldehyde reagent – 0.01 % p- dimethylamino – cinnamaldehyde). Τοποθετήθηκε ένα PYR disk (δίσκο) πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και υγράνθηκε με μια σταγόνα απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια μια καθαρή αποικία του υπό εξέταση στελέχους τοποθετήθηκε άσηπτα πάνω στο δίσκο. Αφέθηκε η αντικειμενοφόρος πλάκα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μια σταγόνα από το αντιδραστήριο cinnamaldehyde reagent πάνω στο δίσκο. Το θετικό δείγμα ως προς την παραγωγή και ενεργότητα της porrolidonylarylamidase παρουσίαζε ρόζ ή κερασσί - ερυθρό χρώμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 13: Απομονωθέντα αυτόχθονα οξυγαλακτικά στελέχη

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός απομονωθέντων οξυγαλακτικών στελεχών (n)													
		<i>L. brevis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. delb. lactis</i>	<i>L. lactis lactis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>
Απαστερίωτο πρόβειο γάλα	20	2	2	3	2	3	6	6	-	4	4	13	17	-	7
Απαστερίωτο αίγιο γάλα	10	1	2	5	1	5	2	2	-	4	2	13	11	-	4
Απαστερίωτο γάλα βόειο	10	3	3	7	-	4	6	7	2	3	4	11	16	-	5
Παραδοσιακά παρασκευασμένο τυρί «φέτα» από πρόβειο γάλα	20	4	5	5	2	2	7	9	7	6	8	9	14	-	9
Παραδοσιακά παρασκευασμένο τυρί άλμης από αίγιο γάλα	20	3	2	3	4	5	3	3	6	4	5	7	9	-	5
Παραδοσιακές καλλιέργειες «εκκινητές» γαλακτικής ζύμωσης «starter» («πτυές»)	20	2	4	7	5	8	5	10	2	5	6	8	15	-	6
Ανθρώπινα περιττώματα ατόμων ηλικίας 1-4 ετών	20	1	2	6	5	1	1	4	1	6	3	6	6	4	3
ΣΥΝΟΛΟ	120	16	18	36	19	28	30	41	18	32	30	67	88	4	39

Πίνακας 14: Προέλευση των στελεχών του *L. plantarum* (LP) για μελέτη.

<i>a/a</i>	Μελετηθέντα δείγματα	Αριθμός δειγμάτων	Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών
	Πρόβειο γάλα	20	2 (LP1, LP2)
1	Απαστερίωτο γάλα	10	-
	Βόειο γάλα	10	-
2	Τυρί Φέτα	20	3 (LP5, LP7, LP9)
	Λευκό τυρί από αίγιο γάλα	20	2 (LP13, LP14)
3	Πουτιές	20	3 (LP6, LP10, LP12)
4	Κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών	20	4 (LP2, LP4, LP8, LP11)
Σύνολο		120	14

Πίνακας 15: Προέλευση των στελεχών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) για μελέτη.

α/α	Μελετηθέντα δείγματα	Αριθμός δειγμάτων	Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών
	Πρόβειο γάλα	20	2 (LC3, LC9)
1	Απαστερίωτο Αίγιο γάλα	10	1 (LC2)
	Βόειο γάλα	10	-
2	Φέτα	20	1 (LC7)
	Τυρί Λευκό τυρί από αίγιο γάλα	20	2 (LC5, LC6)
3	Πυτιές	20	3 (LC1, LC4, LC8)
4	Κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών	20	-
Σύνολο		120	9

Πίνακας16: Προέλευση των στελεχών του *E. faecium* (EFC)για μελέτη.

α/α	Μελετηθέντα δείγματα	Αριθμός δειγμάτων	Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών
	Πρόβειο γάλα	20	1 (EFC2)
1	Απαστερίωτο γάλα	10	1 (EFC1)
	Βόειο γάλα	10	-
2	Τυρί	20	1 (EFC14)
	Λευκό τυρί από αίγειο γάλα	20	2 (EFC4, EFC5)
3	Πουτιές	20	9 (EFC3, EFC6, EFC7, EFC8, EFC9, EFC10, EFC11, EFC12, EFC13)
4	Κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών	20	-
	Σύνολο	120	14

Πίνακας 17: Προέλευση των στελεχών του *E. Faecalis* (EFL) για μελέτη.

a/a	Μελετηθέντα δείγματα	Αριθμός δειγμάτων	Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών
1	Πρόβειο γάλα	20	2 (EFL2, EFL3)
	Αpasteριωτ ο γάλα	10	-
	Βόειο γάλα	10	-
2	Φέτα	20	-
	Τυρί Λευκό τυρί από αίγειο γάλα	20	2 (EFL4, EFL5)
3	Πυτιές	20	6 (EFL6, EFL7, EFL8, EFL9, EFL10, EFL11)
4	Κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών	20	1 (EFL14)
Σύνολο		120	11

Αποτελέσματα

Πίνακας 18: Επιβίωση των απομονωθέντων στελεχών του *L. plantarum* (LP) σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Α ν θ ε κ τ ι κ ό τ η τ α σε											
	Λυσοζύμη	Φαινόλη	Χολή		Τιμές pH							
			0,15% oxgall	0.5% oxgall	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.5	
LP 1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 2	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R
LP 3	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LP 4	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 6	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R
LP 7	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LP 8	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R
LP 9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 10	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 11	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LP 12	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LP 13	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LP 14	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LP reference	I	R	I	I	S	S	S	I	R	S	I	I

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 19: Επιβίωση των απομονωθέντων στελεχών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Α ν θ ε κ τ ι κ ό					τ η τ α σ ε						
	Λυσοζύμη	Φαινόλη	Χολή		Τιμές pH							
			0,15% oxgall	0.5% oxgall	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.5	
LC1	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
LC2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC3	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC4	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC6	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC7	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC8	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LC reference	R	I	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 20: Επιβίωση των απομονωθέντων στελεχών του *E. faecium* (EFC) σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Α ν θ ε κ τ ι κ ό τ η τ α σ ε											
	Λυσοζύμη	Φαινόλη	Χολή		Τιμές pH							
			0,15%oxgall	0.5%oxgall	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.5	
EFC 1	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
EFC 2	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
EFC 3	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
EFC 4	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 6	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 7	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 8	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 10	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 11	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 12	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 13	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC 14	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFC reference	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 21: Επιβίωση των απομονωθέντων στελεχών του *E. faecalis* (EFL) σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Α ν θ ε κ τ ι κ ό τ η τ α σε											
	Λυσοζύμη	Φαινόλη	Χολή		Τιμές pH							
			0,15%oxgall	0.5%oxgall	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.5	
EFL 1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 3	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 4	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 6	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 7	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 8	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 10	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL 11	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
EFL στέλεχος reference	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 22: Ανθεκτικότητα κατά το National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) και Charteris et al. (1998), στα αντιβιοτικά των εξεταζόμενων στελεχών του *L. plantarum* (LP)

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Vancomycin (30 µg)	Gentamycin (10 µg)	Ampicillin (10 µg)	Penicillin G (10 µg)	Tetracycline (30 µg)	Teicoplanin (30 µg)	Amoxicillin with Clavulanic Acid (30 µg)
LP 1	I	R	R	R	R	S	R
LP 2	R	R	R	R	R	R	R
LP 3	R	R	S	R	R	R	S
LP 4	I	R	R	R	I	I	R
LP 5	R	R	S	I	I	R	I
LP 6	R	R	R	R	R	R	R
LP 7	R	R	S	R	R	R	S
LP 8	R	I	S	S	R	S	S
LP 9	R	R	I	R	R	R	R
LP 10	R	R	R	R	R	R	R
LP 11	S	S	R	R	S	I	R
LP 12	R	R	R	R	R	R	I
LP 13	S	R	R	R	I	R	S
LP 14	R	R	S	R	R	R	S
LP reference strain	I	S	S	R	S	R	R

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 23: Ανθεκτικότητα κατά National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) και Charteris et al. (1998), στα αντιβιοτικά των εξεταζόμενων στελεχών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC).

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Vancomycin (30 µg)	Gentamycin (10 µg)	Ampicillin (10 µg)	Penicillin G (10 µg)	Tetracycline (30 µg)	Teicoplanin (30 µg)	Amoxicillin with Clavulanic Acid (30 µg)
LC 1	R	R	R	R	S	R	S
LC 2	R	R	I	S	R	R	I
LC 3	R	I	R	S	S	R	R
LC 4	I	S	R	S	R	R	R
LC 5	R	I	R	R	I	R	R
LC 6	I	I	R	S	S	R	R
LC 7	I	I	R	R	I	R	R
LC 8	R	S	R	R	S	R	R
LC 9	R	R	R	S	S	R	R
LC reference stain	S	R	R	R	R	R	R

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 24: Ανθεκτικότητα κατά το National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) και Charteris et al. (1998), στα αντιβιοτικά των εξεταζόμενων στελεχών του *E. faecium* (EFC)

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Vancomycin (30 µg)	Gentamycin (10 µg)	Ampicillin (10 µg)	Penicillin G (10 µg)	Tetracycline (30 µg)	Teicoplanin (30 µg)	Amoxicillin with Clavulanic Acid (30 µg)
EFC 1	R	R	R	R	I	I	S
EFC 2	R	R	R	R	S	I	S
EFC 3	S	S	S	S	S	I	S
EFC 4	R	R	R	R	R	R	R
EFC 5	R	R	S	S	S	R	S
EFC 6	R	I	S	S	S	R	S
EFC 7	I	S	S	R	S	R	S
EFC 8	I	I	S	S	S	S	S
EFC 9	R	R	I	I	S	I	S
EFC 10	I	I	S	S	S	S	S
EFC 11	R	R	R	R	R	I	I
EFC 12	R	S	S	S	S	R	S
EFC 13	I	S	S	S	S	R	S
EFC 14	R	R	R	R	R	R	I
EFC reference strain	R	R	I	I	S	S	S

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 25: Ανθεκτικότητα κατά το National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) και Charteris et al. (1998), στα αντιβιοτικά των εξεταζόμενων στελεχών του *E. faecalis* (EFL)

Αρίθμηση των απομονωθέντων στελεχών	Vancomycin (30 µg)	Gentamycin (10 µg)	Ampicillin (10 µg)	Penicillin G (10 µg)	Tetracycline (30 µg)	Teicoplanin (30 µg)	Amoxicillin with Clavulanic Acid (30 µg)
EFL 1	S	S	S	S	S	S	S
EFL 2	I	I	S	S	S	S	S
EFL 3	R	R	R	R	S	R	S
EFL 4	R	R	R	R	R	R	R
EFL 5	I	S	R	R	S	I	I
EFL 6	S	S	S	S	I	I	S
EFL 7	I	S	S	S	S	S	S
EFL 8	R	I	S	S	S	R	S
EFL 9	S	S	S	R	S	S	S
EFL 10	I	R	I	I	R	S	S
EFL 11	R	S	S	S	I	I	S
EFL reference	R	I	R	R	S	S	S

R: ανθεκτικά στελέχη, S: ευαίσθητα στελέχη, I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στελέχη

Πίνακας 26: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	LP 1	2011	4,40	1,81	17	12	11
		LP 2	2482	4,30	1,93	13	9	12
		LP 3	2102	4,40	1,81	21	14	11
		LP 4	2055	4,50	1,69	13	10	11
		LP 5	1877	4,70	1,46	15	11	-

		LP 6	2242	4,40	1,81	20	13	11
		LP 7	198	4,70	1,46	12	9	-
		LP 8	2104	4,40	1,81	12	9	11
		LP 9	2029	4,50	1,69	22	15	11
		LP 10	2505	4,30	1,93	23	15	12
		LP 11	2088	4,50	1,69	13	11	11
		LP 12	2377	4,30	1,93	18	14	12
		LP 13	2083	4,50	1,69	13	10	11
		LP 14	1755	4,60	1,57	13	10	9
		LP reference	1623	4,90	1,22	14	9	-
		LP 1	1754	4,40	1,81	17	12	11
		LP 2	2105	4,30	1,93	13	9	12
		LP 3	1656	4,40	1,81	20	13	11
		LP 4	1557	4,50	1,69	13	9	11
	LP 5	1560	4,70	1,46	13	11	-	
	LP 6	1901	4,30	1,93	15	12	12	
	LP 7	1721	4,60	1,57	11	9	9	
	LP 8	1705	4,40	1,81	12	-	11	
	LP 9	1803	4,40	1,81	17	14	11	
	LP 10	1953	4,30	1,93	20	15	12	
	LP 11	1610	4,50	1,69	12	9	11	
	LP 12	1911	4,30	1,93	17	13	12	
	LP 13	1752	4,50	1,69	12	-	11	
	LP 14	1601	4,60	1,57	12	10	9	
	LP reference	1221	4,90	1,22	13	9	-	

Πίνακας 27: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιεργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	LP 1	1455	4,6	1,57	17	12	9
		LP 2	1955	4,5	1,69	12	9	11
		LP 3	1845	4,6	1,57	20	13	9
		LP 4	1413	4,7	1,46	13	10	-
		LP 5	1359	4,8	1,35	14	10	-
		LP 6	1980	4,5	1,69	20	13	11

		LP 7	1405	4,6	1,57	11	9	9	
		LP 8	1584	4,6	1,57	11	9	9	
		LP 9	1802	4,6	1,57	21	14	9	
		LP 10	1904	4,5	1,69	22	15	11	
		LP 11	1573	4,7	1,46	13	10	-	
		LP 12	1655	4,7	1,46	17	14	-	
		LP 13	1495	4,6	1,57	13	9	9	
		LP 14	1554	4,6	1,57	13	9	9	
	LP reference	0156	4,9	0,15	-	-	-		
	48	LP 1	1371	4,6	1,57	16	11	9	
		LP 2	1407	4,5	1,69	12	9	11	
		LP 3	1274	4,6	1,57	19	12	9	
		LP 4	1328	4,7	1,46	12	9	-	
		LP 5	1265	4,8	1,35	13	10	-	
		LP 6	1381	4,4	1,81	15	11	11	
		LP 7	1256	4,6	1,57	11	-	9	
		LP 8	1323	4,6	1,57	11	-	9	
		LP 9	1710	4,6	1,57	17	14	9	
		LP 10	1654	4,5	1,69	19	14	11	
		LP 11	1243	4,7	1,46	11	9	-	
		LP 12	1224	4,7	1,46	16	13	-	
		LP 13	1306	4,7	1,46	11	-	-	
		LP 14	1326	4,6	1,57	11	9	9	
		LP reference	0107	6,9	0,15	-	-	-	

Πίνακας 28: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	LP 1	2011	4,40	1,81	22	12	13
		LP 2	2482	4,30	1,93	29	22	14
		LP 3	2102	4,40	1,81	24	17	13
		LP 4	2055	4,50	1,69	22	17	12
		LP 5	1877	4,70	1,46	21	13	10
		LP 6	2242	4,40	1,81	25	21	13
		LP 7	198	4,70	1,46	20	15	10

		LP 8	2104	4,40	1,81	22	16	13
		LP 9	2029	4,50	1,69	21	17	12
		LP 10	2505	4,30	1,93	19	18	14
		LP 11	2088	4,50	1,69	25	16	12
		LP 12	2377	4,30	1,93	28	22	14
		LP 13	2083	4,50	1,69	22	17	12
		LP 14	1755	4,60	1,57	20	17	11
		LP reference	1623	4,90	1,22	14	12	-
	48	LP 1	1754	4,40	1,81	21	-	13
		LP 2	2105	4,30	1,93	28	21	14
		LP 3	1656	4,40	1,81	23	17	13
		LP 4	1557	4,50	1,69	21	16	12
		LP 5	1560	4,70	1,46	20	13	10
		LP 6	1901	4,30	1,93	23	18	14
		LP 7	1721	4,60	1,57	19	15	11
		LP 8	1705	4,40	1,81	20	14	13
		LP 9	1803	4,40	1,81	21	17	13
		LP 10	1953	4,30	1,93	25	17	14
		LP 11	1610	4,50	1,69	24	15	12
		LP 12	1911	4,30	1,93	24	19	14
		LP 13	1752	4,50	1,69	21	15	12
		LP 14	1601	4,60	1,57	18	15	11
		LP reference	1221	4,90	1,22	12	10	-

Πίνακας 29: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	LP 1	1455	4,6	1,57	20	11	11
		LP 2	1955	4,5	1,69	20	15	12
		LP 3	1845	4,6	1,57	17	14	11
		LP 4	1413	4,7	1,46	18	14	10
		LP 5	1359	4,8	1,35	15	11	9
		LP 6	1980	4,5	1,69	22	19	12

		LP 7	1405	4,6	1,57	18	13	11
		LP 8	1584	4,6	1,57	20	14	11
		LP 9	1802	4,6	1,57	21	17	11
		LP 10	1904	4,5	1,69	20	16	12
		LP 11	1573	4,7	1,46	15	12	10
		LP 12	1655	4,7	1,46	16	13	10
		LP 13	1495	4,6	1,57	21	15	11
		LP 14	1554	4,6	1,57	21	16	11
	LP reference	0156	4,9	0,15	-	-	-	
	48	LP 1	1371	4,6	1,57	19	-	11
		LP 2	1407	4,5	1,69	19	15	12
		LP 3	1274	4,6	1,57	15	13	11
		LP 4	1328	4,7	1,46	16	13	10
		LP 5	1265	4,8	1,35	15	15	9
		LP 6	1381	4,4	1,81	20	17	13
		LP 7	1256	4,6	1,57	17	13	11
		LP 8	1323	4,6	1,57	17	13	11
		LP 9	1710	4,6	1,57	18	12	11
		LP 10	1654	4,5	1,69	18	12	12
		LP 11	1243	4,7	1,46	14	12	10
		LP 12	1224	4,7	1,46	14	11	10
		LP 13	1306	4,7	1,46	14	11	10
		LP 14	1326	4,6	1,57	14	9	11
		LP reference	0107	6,9	0,15	-	-	-

Πίνακας 30: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιεργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	LP 1	2011	4,40	1,81	18	11	14
		LP 2	2482	4,30	1,93	16	12	15
		LP 3	2102	4,40	1,81	17	12	14
		LP 4	2055	4,50	1,69	15	10	14
		LP 5	1877	4,70	1,46	15	11	12
		LP 6	2242	4,40	1,81	16	12	14
		LP 7	198	4,70	1,46	14	10	12

		LP 8	2104	4,40	1,81	15	10	14
		LP 9	2029	4,50	1,69	16	10	14
		LP 10	2505	4,30	1,93	18	12	15
		LP 11	2088	4,50	1,69	15	10	14
		LP 12	2377	4,30	1,93	17	11	15
		LP 13	2083	4,50	1,69	14	10	14
		LP 14	1755	4,60	1,57	14	10	13
		LP reference	1623	4,90	1,22	12	9	10
	48	LP 1	1754	4,40	1,81	15	11	14
		LP 2	2105	4,30	1,93	16	12	15
		LP 3	1656	4,40	1,81	16	11	14
		LP 4	1557	4,50	1,69	15	10	14
		LP 5	1560	4,70	1,46	15	11	12
		LP 6	1901	4,30	1,93	15	11	15
		LP 7	1721	4,60	1,57	13	9	13
		LP 8	1705	4,40	1,81	15	10	14
		LP 9	1803	4,40	1,81	15	11	14
		LP 10	1953	4,30	1,93	17	11	15
		LP 11	1610	4,50	1,69	15	9	14
		LP 12	1911	4,30	1,93	16	11	15
		LP 13	1752	4,50	1,69	14	9	14
		LP 14	1601	4,60	1,57	14	9	13
		LP reference	1221	4,90	1,22	12	9	10

Πίνακας 31: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	LP 1	1455	4,6	1,57	17	11	13
		LP 2	1955	4,5	1,69	15	10	14
		LP 3	1845	4,6	1,57	17	11	13
		LP 4	1413	4,7	1,46	14	9	12
		LP 5	1359	4,8	1,35	14	9	11
		LP 6	1980	4,5	1,69	15	11	14
		LP 7	1405	4,6	1,57	14	9	13

		LP 8	1584	4,6	1,57	14	9	13
		LP 9	1802	4,6	1,57	16	11	13
		LP 10	1904	4,5	1,69	16	11	14
		LP 11	1573	4,7	1,46	13	9	12
		LP 12	1655	4,7	1,46	17	10	12
		LP 13	1495	4,6	1,57	13	9	13
		LP 14	1554	4,6	1,57	14	9	13
		LP reference	0156	4,9	0,15	-	-	-
	48	LP 1	1371	4,6	1,57	14	10	13
		LP 2	1407	4,5	1,69	15	10	14
		LP 3	1274	4,6	1,57	15	11	13
		LP 4	1328	4,7	1,46	12	9	12
		LP 5	1265	4,8	1,35	13	9	11
		LP 6	1381	4,4	1,81	14	9	14
		LP 7	1256	4,6	1,57	13	9	13
		LP 8	1323	4,6	1,57	14	10	13
		LP 9	1710	4,6	1,57	15	10	13
		LP 10	1654	4,5	1,69	15	10	14
		LP 11	1243	4,7	1,46	13	8	12
		LP 12	1224	4,7	1,46	15	10	12
		LP 13	1306	4,7	1,46	13	9	12
		LP 14	1326	4,6	1,57	13	9	13
		LP reference	0107	6,9	0,15	-	-	-

Πίνακας 32: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιεργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhi</i>	24	LP 1	2011	4,40	1,81	24	17	16
		LP 2	2482	4,30	1,93	18	13	17
		LP 3	2102	4,40	1,81	16	13	16
		LP 4	2055	4,50	1,69	23	16	15
		LP 5	1877	4,70	1,46	18	13	11
		LP 6	2242	4,40	1,81	17	12	16
		LP 7	198	4,70	1,46	24	15	11

		LP 8	2104	4,40	1,81	17	11	16
		LP 9	2029	4,50	1,69	24	16	15
		LP 10	2505	4,30	1,93	20	13	17
		LP 11	2088	4,50	1,69	18	13	15
		LP 12	2377	4,30	1,93	29	15	17
		LP 13	2083	4,50	1,69	24	16	15
		LP 14	1755	4,60	1,57	15	11	14
		LP reference	1623	4,90	1,22	15	13	9
	48	LP 1	1754	4,40	1,81	23	15	16
		LP 2	2105	4,30	1,93	18	12	17
		LP 3	1656	4,40	1,81	17	13	16
		LP 4	1557	4,50	1,69	21	15	15
		LP 5	1560	4,70	1,46	17	13	11
		LP 6	1901	4,30	1,93	17	11	17
		LP 7	1721	4,60	1,57	21	15	14
		LP 8	1705	4,40	1,81	17	11	16
		LP 9	1803	4,40	1,81	23	15	16
		LP 10	1953	4,30	1,93	19	12	17
		LP 11	1610	4,50	1,69	17	13	15
		LP 12	1911	4,30	1,93	26	15	17
		LP 13	1752	4,50	1,69	21	13	15
		LP 14	1601	4,60	1,57	14	11	14
		LP reference	1221	4,90	1,22	15	13	9

Πίνακας 33: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. plantarum* (LP) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhi</i>	24	LP 1	1455	4,6	1,57	19	16	14
		LP 2	1955	4,5	1,69	16	12	15
		LP 3	1845	4,6	1,57	16	12	14
		LP 4	1413	4,7	1,46	22	13	11
		LP 5	1359	4,8	1,35	14	12	10
		LP 6	1980	4,5	1,69	16	12	15
		LP 7	1405	4,6	1,57	20	12	14

		LP 8	1584	4,6	1,57	15	9	14
		LP 9	1802	4,6	1,57	21	15	14
		LP 10	1904	4,5	1,69	18	12	15
		LP 11	1573	4,7	1,46	15	11	11
		LP 12	1655	4,7	1,46	23	15	11
		LP 13	1495	4,6	1,57	19	15	14
		LP 14	1554	4,6	1,57	15	11	14
		LP reference	0156	4,9	0,15	-	-	-
	48	LP 1	1371	4,6	1,57	17	15	14
		LP 2	1407	4,5	1,69	15	11	15
		LP 3	1274	4,6	1,57	15	12	14
		LP 4	1328	4,7	1,46	20	13	11
		LP 5	1265	4,8	1,35	16	12	10
		LP 6	1381	4,4	1,81	14	11	16
		LP 7	1256	4,6	1,57	19	11	14
		LP 8	1323	4,6	1,57	14	9	14
		LP 9	1710	4,6	1,57	19	14	14
		LP 10	1654	4,5	1,69	16	11	15
		LP 11	1243	4,7	1,46	14	11	11
		LP 12	1224	4,7	1,46	21	14	11
		LP 13	1306	4,7	1,46	18	12	11
		LP 14	1326	4,6	1,57	15	11	14
		LP reference	0107	6,9	0,15	-	-	-

Πίνακας 34: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	LC 1	2653	4,2	1,85	13	-	12
		LC 2	2665	4,2	1,85	14	-	12
		LC 3	2578	4,3	1,74	15	-	12
		LC 4	2375	4,5	1,49	16	-	11
		LC 5	2463	4,5	1,49	14	-	11
		LC 6	2345	4,7	1,25	13	-	-

		LC 7	2680	4,3	1,74	14	-	12
		LC 8	2127	4,4	1,62	13	-	11
		LC 9	2651	4,2	1,85	15	-	12
		LC reference	2270	4,4	1,62	14	-	11
	48	LC 1	2540	4,2	1,85	13	-	12
		LC 2	2570	4,2	1,85	13	-	12
		LC 3	2413	4,3	1,74	14	-	12
		LC 4	2212	4,5	1,49	16	9	11
		LC 5	2327	4,5	1,49	15	9	11
		LC 6	2117	4,7	1,25	13	-	-
		LC 7	2530	4,3	1,74	15	9	12
		LC 8	2250	4,4	1,62	13	-	11
		LC 9	2725	4,2	1,85	16	10	12
		LC reference	2120	4,4	1,62	13	-	11

Πίνακας 35: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	LC 1	2310	4,3	1,74	13	-	12
		LC 2	2380	4,3	1,74	13	-	12
		LC 3	2321	4,4	1,36	12	-	11
		LC 4	2204	4,6	1,36	13	-	9

		LC 5	2070	4,3	1,74	14	9	12
		LC 6	2513	4,3	1,74	13	-	12
		LC 7	2548	4,3	1,74	14	-	12
		LC 8	2180	4,4	1,62	13	-	11
		LC 9	2680	4,2	1,85	14	9	12
		LC reference	0315	6,9	0,02	-	-	-
	48	LC 1	2121	4,3	1,74	13	-	12
		LC 2	2200	4,3	1,74	13	-	12
		LC 3	2130	4,4	1,36	13	-	11
		LC 4	1873	4,6	1,36	14	9	9
		LC 5	1680	4,3	1,74	15	9	12
		LC 6	1870	4,3	1,74	13	-	12
		LC 7	2490	4,3	1,74	14	-	12
		LC 8	2111	4,4	1,62	13	-	11
	LC 9	2711	4,1	1,93	14	9	13	
	LC reference	0215	6,9	0,02	-	-	-	

Πίνακας 36: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	LC 1	2653	4,2	1,85	21	9	15
		LC 2	2665	4,2	1,85	22	9	15
		LC 3	2578	4,3	1,74	16	9	14
		LC 4	2375	4,5	1,49	14	9	12
		LC 5	2463	4,5	1,49	15	9	12
		LC 6	2345	4,7	1,25	11	-	10

		LC 7	2680	4,3	1,74	21	11	14
		LC 8	2127	4,4	1,62	13	9	13
		LC 9	2651	4,2	1,85	22	11	15
		LC reference	2270	4,4	1,62	14	9	13
	48	LC 1	2540	4,2	1,85	20	11	15
		LC 2	2570	4,2	1,85	22	12	15
		LC 3	2413	4,3	1,74	17	10	14
		LC 4	2212	4,5	1,49	14	9	12
		LC 5	2327	4,5	1,49	15	9	12
		LC 6	2117	4,7	1,25	14	10	10
		LC 7	2530	4,3	1,74	22	12	14
		LC 8	2250	4,4	1,62	15	9	13
		LC 9	2725	4,2	1,85	23	12	15
		LC reference	2120	4,4	1,62	14	9	13

Πίνακας 37: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	LC 1	2310	4,3	1,74	17	11	14
		LC 2	2380	4,3	1,74	19	11	14
		LC 3	2321	4,4	1,36	15	10	14
		LC 4	2204	4,6	1,36	12	9	11
		LC 5	2070	4,3	1,74	11	9	14
		LC 6	2513	4,3	1,74	12	-	14
		LC 7	2548	4,3	1,74	18	10	14

		LC 8	2180	4,4	1,62	14	9	13
		LC 9	2680	4,2	1,85	21	11	15
		LC reference	0315	6,9	0,02	-	-	-
	48	LC 1	2121	4,3	1,74	17	10	14
		LC 2	2200	4,3	1,74	17	11	14
		LC 3	2130	4,4	1,36	16	9	13
		LC 4	1873	4,6	1,36	11	9	11
		LC 5	1680	4,3	1,74	11	9	14
		LC 6	1870	4,3	1,74	12	9	14
		LC 7	2490	4,3	1,74	19	11	14
		LC 8	2111	4,4	1,62	16	10	13
		LC 9	2711	4,1	1,93	23	12	16
		LC reference	0215	6,9	0,02	-	-	-

Πίνακας 38: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	LC 1	2653	4,2	1,85	23	12	18
		LC 2	2665	4,2	1,85	25	12	18
		LC 3	2578	4,3	1,74	15	9	15
		LC 4	2375	4,5	1,49	25	13	14
		LC 5	2463	4,5	1,49	23	12	14
		LC 6	2345	4,7	1,25	12	9	12
		LC 7	2680	4,3	1,74	27	12	15
		LC 8	2127	4,4	1,62	27	12	14

		LC 9	2651	4,2	1,85	31	13	18
		LC reference	2270	4,4	1,62	17	10	14
	48	LC 1	2540	4,2	1,85	21	11	18
		LC 2	2570	4,2	1,85	19	10	18
		LC 3	2413	4,3	1,74	15	9	15
		LC 4	2212	4,5	1,49	22	12	14
		LC 5	2327	4,5	1,49	22	12	14
		LC 6	2117	4,7	1,25	12	9	12
		LC 7	2530	4,3	1,74	27	12	15
		LC 8	2250	4,4	1,62	25	12	14
		LC 9	2725	4,2	1,85	29	13	18
		LC reference	2120	4,4	1,62	16	10	14

Πίνακας 39: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella tiphimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. tiphimurium</i>	24	LC 1	2310	4,3	1,74	21	11	15
		LC 2	2380	4,3	1,74	24	12	15
		LC 3	2321	4,4	1,36	17	10	14
		LC 4	2204	4,6	1,36	23	12	13
		LC 5	2070	4,3	1,74	23	12	15
		LC 6	2513	4,3	1,74	17	-	15

		LC 7	2548	4,3	1,74	27	12	15
		LC 8	2180	4,4	1,62	23	11	14
		LC 9	2680	4,2	1,85	29	13	18
		LC reference	0315	6,9	0,02	-	-	-
	48	LC 1	2121	4,3	1,74	20	11	15
		LC 2	2200	4,3	1,74	19	10	15
		LC 3	2130	4,4	1,36	16	9	14
		LC 4	1873	4,6	1,36	21	12	13
		LC 5	1680	4,3	1,74	21	12	15
		LC 6	1870	4,3	1,74	11	-	15
		LC 7	2490	4,3	1,74	25	12	15
		LC 8	2111	4,4	1,62	21	11	14
		LC 9	2711	4,1	1,93	25	12	19
		LC reference	0215	6,9	0,02	-	-	-

Πίνακας 40: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhi</i>	24	LC 1	2653	4,2	1,85	24	11	18
		LC 2	2665	4,2	1,85	25	12	18
		LC 3	2578	4,3	1,74	18	9	17
		LC 4	2375	4,5	1,49	27	13	15

		LC 5	2463	4,5	1,49	26	13	15
		LC 6	2345	4,7	1,25	15	9	13
		LC 7	2680	4,3	1,74	29	13	17
		LC 8	2127	4,4	1,62	31	14	16
		LC 9	2651	4,2	1,85	29	14	18
		LC reference	2270	4,4	1,62	20	10	16
	48	LC 1	2540	4,2	1,85	23	10	18
		LC 2	2570	4,2	1,85	22	10	18
		LC 3	2413	4,3	1,74	18	9	17
		LC 4	2212	4,5	1,49	24	11	15
		LC 5	2327	4,5	1,49	23	11	15
		LC 6	2117	4,7	1,25	16	9	11
		LC 7	2530	4,3	1,74	27	13	17
		LC 8	2250	4,4	1,62	27	13	16
		LC 9	2725	4,2	1,85	27	13	18
LC reference	2120	4,4	1,62	19	10	16		

Πίνακας 41: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *L. paracasei subsp. paracasei* (LC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella tphi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. tphi</i>	24	LC 1	2310	4,3	1,74	23	10	17
		LC 2	2380	4,3	1,74	25	12	17
		LC 3	2321	4,4	1,36	17	10	16
		LC 4	2204	4,6	1,36	27	13	14
		LC 5	2070	4,3	1,74	25	11	17
		LC 6	2513	4,3	1,74	18	10	17
		LC 7	2548	4,3	1,74	27	13	17

		LC 8	2180	4,4	1,62	27	13	16
		LC 9	2680	4,2	1,85	29	14	18
		LC reference	0315	6,9	0,02	-	-	-
	48	LC 1	2121	4,3	1,74	23	10	17
		LC 2	2200	4,3	1,74	21	10	17
		LC 3	2130	4,4	1,36	17	9	16
		LC 4	1873	4,6	1,36	23	11	14
		LC 5	1680	4,3	1,74	23	11	17
		LC 6	1870	4,3	1,74	18	9	17
		LC 7	2490	4,3	1,74	27	13	17
		LC 8	2111	4,4	1,62	23	11	16
		LC 9	2711	4,1	1,93	25	13	18
		LC reference	0215	6,9	0,02	-	-	-

Πίνακας 42: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S arizonae</i>	24	EFC 1	1210	4,9	0,52	10	-	-
		EFC 2	1170	4,9	0,52	10	6	-
		EFC 3	1420	4,9	0,52	8	-	-
		EFC 4	1307	4,9	0,52	10	6	-
		EFC 5	2060	4,4	1,11	13	-	11
		EFC 6	2155	4,4	1,11	12	7	11
		EFC 7	1140	4,0	0,48	13	6	-
		EFC 8	1178	4,9	0,52	13	-	-
		EFC 9	1210	4,9	0,52	15	6	-

		EFC 10	1420	4,8	0,57	7	-	-
		EFC 11	1308	4,9	0,52	7	-	-
		EFC 12	1285	4,9	0,52	7	-	-
		EFC 13	1412	4,9	0,52	10	6	-
		EFC 14	1173	5,0	0,48	13	6	-
		EFC reference	1238	4,9	0,52	7	-	-
	48	EFC 1	1280	4,8	1,24	10	-	-
	48	EFC 2	1220	4,9	0,57	11	6	-
	48	EFC 3	1455	4,9	0,52	8	-	-
	48	EFC 4	1355	4,9	0,52	11	6	-
	48	EFC 5	2210	4,3	1,24	14	6	12
	48	EFC 6	2225	4,3	1,24	13	7	12
	48	EFC 7	1265	4,8	0,57	14	7	-
	48	EFC 8	1215	4,9	0,52	11	-	-
	48	EFC 9	1261	4,9	0,52	16	7	-
	48	EFC 10	1469	4,8	0,57	-	-	-
	48	EFC 11	1325	4,9	0,52	7	-	-
	48	EFC 12	1311	4,9	0,52	8	-	-
	48	EFC 13	1452	4,9	0,52	10	6	-
	48	EFC 14	1185	5,0	0,48	13	6	-
	48	EFC reference	1310	4,9	0,52	8	-	-

Πίνακας 43: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S arizonae</i>	24	EFC 1	1180	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 2	1065	5,0	0,48	10	6	-
		EFC 3	1375	4,9	0,52	8	-	-
		EFC 4	1224	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 5	1958	4,4	1,11	13	-	11
		EFC 6	2050	4,5	0,96	12	6	10
		EFC 7	1117	5,0	0,48	12	6	-
		EFC 8	1142	5,0	0,48	11	-	-
		EFC 9	1155	5,0	0,48	14	-	-

		EFC 10	1202	4,9	0,52	-	-	-
		EFC 11	1265	4,8	0,57	7	-	-
		EFC 12	1267	4,9	0,52	8	-	-
		EFC 13	1268	5,0	0,48	9	-	-
		EFC 14	1106	5,0	0,48	13	-	-
		EFC reference	1220	4,9	0,52	6	-	-
	48	EFC 1	1075	4,9	0,52	8	-	-
	48	EFC 2	1032	4,0	0,48	10	6	-
	48	EFC 3	1327	4,9	0,52	8	-	-
	48	EFC 4	1206	4,9	0,52	9	-	-
	48	EFC 5	1962	4,4	1,11	13	-	11
	48	EFC 6	1987	4,5	0,96	12	6	10
	48	EFC 7	1184	4,9	0,52	12	6	-
	48	EFC 8	1110	4,0	0,48	11	-	-
	48	EFC 9	1208	4,9	0,52	14	-	-
	48	EFC 10	1188	4,9	0,52	-	-	-
	48	EFC 11	1212	4,8	0,57	8	-	-
	48	EFC 12	1241	4,9	0,52	8	-	-
	48	EFC 13	1222	5,0	0,48	9	-	-
	48	EFC 14	1088	5,0	0,48	13	-	-
	48	EFC reference	1166	4,9	0,52	6	-	-

Πίνακας 44: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	EFC 1	1210	4,9	0,52	12	7	-
		EFC 2	1170	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 3	1420	4,9	0,52	11	-	-
		EFC 4	1307	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 5	2060	4,4	1,11	18	8	13
		EFC 6	2155	4,4	1,11	20	-	13
		EFC 7	1140	4,0	0,48	13	-	-
		EFC 8	1178	4,9	0,52	12	-	-
		EFC 9	1210	4,9	0,52	11	6	-
		EFC 10	1420	4,8	0,57	15	-	9
		EFC 11	1308	4,9	0,52	12	-	-

		EFC 12	1285	4,9	0,52	14	7	-	
		EFC 13	1412	4,9	0,52	12	-	-	
		EFC 14	1173	5,0	0,48	9	6	-	
		EFC reference	1238	4,9	0,52	10	-	-	
	48	EFC 1	1280	4,8	1,24	12	7	9	
		EFC 2	1220	4,9	0,57	9	-	-	
		EFC 3	1455	4,9	0,52	11	-	-	
		EFC 4	1355	4,9	0,52	9	-	-	
		EFC 5	2210	4,3	1,24	18	8	14	
		EFC 6	2225	4,3	1,24	21	6	14	
		EFC 7	1265	4,8	0,57	14	6	9	
		EFC 8	1215	4,9	0,52	12	-	-	
		EFC 9	1261	4,9	0,52	12	6	-	
		EFC 10	1469	4,8	0,57	15	-	9	
		48	EFC 11	1325	4,9	0,52	12	-	-
			EFC 12	1311	4,9	0,52	14	7	-
	EFC 13		1452	4,9	0,52	12	-	-	
	EFC 14		1185	50	0,48	9	6	-	
	EFC reference		1310	4,9	0,52	11	-	-	

Πίνακας 45: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	EFC 1	1180	4,9	0,52	10	7	-
		EFC 2	1065	5,0	0,48	9	-	-
		EFC 3	1375	4,9	0,52	10	-	-
		EFC 4	1224	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 5	1958	4,4	1,11	17	6	13
		EFC 6	2050	4,5	0,96	16	-	12
		EFC 7	1117	5,0	0,48	10	-	-
		EFC 8	1142	5,0	0,48	10	-	-
		EFC 9	1155	5,0	0,48	11	-	-
		EFC 10	1202	4,9	0,52	14	-	9
		EFC 11	1265	4,8	0,57	10	-	-
		EFC 12	1267	4,9	0,52	13	7	-

		EFC 13	1268	5,0	0,48	10	-	-
		EFC 14	1106	5,0	0,48	9	6	-
		EFC reference	1220	4,9	0,52	10	-	-
	48	EFC 1	1075	4,9	0,52	10	7	-
		EFC 2	1032	4,0	0,48	9	-	-
		EFC 3	1327	4,9	0,52	10	-	-
		EFC 4	1206	4,9	0,52	9	-	-
		EFC 5	1962	4,4	1,11	17	6	13
		EFC 6	1987	4,5	0,96	16	-	12
		EFC 7	1184	4,9	0,52	10	-	-
		EFC 8	1110	4,0	0,48	10	-	-
		EFC 9	1208	4,9	0,52	11	-	-
		EFC 10	1188	4,9	0,52	14	-	-
		EFC 11	1212	4,8	0,57	10	-	-
		EFC 12	1241	4,9	0,52	13	-	-
		EFC 13	1222	5,0	0,48	10	-	-
		EFC 14	1088	5,0	0,48	9	-	-
	EFC reference	1166	4,9	0,52	10	-	-	
	48							

Πίνακας 46: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	EFC 1	1210	4,9	0,52	15	7	10
		EFC 2	1170	4,9	0,52	16	7	10
		EFC 3	1420	4,9	0,52	19	7	10
		EFC 4	1307	4,9	0,52	14	7	10
		EFC 5	2060	4,4	1,11	13	-	14
		EFC 6	2155	4,4	1,11	19	-	14
		EFC 7	1140	4,0	0,48	20	7	-
		EFC 8	1178	4,9	0,52	22	-	10
		EFC 9	1210	4,9	0,52	15	7	10
		EFC 10	1420	4,8	0,57	23	-	10
		EFC 11	1308	4,9	0,52	18	8	10
		EFC 12	1285	4,9	0,52	17	7	10
		EFC 13	1412	4,9	0,52	20	-	10
		EFC 14	1173	5,0	0,48	12	6	-
		EFC reference	1238	4,9	0,52	12	7	10

		EFC 1	1280	4,8	1,24	16	7	11
		EFC 2	1220	4,9	0,57	16	7	10
		EFC 3	1455	4,9	0,52	19	7	10
		EFC 4	1355	4,9	0,52	14	7	10
		EFC 5	2210	4,3	1,24	13	-	15
		EFC 6	2225	4,3	1,24	19	-	15
	48	EFC 7	1265	4,8	0,57	20	7	10
		EFC 8	1215	4,9	0,52	23	-	10
		EFC 9	1261	4,9	0,52	15	7	10
		EFC 10	1469	4,8	0,57	23	-	11
		EFC 11	1325	4,9	0,52	17	8	10
		EFC 12	1311	4,9	0,52	18	7	10
		EFC 13	1452	4,9	0,52	21	-	10
	48	EFC 14	1185	50	0,48	12	6	-
		EFC reference	1310	4,9	0,52	13	7	10

Πίνακας 47: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	EFC 1	1180	4,9	0,52	12	7	10
		EFC 2	1065	5,0	0,48	14	6	-
		EFC 3	1375	4,9	0,52	15	7	10
		EFC 4	1224	4,9	0,52	13	6	10
		EFC 5	1958	4,4	1,11	18	-	14
		EFC 6	2050	4,5	0,96	14	-	13
		EFC 7	1117	5,0	0,48	17	7	-
		EFC 8	1142	5,0	0,48	18	-	-
		EFC 9	1155	5,0	0,48	14	7	-
		EFC 10	1202	4,9	0,52	24	-	10
		EFC 11	1265	4,8	0,57	16	8	11
		EFC 12	1267	4,9	0,52	17	7	10
		EFC 13	1268	5,0	0,48	17	-	-
		EFC 14	1106	5,0	0,48	11	-	-
	EFC reference	1220	4,9	0,52	12	7	10	
		EFC 1	1075	4,9	0,52	12	7	10

	48	EFC 2	1032	4,0	0,48	14	6	-
		EFC 3	1327	4,9	0,52	15	7	10
		EFC 4	1206	4,9	0,52	13	6	10
		EFC 5	1962	4,4	1,11	17	-	14
		EFC 6	1987	4,5	0,96	17	7	13
		EFC 7	1184	4,9	0,52	17	7	10
		EFC 8	1110	4,0	0,48	18	-	-
		EFC 9	1208	4,9	0,52	14	7	10
		EFC 10	1188	4,9	0,52	24	-	10
		EFC 11	1212	4,8	0,57	16	8	11
	EFC 12	1241	4,9	0,52	17	7	10	
	EFC 13	1222	5,0	0,48	17	-	-	
	EFC 14	1088	5,0	0,48	11	-	-	
	EFC reference	1166	4,9	0,52	11	7	10	

Πίνακας 48: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhi</i>	24	EFC 1	1210	4,9	0,52	11	6	11
		EFC 2	1170	4,9	0,52	12	7	11
		EFC 3	1420	4,9	0,52	16	7	11
		EFC 4	1307	4,9	0,52	12	7	11
		EFC 5	2060	4,4	1,11	13	8	16
		EFC 6	2155	4,4	1,11	19	8	16
		EFC 7	1140	4,0	0,48	22	7	-
		EFC 8	1178	4,9	0,52	25	8	11
		EFC 9	1210	4,9	0,52	15	7	11
		EFC 10	1420	4,8	0,57	23	-	12
		EFC 11	1308	4,9	0,52	29	8	11
		EFC 12	1285	4,9	0,52	18	-	11
		EFC 13	1412	4,9	0,52	28	8	11
		EFC 14	1173	5,0	0,48	13	-	-
	EFC reference	1238	4,9	0,52	14	-	11	
		EFC 1	1280	4,8	1,24	12	6	12

		EFC 2	1220	4,9	0,57	12	7	11
		EFC 3	1455	4,9	0,52	15	7	11
		EFC 4	1355	4,9	0,52	13	7	11
		EFC 5	2210	4,3	1,24	13	8	11
		EFC 6	2225	4,3	1,24	18	8	17
	48	EFC 7	1265	4,8	0,57	21	7	17
		EFC 8	1215	4,9	0,52	23	8	12
		EFC 9	1261	4,9	0,52	14	7	11
		EFC 10	1469	4,8	0,57	21	-	11
		EFC 11	1325	4,9	0,52	29	8	11
		EFC 12	1311	4,9	0,52	16	-	11
	48	EFC 13	1452	4,9	0,52	28	8	11
		EFC 14	1185	50	0,48	13	-	-
		EFC reference	1310	4,9	0,52	14	-	11

Πίνακας 49: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecium* (EFC) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	
<i>S. typhi</i>	24	EFC 1	1180	4,9	0,52	13	7	11	
		EFC 2	1065	5,0	0,48	10	7	-	
		EFC 3	1375	4,9	0,52	12	8	11	
		EFC 4	1224	4,9	0,52	13	7	11	
		EFC 5	1958	4,4	1,11	17	6	16	
		EFC 6	2050	4,5	0,96	17	7	15	
		EFC 7	1117	5,0	0,48	12	-	-	
		EFC 8	1142	5,0	0,48	15	7	-	
		EFC 9	1155	5,0	0,48	12	7	-	
		EFC 10	1202	4,9	0,52	15	-	11	
		EFC 11	1265	4,8	0,57	23	10	12	
		EFC 12	1267	4,9	0,52	15	-	11	
		EFC 13	1268	5,0	0,48	21	-	-	
		EFC 14	1106	5,0	0,48	7	-	-	
		EFC reference	1220	4,9	0,52	12	10	11	
			EFC 1	1075	4,9	0,52	13	7	11
			EFC 2	1032	4,0	0,48	10	7	-

	48	EFC 3	1327	4,9	0,52	12	8	11
		EFC 4	1206	4,9	0,52	13	7	11
		EFC 5	1962	4,4	1,11	18	6	16
		EFC 6	1987	4,5	0,96	16	7	15
		EFC 7	1184	4,9	0,52	16	7	11
		EFC 8	1110	4,0	0,48	15	7	-
		EFC 9	1208	4,9	0,52	12	7	11
		EFC 10	1188	4,9	0,52	15	-	11
		EFC 11	1212	4,8	0,57	23	10	12
	48	EFC 12	1241	4,9	0,52	15	-	11
		EFC 13	1222	5,0	0,48	21	-	-
		EFC 14	1088	5,0	0,48	9	-	-
		EFC reference	1166	4,9	0,52	13	-	11

Πίνακας 50: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	EFL 1	1310	4,7	0,7	13	9	-
		EFL 2	1633	4,4	1,18	12	9	11
		EFL 3	1286	4,7	0,7	9	-	-
		EFL 4	1334	4,7	0,7	9	-	-
		EFL 5	1211	4,8	0,63	-	-	-
		EFL 6	1171	4,8	0,63	12	-	-
		EFL 7	1423	4,6	0,8	15	-	9
		EFL 8	1308	4,7	0,7	12	-	-
		EFL 9	1280	4,7	0,7	11	-	-
		EFL 10	1310	4,7	0,7	12	-	-
		EFL 11	1168	4,8	0,63	13	-	-
		EFL reference	1120	4,9	0,51	-	-	-
	48	EFL 1	1715	4,3	1,34	15	10	12
		EFL 2	2152	4,1	1,53	14	10	13
		EFL 3	1302	4,7	0,7	9	-	-
		EFL 4	1383	4,6	0,8	9	-	9
		EFL 5	1262	4,8	0,63	-	-	-
		EFL 6	1220	4,8	0,63	11	-	-
		EFL 7	1472	4,6	0,8	14	-	9

		EFL 8	1610	4,4	1,18	15	-	11
		EFL 9	1300	4,7	0,7	11	-	-
		EFL 10	1365	4,6	0,8	12	-	9
		EFL 11	1215	4,8	0,63	13	-	-
		EFL reference	1138	4,9	0,51	-	-	-

Πίνακας 51: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella arizonae*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. arizonae</i>	24	EFL 1	1301	4,7	0,70	13	9	-
		EFL 2	1517	4,5	1,00	14	9	10
		EFL 3	1520	4,5	1,00	9	-	10
		EFL 4	1275	4,7	0,70	11	-	-
		EFL 5	1155	4,9	0,51	-	-	-
		EFL 6	1145	4,9	0,51	11	-	-
		EFL 7	1451	4,6	0,80	11	8	9
		EFL 8	1295	4,7	0,70	-	-	-
		EFL 9	1510	4,5	1,00	11	-	10
		EFL 10	1267	4,7	0,70	9	-	-
		EFL 11	1127	4,9	0,51	11	-	-
		EFL reference	1005	5	0,45	-	-	-
	48	EFL 1	1690	4,3	1,34	15	10	12
		EFL 2	1805	4,2	1,41	15	10	12
		EFL 3	1281	4,5	1,00	7	-	-
		EFL 4	1312	4,7	0,70	11	-	-
		EFL 5	1210	4,8	0,63	-	-	-
		EFL 6	1211	4,8	0,51	11	-	-
		EFL 7	1470	4,6	0,80	11	8	9

		EFL 8	1575	4,4	1,18	12	6	11
		EFL 9	1278	4,5	1,00	11	-	10
		EFL 10	1312	4,7	0,70	9	-	-
		EFL 11	1190	4,8	0,63	11	-	-
		EFL reference	908	5	0,45	-	-	-

Πίνακας 52: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S enteritidis</i>	24	EFL 1	1310	4,7	0,7	12	-	10
		EFL 2	1633	4,4	1,18	15	9	13
		EFL 3	1286	4,7	0,7	13	-	10
		EFL 4	1334	4,7	0,7	12	-	10
		EFL 5	1211	4,8	0,63	11	-	9
		EFL 6	1171	4,8	0,63	11	-	9
		EFL 7	1423	4,6	0,8	15	8	11
		EFL 8	1308	4,7	0,7	15	-	10
		EFL 9	1280	4,7	0,7	12	-	10
		EFL 10	1310	4,7	0,7	12	-	10
		EFL 11	1168	4,8	0,63	12	-	9
		EFL reference	1120	4,9	0,51	-	-	-
	48	EFL 1	1715	4,3	1,34	16	6	14
		EFL 2	2152	4,1	1,53	17	10	16
		EFL 3	1302	4,7	0,7	13	-	10
		EFL 4	1383	4,6	0,8	12	-	11
		EFL 5	1262	4,8	0,63	11	-	9
		EFL 6	1220	4,8	0,63	12	-	9
		EFL 7	1472	4,6	0,8	15	8	11
		EFL 8	1610	4,4	1,18	17	-	13

		EFL 9	1300	4,7	0,7	12	-	10
		EFL 10	1365	4,6	0,8	13	-	11
		EFL 11	1215	4,8	0,63	13	-	9
		EFL reference	1138	4,9	0,51	-	-	-

Πίνακας 53: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella enteritidis*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. enteritidis</i>	24	EFL 1	1301	4,7	0,70	16	9	10
		EFL 2	1517	4,5	1,00	17	9	12
		EFL 3	1520	4,5	1,00	13	-	12
		EFL 4	1275	4,7	0,70	15	-	10
		EFL 5	1155	4,9	0,51	12	-	-
		EFL 6	1145	4,9	0,51	12	-	-
		EFL 7	1451	4,6	0,80	15	-	11
		EFL 8	1295	4,7	0,70	15	9	10
		EFL 9	1510	4,5	1,00	15	-	12
		EFL 10	1267	4,7	0,70	15	-	10
		EFL 11	1127	4,9	0,51	15	-	-
		EFL reference	1005	5	0,45	-	-	-
	48	EFL 1	1690	4,3	1,34	18	9	14
		EFL 2	1805	4,2	1,41	18	9	15
		EFL 3	1281	4,5	1,00	13	-	12
		EFL 4	1312	4,7	0,70	15	-	10
		EFL 5	1210	4,8	0,63	12	-	9
		EFL 6	1211	4,8	0,51	13	-	9
		EFL 7	1470	4,6	0,80	14	-	11
		EFL 8	1575	4,4	1,18	16	9	13
		EFL 9	1278	4,5	1,00	13	-	12

		EFL 10	1312	4,7	0,70	15	-	10
		EFL 11	1190	4,8	0,63	16	-	9
		EFL reference	908	5	0,45	-	-	-

Πίνακας 54: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S typhimurium</i>	24	EFL 1	1310	4,7	0,7	14	10	12
		EFL 2	1633	4,4	1,18	15	10	14
		EFL 3	1286	4,7	0,7	15	11	12
		EFL 4	1334	4,7	0,7	13	-	12
		EFL 5	1211	4,8	0,63	13	-	11
		EFL 6	1171	4,8	0,63	15	-	11
		EFL 7	1423	4,6	0,8	15	11	13
		EFL 8	1308	4,7	0,7	14	9	12
		EFL 9	1280	4,7	0,7	15	9	12
		EFL 10	1310	4,7	0,7	15	-	12
		EFL 11	1168	4,8	0,63	15	-	11
		EFL reference	1120	4,9	0,51	12	-	-
	48	EFL 1	1715	4,3	1,34	15	10	15
		EFL 2	2152	4,1	1,53	16	10	19
		EFL 3	1302	4,7	0,7	15	11	12
		EFL 4	1383	4,6	0,8	13	-	13
		EFL 5	1262	4,8	0,63	13	-	11
		EFL 6	1220	4,8	0,63	15	-	11
		EFL 7	1472	4,6	0,8	15	11	13
		EFL 8	1610	4,4	1,18	17	10	14
		EFL 9	1300	4,7	0,7	15	9	12
		EFL 10	1365	4,6	0,8	15	-	13

		EFL 11	1215	4,8	0,63	15	-	11
		EFL reference	1138	4,9	0,51	12	-	-

Πίνακας 55: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhimurium*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhimurium</i>	24	EFL 1	1301	4,7	0,70	16	10	12
		EFL 2	1517	4,5	1,00	20	11	13
		EFL 3	1520	4,5	1,00	14	9	13
		EFL 4	1275	4,7	0,70	15	9	12
		EFL 5	1155	4,9	0,51	15	9	10
		EFL 6	1145	4,9	0,51	14	-	10
		EFL 7	1451	4,6	0,80	16	10	13
		EFL 8	1295	4,7	0,70	15	-	12
		EFL 9	1510	4,5	1,00	15	-	13
		EFL 10	1267	4,7	0,70	15	-	12
		EFL 11	1127	4,9	0,51	13	-	10
		EFL reference	1005	5	0,45	11	-	-
	48	EFL 1	1690	4,3	1,34	18	12	15
		EFL 2	1805	4,2	1,41	24	13	18
		EFL 3	1281	4,5	1,00	10	9	13
		EFL 4	1312	4,7	0,70	15	9	12
		EFL 5	1210	4,8	0,63	15	9	11
		EFL 6	1211	4,8	0,51	15	-	11
		EFL 7	1470	4,6	0,80	16	10	13
		EFL 8	1575	4,4	1,18	18	7	14
		EFL 9	1278	4,5	1,00	14	-	13
		EFL 10	1312	4,7	0,70	15	-	12
EFL 11	1190	4,8	0,63	13	-	11		

		EFL reference	908	5	0,45	11	-	-
--	--	---------------	-----	---	------	----	---	---

Πίνακας 56: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 37° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S typhi</i>	24	EFL 1	1310	4,7	0,7	15	10	13
		EFL 2	1633	4,4	1,18	19	12	16
		EFL 3	1286	4,7	0,7	14	9	13
		EFL 4	1334	4,7	0,7	15	-	13
		EFL 5	1211	4,8	0,63	14	-	12
		EFL 6	1171	4,8	0,63	17	-	12
		EFL 7	1423	4,6	0,8	18	11	14
		EFL 8	1308	4,7	0,7	18	-	13
		EFL 9	1280	4,7	0,7	15	-	13
		EFL 10	1310	4,7	0,7	17	-	13
		EFL 11	1168	4,8	0,63	15	-	12
		EFL reference	1120	4,9	0,51	12	-	11
	48	EFL 1	1715	4,3	1,34	19	12	17
		EFL 2	2152	4,1	1,53	20	13	18
		EFL 3	1302	4,7	0,7	15	9	13
		EFL 4	1383	4,6	0,8	16	-	14
		EFL 5	1262	4,8	0,63	15	-	12
		EFL 6	1220	4,8	0,63	17	-	12
		EFL 7	1472	4,6	0,8	19	11	14
		EFL 8	1610	4,4	1,18	20	7	16
		EFL 9	1300	4,7	0,7	15	-	13
		EFL 10	1365	4,6	0,8	19	-	14
		EFL 11	1215	4,8	0,63	16	-	12
EFL reference	1138	4,9	0,51	14	-	11		

Πίνακας 57: Δημιουργία ζωνών αναστολής (σε mm) λόγω δράσης στελεχών καλλιέργειών του *E. faecalis* (EFL) σε θ. 45° C, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, σε συνάρτηση με την OD, pH και οξύτητα (%) της καλλιέργειας επί της *Salmonella typhi*.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΧΡΟΝΟΣ(Η)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ LAB	OD	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ(%)	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	ΥΠΕΡΚ. ΥΓΡΟ	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
<i>S. typhi</i>	24	EFL 1	1301	4,7	0,70	19	12	13
		EFL 2	1517	4,5	1,00	20	15	15
		EFL 3	1520	4,5	1,00	15	11	15
		EFL 4	1275	4,7	0,70	15	12	13
		EFL 5	1155	4,9	0,51	15	-	11
		EFL 6	1145	4,9	0,51	16	11	11
		EFL 7	1451	4,6	0,80	18	11	14
		EFL 8	1295	4,7	0,70	18	12	13
		EFL 9	1510	4,5	1,00	17	-	15
		EFL 10	1267	4,7	0,70	16	-	13
		EFL 11	1127	4,9	0,51	14	-	11
		EFL reference	1005	5	0,45	11	-	-
	48	EFL 1	1690	4,3	1,34	23	17	17
		EFL 2	1805	4,2	1,41	24	19	18
		EFL 3	1281	4,5	1,00	17	11	15
		EFL 4	1312	4,7	0,70	16	12	13
		EFL 5	1210	4,8	0,63	15	-	12
		EFL 6	1211	4,8	0,51	16	11	12
		EFL 7	1470	4,6	0,80	18	11	14
		EFL 8	1575	4,4	1,18	20	13	16
		EFL 9	1278	4,5	1,00	16	-	15
		EFL 10	1312	4,7	0,70	16	-	13
		EFL 11	1190	4,8	0,63	14	-	12
EFL reference	908	5	0,45	9	-	-		

Αποτελέσματα

Πίνακας 58: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. plantarum* 37° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	16,07 (4,01)	23,57 (3,18)	15,71 (1,38)	20,50 (4,13)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	11,57 (2,24)	17,14 (2,96)	10,79 (0,89)	13,86 (1,96)
Γαλακτ.οξύ (S.D.)	10,21 (2,33)	12,36 (1,34)	13,86 (0,95)	15,07 (1,94)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 59: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. plantarum* 37° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	14,57 (3,08)	22,00 (2,66)	15,07 (0,99)	19,36 (3,25)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	10,43 (3,03)	15,50 (3,67)	10,36 (1,01)	13,14 (1,61)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	10,57 (0,87)	12,57 (1,28)	14,00 (0,88)	15,43 (1,65)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 60: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. plantarum* 45° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	15,50 (3,90)	18,86 (2,35)	14,93 (1,44)	17,79 (2,91)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	11,14 (2,25)	14,29 (2,27)	9,86 (0,95)	12,64 (1,94)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	8,29 (2,30)	10,86 (0,86)	12,86 (0,86)	13,29 (1,72)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 61: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. plantarum* 45° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	13,86 (3,06)	16,43 (2,14)	13,86 (1,03)	16,64 (2,37)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	9,71 (3,10)	12,21 (2,86)	9,50 (0,76)	11,93 (1,59)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	8,00 (2,45)	10,86 (1,03)	12,79 (0,89)	13,14 (1,92)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 62: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	14,11 (1,05)	17,22 (4,29)	23,11 (6,01)	24,89 (5,28)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	5,00 (0,00)	9,00 (1,73)	11,56 (1,51)	12,00 (1,94)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	10,89 (2,26)	13,33 (1,73)	15,33 (2,18)	16,33 (1,73)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 63: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	14,22 (1,30)	18,00 (3,74)	21,33 (5,45)	23,00 (3,94)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	6,89 (2,26)	10,44 (1,33)	11,11 (1,45)	11,00 (1,66)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	10,89 (2,26)	13,33 (1,73)	15,33 (2,18)	16,11 (2,26)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 64: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. paracasei subsp. paracasei* 45° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	13,22 (0,67)	15,44 (3,50)	32,67 (4,00)	24,22 (4,18)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	5,89 (1,76)	9,44 (1,88)	10,89 (2,37)	11,78 (1,56)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	11,44 (1,09)	13,67 (1,12)	14,89 (1,36)	16,56 (1,13)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 65: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *L. paracasei subsp. paracasei* 45° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	13,56 (0,73)	15,78 (3,96)	19,89 (4,34)	22,22 (3,15)
Υπερκ. υγρό (S.D.)	6,33 (2,00)	10,00 (1,11)	10,44 (2,30)	10,78 (1,48)
Γαλακτ. οξύ (S.D.)	11,56 (1,13)	13,67 (1,32)	15,00 (1,66)	16,56 (1,13)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 66: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecium* 37° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,57 (2,65)	12,64 (2,25)	17,36 (3,34)	18,29 (6,17)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	5,57 (0,64)	5,64 (1,01)	6,29 (1,07)	6,86 (1,17)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	5,86 (2,18)	6,43 (2,98)	9,86 (2,51)	10,93 (3,07)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 67: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecium* 37° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,79 (3,07)	12,86 (3,42)	17,57 (3,48)	17,71 (5,81)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	5,79 (0,80)	5,79 (0,97)	6,29 (1,07)	6,86 (1,17)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	6,00 (2,54)	7,14 (3,35)	10,50 (2,34)	11,57 (2,85)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 68: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecium* 45° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,00 (2,60)	11,29 (2,64)	15,71 (3,24)	14,43 (4,18)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	5,21 (0,43)	5,43 (0,76)	6,07 (1,07)	6,50 (1,45)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	5,79 (2,00)	6,36 (2,82)	8,43 (3,30)	9,14 (4,02)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 69: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecium* 45° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,00 (2,57)	11,29 (2,64)	15,86 (3,18)	14,86 (3,90)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	5,21 (0,43)	5,21 (0,58)	6,21 (1,05)	6,64 (1,39)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	5,79 (2,00)	6,36 (2,82)	9,14 (2,98)	10,00 (3,64)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 70: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecalis* 37° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	11,18 (2,68)	12,73 (1,55)	14,45 (0,82)	16,09 (1,76)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	5,73 (1,62)	5,64 (1,43)	7,73 (2,69)	7,00 (2,86)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	5,99 (2,07)	10,09 (1,14)	12,00 (0,89)	13,09 (1,14)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 71: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecalis* 37° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	11,64 (3,07)	13,73 (2,15)	14,91 (1,34)	17,36 (2,06)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	6,00 (2,00)	5,82 (1,66)	7,82 (2,75)	7,45 (3,21)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	8,00 (3,13)	11,18 (2,27)	13,09 (2,34)	14,09 (2,07)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 72: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecalis* 45° C 24 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,00 (1,86)	14,55 (1,57)	15,27 (1,79)	16,63 (1,91)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	6,00 (1,73)	6,09 (1,87)	7,55 (2,50)	9,45 (3,70)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	6,72 (2,41)	9,27 (2,87)	11,82 (1,25)	13,09 (1,57)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Πίνακας 73: Ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA) των αποτελεσμάτων των ζωνών αναστολής των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος σε συσχέτιση με OD, pH και οξύτητα %, έναντι των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων. Τυπική απόκλιση (SD). *E. faecalis* 45° C 48 h.

	<i>S. arizonae</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
Καλλιέργειες (S.D.)	10,73 (1,97)	14,82 (2,04)	15,73 (3,52)	17,72 (3,26)
Υπερκείμενο υγρό (S.D.)	6,27 (2,05)	6,09 (1,87)	8,09 (2,91)	10,36 (4,95)
Γαλακτικό οξύ (S.D.)	7,64 (3,14)	11,27 (2,10)	13,00 (2,10)	14,27 (2,10)
P <	0,001	0,001	0,001	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 74: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,39	0,16	0,35	0,21	0,66	0,01
Ph	-0,44	0,11	-0,41	0,14	-0,89	0,001
Οξύτητα %	0,44	0,11	0,41	0,14	0,82	0,001

Πίνακας 75: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,33	0,24	0,27	0,35	0,61	0,02
Ph	-0,59	0,03	-0,35	0,22	-0,88	0,001
Οξύτητα %	0,59	0,02	0,35	0,21	0,87	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 76: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,61	0,02	0,55	0,42	0,63	0,01
Ph	-0,32	0,26	-0,21	0,47	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,32	0,25	0,21	0,46	0,95	0,001

Πίνακας 77: Συντελεστής συσχέτισης κατά Person των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,51	0,06	0,53	0,05	0,53	0,05
Ph	-0,31	0,30	-0,20	0,48	-0,92	0,001
Οξύτητα %	0,31	0,28	0,21	0,47	0,91	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 78: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,95	0,001	0,71	0,00	0,86	0,001
Ph	-0,82	0,001	-0,61	0,02	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,82	0,001	0,61	0,02	1,00	0,001

Πίνακας 79: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,73	0,001	0,47	0,08	0,79	0,001
Ph	-0,72	0,001	-0,37	0,18	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,72	0,001	0,37	0,18	1,00	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 80: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,40	0,16	0,70	0,00	0,72	0,001
Ph	-0,78	0,001	-0,69	0,00	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,78	0,001	0,69	0,00	1,00	0,001

Πίνακας 81: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,55	0,04	-0,02	0,95	0,47	0,09
Ph	-0,77	0,001	-0,22	0,45	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,77	0,001	0,24	0,41	1,00	0,001

Πίνακας 82: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,60	0,02	0,65	0,01	0,84	0,001
Ph	-0,73	0,001	-0,58	0,03	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,73	0,001	0,59	0,03	0,95	0,001

Πίνακας 83: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,48	0,08	0,60	0,02	0,77	0,001
Ph	-0,68	0,01	-0,60	0,02	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,69	0,01	0,61	0,02	0,95	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 84: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,45	0,11	0,71	0,00	0,72	0,001
Ph	-0,24	0,41	0,54	0,05	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,24	0,41	0,54	0,05	1,00	0,001

Πίνακας 85: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,48	0,08	0,32	0,27	0,53	0,05
Ph	-0,49	0,08	-0,30	0,30	-0,98	0,001
Οξύτητα %	0,48	0,08	0,28	0,33	0,96	0,001

Πίνακας 86: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,15	0,61	-0,04	0,89	0,75	0,001
Ph	-0,09	0,76	0,04	0,89	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,09	0,75	-0,04	0,89	0,97	0,001

Πίνακας 87: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 37° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,28	0,34	-0,14	0,62	0,73	0,001
Ph	-0,30	0,30	-0,12	0,69	-0,96	0,001
Οξύτητα %	0,30	0,30	-0,12	0,69	0,96	0,001

Πίνακας 88: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,14	0,64	-0,10	0,73	0,59	0,02
Ph	0,07	0,80	0,08	0,79	-0,95	0,001
Οξύτητα %	-0,08	0,78	-0,08	0,78	0,95	0,001

Πίνακας 89: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. plantarum* 45° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,03	0,91	0,14	0,62	0,49	0,07
Ph	0,40	0,15	0,29	0,32	-0,95	0,001
Οξύτητα %	-0,40	0,15	-0,29	0,31	0,94	0,001

Πίνακας 90: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,22	0,57	0,21	0,56	0,48	0,19
Ph	-0,11	0,77	-0,10	0,76	-0,84	0,001
Οξύτητα %	0,11	0,77	0,90	0,75	0,84	0,001

Πίνακας 91: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,21	0,59	0,26	0,49	0,69	0,04
Ph	-0,02	0,96	-0,01	0,98	-0,84	0,001
Οξύτητα %	0,01	0,97	0,001	0,98	0,84	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 92: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,25	0,51	0,05	0,89	0,42	0,26
Ph	-0,48	0,19	-0,47	0,20	-0,96	0,001
Οξύτητα %	0,70	0,03	0,45	0,22	0,85	0,001

Πίνακας 93: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,12	0,75	-0,10	0,79	0,48	0,19
Ph	-0,09	0,82	0,001	1,00	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,18	0,65	0,05	0,89	0,89	0,001

Πίνακας 93: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,87	0,001	0,48	0,19	0,68	0,04
Ph	-0,90	0,001	-0,75	0,02	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,89	0,001	0,75	0,02	1,00	0,001

Πίνακας 94: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,95	0,001	0,83	0,00	0,91	0,001
Ph	-0,85	0,001	-0,63	0,04	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,84	0,001	0,68	0,04	1,00	0,001

Πίνακας 96: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,70	0,04	0,04	0,91	0,55	0,13
Ph	-0,56	0,12	-0,16	0,67	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,46	0,22	0,07	0,86	0,70	0,03

Πίνακας 97: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,97	0,001	0,90	0,001	0,58	0,10
Ph	-0,68	0,04	-0,68	0,05	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,51	0,16	0,67	0,05	0,89	0,001

Πίνακας 98: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,17	0,65	0,12	0,76	0,72	0,03
Ph	-0,56	0,12	-0,40	0,29	-0,93	0,001
Οξύτητα %	0,56	0,12	0,39	0,30	0,92	0,001

Πίνακας 99: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,53	0,14	0,32	0,41	0,91	0,001
Ph	-0,48	0,19	-0,23	0,55	-0,93	0,001
Οξύτητα %	0,48	0,19	0,23	0,55	0,92	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 100: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,33	0,38	-0,13	0,74	0,70	0,04
Ph	-0,29	0,44	0,02	0,96	-0,86	0,001
Οξύτητα %	0,47	0,19	0,04	0,92	0,78	0,01

Πίνακας 101: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,57	0,11	0,30	0,44	0,68	0,04
Ph	-0,21	0,59	0,03	0,94	-0,91	0,001
Οξύτητα %	0,29	0,45	0,05	0,89	0,80	0,01

Αποτελέσματα

Πίνακας 102: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,04	0,91	-0,12	0,76	0,68	0,04
Ph	-0,41	0,27	-0,26	0,50	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,42	0,26	0,26	0,50	1,00	0,001

Πίνακας 103: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 37° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,44	0,23	0,32	0,40	0,86	0,001
Ph	-0,46	0,15	-0,26	0,50	-0,98	0,001
Οξύτητα %	0,46	0,21	0,27	0,49	0,98	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 104: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,05	0,91	0,26	0,49	0,56	0,12
Ph	-0,02	0,95	0,06	0,87	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,32	0,40	0,14	0,72	0,88	0,001

Πίνακας 105: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *L. paracasei* subsp. *paracasei* 45° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,47	0,20	0,62	0,07	0,48	0,19
Ph	-0,23	0,55	-0,34	0,37	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,44	0,23	0,44	0,24	0,89	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 106: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,09	0,75	0,23	0,44	0,95	0,001
Ph	-0,16	0,57	-0,18	0,54	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,25	0,38	0,24	0,40	0,99	0,001

Πίνακας 107: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,20	0,49	0,29	0,31	0,96	0,001
Ph	-0,31	0,28	-0,35	0,21	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,35	0,22	0,37	0,19	0,99	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 108: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,24	0,40	0,17	0,55	0,95	0,001
Ph	-0,17	0,55	-0,11	0,71	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,32	0,26	0,16	0,57	0,99	0,001

Πίνακας 109: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,33	0,24	0,20	0,49	0,96	0,001
Ph	-0,29	0,31	-0,17	0,56	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,37	0,19	0,19	0,52	0,99	0,001

Πίνακας 110: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,85	0,001	0,25	0,39	0,94	0,001
Ph	-0,86	0,001	-0,33	0,25	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,85	0,001	0,35	0,22	0,88	0,001

Πίνακας 111: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,85	0,001	0,43	0,12	0,85	0,001
Ph	-0,89	0,001	-0,54	0,04	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,85	0,001	0,54	0,05	0,91	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 112: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,84	0,001	0,03	0,92	0,91	0,001
Ph	-0,84	0,001	-0,12	0,68	-0,96	0,001
Οξύτητα %	0,85	0,001	0,10	0,74	0,95	0,001

Πίνακας 113: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,85	0,001	0,11	0,71	0,91	0,001
Ph	-0,85	0,001	-0,27	0,35	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,85	0,001	0,27	0,35	0,95	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 114: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 37° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,03	0,91	-0,54	0,04	0,77	0,001
Ph	0,06	0,83	0,55	0,04	-0,83	0,001
Οξύτητα %	-0,13	0,66	-0,53	0,05	0,75	0,001

Πίνακας 115: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 37° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,07	0,82	-0,54	0,05	0,85	0,001
Ph	0,07	0,81	0,49	0,07	-0,90	0,001
Οξύτητα %	-0,15	0,62	-0,51	0,06	0,84	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 116: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,07	0,82	-0,33	0,24	0,75	0,001
Ph	-0,10	0,73	0,24	0,41	-0,85	0,001
Οξύτητα %	0,09	0,76	-0,35	0,22	0,74	0,001

Πίνακας 117: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,22	0,45	0,001	0,99	0,71	0,001
Ph	-0,18	0,53	-0,11	0,71	-0,82	0,001
Οξύτητα %	0,16	0,57	-0,05	0,87	0,71	0,001

Πίνακας 118: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,04	0,90	0,40	0,16	0,78	0,001
Ph	0,11	0,71	-0,39	0,17	-0,83	0,001
Οξύτητα %	-0,14	0,64	0,40	0,15	0,75	0,001

Πίνακας 119: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecium* 37° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	-0,06	0,83	0,41	0,15	0,83	0,001
Ph	0,13	0,66	-0,39	0,16	-0,89	0,001
Οξύτητα %	-0,15	0,61	0,40	0,15	0,84	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 120: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,38	0,18	0,08	0,77	0,77	0,001
Ph	-0,40	0,16	-0,17	0,57	-0,86	0,001
Οξύτητα %	0,32	0,26	0,06	0,84	0,75	0,001

Πίνακας 121: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecium* 45° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,31	0,27	0,001	0,98	0,72	0,001
Ph	-0,35	0,21	-0,12	0,67	-0,83	0,001
Οξύτητα %	0,30	0,30	0,01	0,96	0,72	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 122: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,27	0,42	0,61	0,05	0,88	0,001
Ph	-0,32	0,33	-0,61	0,05	-0,90	0,001
Οξύτητα %	0,24	0,47	0,65	0,03	0,91	0,001

Πίνακας 123: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,56	0,07	0,88	0,001	0,88	0,001
Ph	-0,63	0,04	-0,88	0,001	-0,94	0,001
Οξύτητα %	0,63	0,04	0,92	0,001	0,92	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 124: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 24 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,33	0,32	0,40	0,22	0,92	0,001
Ph	-0,33	0,32	-0,37	0,27	-0,85	0,001
Οξύτητα %	0,34	0,31	0,31	0,34	0,89	0,001

Πίνακας 125: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 48 h επί της *S. arizonae*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,76	0,001	0,91	0,001	0,87	0,001
Ph	-0,65	0,03	-0,77	0,001	-0,88	0,001
Οξύτητα %	0,63	0,04	0,75	0,001	0,88	0,001

Πίνακας 126: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,74	0,01	0,87	0,001	0,99	0,001
Ph	-0,75	0,01	-0,88	0,001	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,66	0,03	0,89	0,001	0,97	0,001

Πίνακας 127: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,84	0,001	0,81	0,00	0,97	0,001
Ph	-0,87	0,001	-0,70	0,02	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,88	0,001	0,65	0,03	0,99	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 128: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 24 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,42	0,19	0,20	0,56	0,91	0,001
Ph	-0,50	0,12	-0,23	0,49	-0,96	0,001
Οξύτητα %	0,44	0,17	0,20	0,55	0,91	0,001

Πίνακας 129: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 48 h επί της *S. enteritidis*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,79	0,001	0,90	0,001	0,90	0,001
Ph	-0,64	0,03	-0,83	0,001	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,66	0,03	0,86	0,001	0,99	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 130: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,15	0,65	0,56	0,07	0,98	0,001
Ph	-0,27	0,42	-0,60	0,05	-0,98	0,001
Οξύτητα %	0,27	0,43	0,48	0,14	0,91	0,001

Πίνακας 131: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 37° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,48	0,13	0,54	0,09	0,99	0,001
Ph	-0,51	0,11	-0,55	0,08	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,53	0,09	0,53	0,09	0,94	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 132: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 24 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,53	0,09	0,42	0,20	0,94	0,001
Ph	-0,52	0,10	-0,37	0,27	-0,97	0,001
Οξύτητα %	0,01	0,11	0,34	0,30	0,92	0,001

Πίνακας 133: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα % *E. faecalis* 45° C 48 h επί της *S. typhimurium*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,85	0,001	0,75	0,01	0,94	0,001
Ph	-0,63	0,04	-0,65	0,03	-0,95	0,001
Οξύτητα %	0,61	0,05	0,64	0,03	0,93	0,001

Πίνακας 134: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecalis* 37° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,63	0,04	0,75	0,001	0,99	0,001
Ph	-0,65	0,03	-0,77	0,001	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,64	0,03	0,72	0,01	0,97	0,001

Πίνακας 135: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecalis* 37° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,73	0,01	0,80	0,001	0,95	0,001
Ph	-0,77	0,001	-0,77	0,001	-0,99	0,001
Οξύτητα %	0,76	0,001	0,76	0,001	0,98	0,001

Αποτελέσματα

Πίνακας 136: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecalis* 45° C 24 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,51	0,10	0,37	0,26	0,98	0,001
Ph	-0,51	0,11	-0,37	0,26	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,46	0,15	0,33	0,32	0,99	0,001

Πίνακας 137: Συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson των αποτελεσμάτων των ζωνών ανάπτυξης των καλλιέργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος, με τις παραμέτρους OD, pH και οξύτητα %*E. faecalis* 45° C 48 h επί της *S. typhi*.

Παράμετροι	Καλλιέργειες		Υπερκείμενο υγρό		Γαλακτικό οξύ	
	r	p	r	p	r	p
OD	0,98	0,001	0,85	0,001	0,90	0,001
Ph	-0,92	0,001	-0,76	0,001	-1,00	0,001
Οξύτητα %	0,90	0,001	0,72	0,01	0,99	0,001

3.2. ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΑΥΤΟΧΘΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Με τις μεθόδους που αναλυτικά παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο ΜΕΘΟΔΟΙ 2.2. από τα διάφορα δείγματα απομονώθηκαν συνολικά 466 συνολικά στελέχη που ομαδοποιήθηκαν όπως φαίνεται στον πίνακα 13. Όλα τα παραπάνω βακτήρια εξετάστηκαν ως προς τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους ήτοι:

- Μορφολογία αποικιών ανάλογη του είδους κατά την παρατήρηση
- Gram χρώση
- Μορφολογία ανάλογη του είδους κατά την μικροσκόπηση
- Παραγωγή οξέος από τη ζύμωση της γλυκόζης
- Δοκιμή καταλάσης
- Δοκιμή οξειδάσης
- Δοκιμή παραγωγής αερίου από τη ζύμωση της γλυκόζης
- Προσδιορισμός κινητικότητας
- Ζύμωση υδρογονανθράκων
- Δοκιμή πρόκλησης ζύμωσης του γάλακτος
- Δοκιμή αποδόμησης της τρυπτοφάνης προς ινδόλη
- Δοκιμή παραγωγής H₂S

Από το σύνολο των 14 διαφορετικών αυτόχθονων βακτηρίων τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε είδη και σε γένη (πίνακας 13) σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφησαν (στο κεφάλαιο ΜΕΘΟΔΟΙ 2.2.) επελέγησαν για περαιτέρω μελέτη τα παρακάτω στελέχη:

- α) *L. plantarum* (32 στελέχη)
- β) *L. paracasei* subsp. *paracasei* (19 στελέχη)
- γ) *E. faecium* (88 στελέχη)
- δ) *E. faecalis* (67 στελέχη)

Τα στελέχη αυτά ομαδοποιήθηκαν βάσει των χαρακτηριστικών των συστημάτων API 50 CHL Medium, API 20 SREPT Microsystem, VITEK 2 και Rapid ID32 Strep Apitests (ζύμωση σακχάρων) και προέκυψαν τελικά τα παρακάτω στελέχη για μελέτη των προβιοτικών (αντιβακτηριακών) ιδιοτήτων τους (πίνακες 14, 15, 16 και 17):

- α) *L. plantarum* (14 στελέχη)
- β) *L. paracasei* subsp. *paracasei* (9 στελέχη)
- γ) *E. faecium* (14 στελέχη)
- δ) *E. faecalis* (11 στελέχη)

3.2.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα αυτόχθονα στελέχη που απομονώθηκαν αλλά και τα reference strains υποβλήθηκαν σε δοκιμές ανθεκτικότητας στο μικροπεριβάλλον του πεπτικού σωλήνα και ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά όπως αναλυτικά φαίνεται παρακάτω:

- Ανθεκτικότητα σε διάφορες τιμές pH ήτοι pH=1, pH=2, pH=3, pH=4, pH=5, pH=6 και pH=6,5 (πίνακες 18,19, 20 και 21).
- Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα (0,15% oxgall και 0,50% oxgall) (πίνακες 18,19, 20 και 21).
- Ανθεκτικότητα παρουσία φαινόλης (διάλυμα 0,4%) (πίνακες 18,19, 20 και 21).
- Ανθεκτικότητα στα πρωτεολυτικά ένζυμα (λυσοζύμη με περιεκτικότητα 100 ppm) (πίνακες 18,19, 20 και 21).
- Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (πίνακες 22, 23, 24 και 25).

3.2.2.1. Ανθεκτικότητα σε διάφορες τιμές pH

Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη των *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *E. faecium* και *E. faecalis* έδειξαν ανθεκτικότητα σε τιμές του pH που ποικίλλουν από 3 έως 6,5 (πίνακες 18, 19, 20 και 21) με μόνη εξαίρεση το LP 15 reference strain (πρότυπο βακτηριακό στέλεχος-δείκτης) που έδειξε ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε διάφορες τιμές pH και το στέλεχος EFC 14 που έδειξε ευαισθησία σε pH=3 . Παρ' όλα αυτά στην τιμή pH=2 τα στελέχη του *L. plantarum* ήταν ευαίσθητα κατά 66,6%, τα στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* ήταν ευαίσθητα κατά 11,1%, τα στελέχη του *E. faecium* ήταν ευαίσθητα κατά 28,5% και τα στελέχη του *E. faecalis* κατά 18,2%. Τα reference strain LP15, EFC15 και EFL12 ήταν ευαίσθητα, ενώ το LP10 ήταν ενδιάμεσης ανθεκτικότητας.

Στην τιμή pH=1,0, όλα τα στελέχη τόσο τα απομονωθέντα αυτόχθονα, όσο και τα reference strains ήταν ευαίσθητα.

3.2.2.2. Ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα

Όλα τα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα (0,15% και 0,5% oxgall) (πίνακες 18, 19, 20 και 21). Όμως

τα reference strains LP15, LC10, EFC15 και EFL12 παρουσίασαν διαφοροποιήσεις της ανθεκτικότητάς τους.

3.2.2.3. Ανθεκτικότητα στη φαινόλη

Η ικανότητα των στελεχών μας να αναπτύσσονται παρουσία φαινόλης (0,4%) στους 37° C για 24 h παρατηρήθηκε στην μελέτη μας (πίνακες 18, 19, 20 και 21). Την ίδια ικανότητα έδειξαν και τα reference strain εκτός του LC που έδειξε ενδιάμεση ευαισθησία.

3.2.2.4. Ανθεκτικότητα στα πρωτεολυτικά ένζυμα

Όλα τα στελέχη μας παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη λυσοζύμη (πίνακες 18, 19, 20 και 21). Από τα reference strains ενδιάμεση ανθεκτικότητα παρουσίασε μόνο το LP.

3.2.2.5. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των εξεταζόμενων στελεχών

Τα αυτόχθονα στελέχη μας όπως και τα reference strains τέλος εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά Vancomycin (30 µg), Gentamycin (10 µg), Ampicillin (10 µg), Penicillin G (10 µg), Tetracycline (30 µg), Teicoplanin (30 µg), Amoxicillin with Clavulanic Acid (30 µg).

Στους πίνακες 22, 23, 24 και 25 παρατηρούμε ότι:

- 3 στελέχη του *L. plantarum* παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά.
 - Κανένα στέλεχος του *L. paracasei* subsp. *paracasei* δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά.
 - 1 στέλεχος του *E. faecium* παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά.
 - 1 στέλεχος του *E. faecalis* παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά.
- Στη Vancomycin παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 10 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 71,4%)
 - 6 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 66,7%)
 - 9 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 64,2%) και
 - 4 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 36,4%)

- Στη Gentamycin παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 12 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 85,7%)
 - 3 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 33,3%)
 - 7 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 50,0%) και
 - 3 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 27,3%)
- Στη Ampicillin παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 8 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 57,1%)
 - 8 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 88,9%)
 - 5 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 35,7%) και
 - 3 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 27,3%)
- Στη Penicillin G παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 12 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 85,7%)
 - 4 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 44,4%)
 - 6 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 42,8%) και
 - 4 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 36,4%)
- Στη Tetracycline παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 10 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 71,4%)
 - 2 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 22,2%)
 - 3 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 21,4%) και
 - 2 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 18,2%)
- Στη Teicoplanin παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 10 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 71,4%)
 - 9 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 100%)
 - 7 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 50,0%) και
 - 3 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 27,3%)
- Στη Amoxicillin with Clavulanic Acid παρουσίασαν ανθεκτικότητα:
 - 7 στελέχη του *L. plantarum* (ποσοστό 50,0%)
 - 7 στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ποσοστό 77,8%)
 - 1 στελέχη του *E. faecium* (ποσοστό 7,1%) και
 - 1 στελέχη του *E. faecalis* (ποσοστό 9,1%)

Από τα reference strains ιδιαίτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το LC reference strain που παρουσίασε ανθεκτικότητα στα 6 από το σύνολο των 7 αντιβιοτικών, ποσοστό 85,7% επί του συνόλου.

Από τα υπόλοιπα reference strains το LP παρουσίασε ανθεκτικότητα σε ποσοστό 42,8%, το EFC σε ποσοστό 28,6% και το EFL σε ποσοστό 42,8% επί του συνόλου των αντιβιοτικών.

3.2.3. ΑΝΤΙΒΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα αυτόχθονα στελέχη μας, (14 του *L. plantarum*, 9 του *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 14 του *E. faecium* και 11 του *E. faecalis*) μαζί και τα reference strains αφού μελετήθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες η OD, το pH και η οξύτητα % που παρουσίασαν εκτέθηκαν στη δράση των παθογόνων σαλμονελλών *S. arizonae*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* και *S. typhi* για 3, 6, 24 και 48 ώρες στους 37° C και 45° C αντίστοιχα.

Όλα τα αποτελέσματα στις 3 και 6 ώρες έδειξαν μη ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης λόγω μη επαρκούς ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Αντίθετα τα αποτελέσματα ήταν ενδιαφέροντα στις 24 και 48 ώρες, τόσο στους 37° C όσο και στους 45° C. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών δηλαδή των διαμέτρων των ζωνών αναστολής που δημιουργήθηκαν, παρατίθενται στους πίνακες 26 έως και 27.

❖ Από τους πίνακες 26 έως και 27 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 35,7%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 21,4%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

• **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτη τιμή στους 37° C και ουδεμία απολύτως θετική τιμή στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 28 έως και 29 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 14 στελέχη μας (ποσοστό 100%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 14 στελέχη μας (ποσοστό 100%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 11 στελέχη μας (ποσοστό 78,6%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 50,0%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 9 στελέχη μας (ποσοστό 64,3%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 2 στελέχη μας (ποσοστό 14,2%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 7,1%)

γ) Γαλακτικό οξύ: Δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm).

• **To reference strain:** Δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δράση στους 37° C και δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 30 έως και 31 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 4 στελέχη μας (ποσοστό 28,6%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 7,1%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 21,4%)
- 45° C επώαση επί 48 h από - στελέχη μας (ποσοστό 0%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

• **To reference strain:** Δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δράση στους 37° C και δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 32 έως και 33 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 12 στελέχη μας (ποσοστό 85,7%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 13 στελέχη μας (ποσοστό 92,8%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 50,0%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Μόνο 1 στέλεχος (ποσοστό 71,1%) έδωσε αξιόλογα αποτελέσματα και μόνο στους 37° C επώαση επί 24 h.

γ) Γαλακτικό οξύ: Δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm).

• **To reference strain:** Δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δράση στους 37° C και δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 34 έως και 35 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm).

• **To reference strain:** Δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δράση στους 37° C και δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 36 έως και 37 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 4 στελέχη μας (ποσοστό 44,5%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 55,6%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 4 στελέχη μας (ποσοστό 44,5%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 4 στελέχη μας (ποσοστό 44,5%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm).

• **To reference strain:** Δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη δράση στους 37° C και δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση στους 45° C.

❖ Από τους πίνακες 38 έως και 39 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 77,8%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 77,8%)
- 45° C επώαση επί 24 h από όλα τα στελέχη μας (ποσοστό 100%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 77,8%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 33,3%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 33,3%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 11,1%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 11,1%)

• **To reference strain:** Παρουσίασε αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) μόνο στις καλλιέργειες στους 37° C στις 24 h, ενώ στους 45° C δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση.

❖ Από τους πίνακες 40 έως και 41 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 8 στελέχη μας (ποσοστό 88,9%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 8 στελέχη μας (ποσοστό 88,9%)
- 45° C επώαση επί 24 h από όλα τα στελέχη μας (ποσοστό 100%)

- 45° C επώαση επί 48 h από όλα τα στελέχη μας (ποσοστό 100%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 55,5%)

- 37° C επώαση επί 48 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 55,5%)

- 45° C επώαση επί 24 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 66,7%)

- 45° C επώαση επί 48 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 66,7%)

• **To reference strain:** Παρουσίασε αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) μόνο στις καλλιέργειες στους 37° C στις 24 h, ενώ στους 45° C δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως δράση.

❖ Από τους πίνακες 42 έως και 43 προκύπτει ότι:

• **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

• **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν έδωσε καμία απολύτως τιμή.

❖ Από τους πίνακες 44 έως και 45 προκύπτει ότι:

• **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 2 στελέχη μας (ποσοστό 14,3%)

- 37° C επώαση επί 48 h από 2 στελέχη μας (ποσοστό 14,3%)

- 45° C επώαση επί 24 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 7,14%)

- 45° C επώαση επί 48 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 7,14%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

• **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν έδωσε καμία απολύτως τιμή.

❖ Από τους πίνακες 46 έως και 47 προκύπτει ότι:

• **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 8 στελέχη μας (ποσοστό 57,1%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 8 στελέχη μας (ποσοστό 57,1%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 50,0%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

• **To reference strain:** Σε καμία από τις περιπτώσεις τόσο στους 37° C όσο και στους 45° C δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm).

❖ Από τους πίνακες 48 έως και 49 προκύπτει ότι:

• **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 7 στελέχη μας (ποσοστό 50,0%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 4 στελέχη μας (ποσοστό 28,6%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 21,4%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Μόνο στους 37° C στις 48 h επώασης δύο (2) στελέχη (ποσοστό 14,3%) έδωσαν τιμές αξιοσημείωτες (ζώνες αναστολής = 17 mm)

- **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν έδωσε καμία απολύτως τιμή.

❖ Από τους πίνακες 50 έως και 51 προκύπτει ότι:

- **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

Τα στελέχη μας σε καμία των περιπτώσεων τόσο στους 37° C όσο και στους 45° C επώασης δεν έδωσαν αξιόλογες τιμές (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) ενώ σε αρκετές περιπτώσεις, αρκετά στελέχη δεν έδωσαν καμία απολύτως τιμή.

- **To reference strain:** Σε καμία των περιπτώσεων τόσο στους 37° C όσο και στους 45° C επώασης δεν έδωσαν καμία τιμή.

❖ Από τους πίνακες 52 έως και 53 προκύπτει ότι:

- **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 0 στελέχη μας (ποσοστό 0%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 2 στελέχη μας (ποσοστό 18,2%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 9,1%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 2 στελέχη μας (ποσοστό 18,2%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

- **To reference strain:** Σε καμία των περιπτώσεων τόσο στους 37° C όσο και στους 45° C επώασης δεν έδωσαν καμία τιμή.

❖ Από τους πίνακες 54 έως και 55 προκύπτει ότι:

- **Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:**

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 0 στελέχη μας (ποσοστό 0%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 9,1%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 1 στελέχη μας (ποσοστό 9,1%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 3 στελέχη μας (ποσοστό 27,3%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) δεν παρατηρήθηκε από κανένα στέλεχος.

γ) Γαλακτικό οξύ: Μόνο ένα (1) στέλεχος στους 37° C και στους 45° C στις 24 h επώασης έδωσε αξιοσημείωτες τιμές (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) (ποσοστό 9,1%).

• **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν έδωσε καμία απολύτως τιμή.

❖ Από τους πίνακες 56 έως και 57 προκύπτει ότι:

• Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την παρακάτω δράση:

α) Καλλιέργειες: Αξιοσημείωτη δράση (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) παρατηρήθηκε στους:

- 37° C επώαση επί 24 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 35,7%)
- 37° C επώαση επί 48 h από 6 στελέχη μας (ποσοστό 42,8%)
- 45° C επώαση επί 24 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 35,7%)
- 45° C επώαση επί 48 h από 5 στελέχη μας (ποσοστό 35,7%)

β) Υπερκείμενο Υγρό: Μόνο 2 στελέχη έδωσαν αξιοσημείωτη τιμή (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) στους 45° C επί 48 h επώασης (ποσοστό 18,2%) ενώ αρκετά στελέχη δεν έδωσαν καμία τιμή.

γ) Γαλακτικό οξύ: Μόνο 2 στελέχη έδωσαν αξιοσημείωτη τιμή (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) στους 37° C και στους 45° C επί 48 h επώασης (ποσοστό 18,2%).

• **To reference strain:** Σε καμία των εξεταζόμενων περιπτώσεων δεν έδωσε αξιοσημείωτες τιμές ενώ σε αρκετές περιπτώσεις δεν έδωσε καμία απολύτως τιμή.

3.2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των πινάκων 26 έως και 57 υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία με:

- α) την δοκιμασία της Ανάκλυσης Διασποράς (Analysis of Variance) και
- β) ανεύρεσης του Συντελεστή Συσχέτισης κατά Pearson, ώστε να αξιολογηθούν και να εκτιμηθούν κατάλληλα.

3.2.4.1. Ανάλυση Διασποράς (Analysis of Variance)

Με το τεστ (δοκιμασία) αυτό συγκρίναμε τις μέσες τιμές (με βάση και τις τυπικές τους αποκλίσεις) των αποτελεσμάτων των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος επί των τεσσάρων στελεχών του γένους *Salmonella* sp.

Στους πίνακες που ακολουθούν (58 έως και 73) εμφανίζονται οι μέσες τιμές κάθε μέτρησης, οι τυπικές αποκλίσεις της κάθε μέσης τιμής και η πιθανότητα της ανάλυσης διασποράς (η πιθανότητα όλες αυτές οι μέσες τιμές να είναι όμοιες).

❖ **Από τους πίνακες 58, 59, 60 και 61 προκύπτει ότι:**

Ο *L. plantarum* έχει την πιο αξιοσημείωτη δράση (μέσες τιμές) (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) επί της *S. enteritidis*, της *S. typhi* και κατά δεύτερο λόγο επί της *S. arizonae*. Επί της *S. typhimurium* δεν παρατηρείται αξιόλογη δράση.

Η δράση αυτή παρατηρείται στις καλλιέργειες σε θερμοκρασία 37° C επί 24 h και 48 h επώασης και σε θερμοκρασία 45° C επί 24 h επώασης.

Η δράση του *L. plantarum* όσον αφορά το υπερκείμενο υγρό περιορίζεται μόνο στους 37° C επί 24 h και επί 48 h επώασης και μόνο επί της *S. enteritidis*. Επί των υπολοίπων παθογόνων σαλμονελλών δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη δράση.

Το γαλακτικό οξύ σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις δεν δίνει αξιοσημείωτα αποτελέσματα επί ουδενός παθογόνων.

Οι μέσες τιμές των καλλιεργειών σε όλες τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερες τόσο των τιμών τόσο εκείνων του υπερκείμενου υγρού όσον και του γαλακτικού οξέος.

Από την ανάλυση διασποράς εξάγεται το αποτέλεσμα ότι όλες οι μέσες τιμές των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος εκφράζουν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $< 0,001$ (η πιθανότητα να είναι όμοιες $< 0,001$).

❖ **Από τους πίνακες 62, 63, 64 και 65 προκύπτει ότι:**

Ο *L. paracasei* subsp. *paracasei* έχει την πιο αξιοσημείωτη δράση (μέσες τιμές) (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) επί της *S. typhi*, της *S. typhimurium* και δευτερευόντως επί της *S. enteritidis*. Επί της *S. arizonae* δεν παρατηρείται αξιόλογη δράση.

Η δράση αυτή παρατηρείται στις καλλιέργειες τόσο σε θερμοκρασία 37° C επί 24 h και 48 h επώασης όσο και σε θερμοκρασία 45° C επί 24 και 48 h επώασης.

Η δράση *L. paracasei* subsp. *paracasei* όσον αφορά το υπερκείμενο υγρό σε καμία περίπτωση δεν δίνει αξιοσημείωτα αποτελέσματα.

Το γαλακτικό οξύ δίνει αξιοσημείωτα αποτελέσματα επί των *S. typhi* και *S. typhimurium* στους 37° C επί 24 h και 48 h επώασης και επί της *S. typhi* στους 45° C επί 24 και 48 h επώασης.

Οι μέσες τιμές των καλλιεργειών σε όλες τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερες τόσο των τιμών τόσο εκείνων του υπερκείμενου υγρού όσον και του γαλακτικού οξέος.

Από την ανάλυση διασποράς εξάγεται το αποτέλεσμα ότι όλες οι μέσες τιμές των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος εκφράζουν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $< 0,001$ (η πιθανότητα να είναι όμοιες $< 0,001$).

❖ **Από τους πίνακες 66, 67, 68 και 69 προκύπτει ότι:**

Ο *E. faecium* έχει την πιο αξιοσημείωτη δράση (μέσες τιμές) (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) επί της *S. typhi* και *S. typhimurium*.

Η δράση αυτή παρατηρείται στις καλλιέργειες στους 37° C επί 24 h και 48 h επώασης και δευτερευόντως επί των ίδιων σαλμονελλών, σε μερικές περιπτώσεις στους 45° C επί 24 και 48 h επώασης.

Ούτε το υπερκείμενο υγρό ούτε το γαλακτικό οξύ δίνουν αξιοσημείωτα αποτελέσματα.

Οι μέσες τιμές των καλλιεργειών σε όλες τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερες τόσο των τιμών τόσο εκείνων του υπερκείμενου υγρού όσον και του γαλακτικού οξέος.

Από την ανάλυση διασποράς εξάγεται το αποτέλεσμα ότι όλες οι μέσες τιμές των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος εκφράζουν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $< 0,001$ (η πιθανότητα να είναι όμοιες $< 0,001$).

❖ Από τους πίνακες 70, 71, 72 και 73 προκύπτει ότι:

Ο *E. faecalis* παρουσιάζει αξιοσημείωτη δράση (μέσες τιμές) (ζώνες αναστολής ≥ 17 mm) επί της *S. typhi* και δευτερευόντως σε μερικές περιπτώσεις επί της *S. typhimurium*. Επί των υπολοίπων σαλμονελλών δεν έχει αξιοσημείωτη δράση.

Η δράση αυτή επί της *S. typhi* περιορίζεται στις καλλιέργειες στους 37° C επί 24 h και 48 h επώασης και επί της *S. typhimurium* στους 45° C επί 24 και 48 h επώασης.

Η δράση του *E. faecalis* δια του υπερκείμενου υγρού σε καμία περίπτωση δεν δίνει αξιοσημείωτες τιμές.

Το ίδιο παρατηρείται και στη δράση του γαλακτικού οξέος.

Οι μέσες τιμές των καλλιιεργειών σε όλες τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερες τόσο των τιμών τόσο εκείνων του υπερκείμενου υγρού όσον και του γαλακτικού οξέος.

Από την ανάλυση διασποράς εξάγεται το αποτέλεσμα ότι όλες οι μέσες τιμές των ζωνών αναστολής των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος εκφράζουν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $< 0,001$ (η πιθανότητα να είναι όμοιες $< 0,001$).

3.2.4.2. Συντελεστής Συσχέτισης κατά Pearson

Με την γενική παραδοχή ότι ένας καλός θετικός ή αρνητικός συντελεστής συσχέτισης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον $\pm 0,75$ και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) μικρότερο του 0,05, οπότε τα αποτελέσματα θα είναι αξιολογήσιμα, από την μελέτη των αποτελεσμάτων των πινάκων 26 έως 57 προκύπτουν τα παρακάτω:

❖ Πίνακες 74, 75, 76 & 77

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας 76)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακας 75)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακας 75)
- δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας 77)
- ε) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

- στ) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
ζ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 78, 79, 80 & 81

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση (πίνακες 78, 79 & 81)
β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 78, 80)
ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 78, 80)
στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 78, 80)
ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 82, 83, 84 & 85

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση (πίνακας 82)
β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 82, 83)
γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 82, 83)
δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 82, 83 & 84)
ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 82, 83 & 84)
στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 82, 83 & 84)
ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 86, 87, 88 & 89

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 86, 87 & 88)
- β) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 94, 95, 96 & 97

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- β) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

• Πίνακες 98, 99, 100 & 101

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες)
- δ) Υπερκεείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες)
- ε) Υπερκεείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες)
- στ) Υπερκεείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες)
- ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 102, 103, 104 & 105

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 102 & 103)
- β) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 106, 107, 108 & 109

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- β) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ Πίνακες 110, 111, 112 & 113

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- δ) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακας 111)
- ε) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακας 111)
- στ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- ζ) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- η) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 114, 115, 116 & 117**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) < 0,05 στις περιπτώσεις:

- α) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 114 & 115)
- β) Υπερκείμενο υγρό με pH (θετική συσχέτιση) (πίνακας 114)
- γ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (αρνητική συσχέτιση) (πίνακας 114)
- δ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- ε) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- στ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 118, 119, 120 & 121**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) < 0,05 στις περιπτώσεις:

- α) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- β) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- γ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 122, 123, 124 & 125**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) < 0,05 στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας 125)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 123 & 125)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 123 & 125)
- δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 122, 123 & 125)
- ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 122, 123 & 125)
- στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 122, 123 & 125)
- ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 126, 127, 128 & 129**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 126, 127 & 129)
- ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 130, 131, 132 & 133**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας 133)
- β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακας 133)
- γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακας 133)
- δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακας 133)
- ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 130 & 133)
- στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακας 133)
- ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)

Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά.

❖ **Πίνακες 134, 135, 136 & 137**

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση εμφανίζει επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) $< 0,05$ στις περιπτώσεις:

- α) Καλλιέργειες με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - β) Καλλιέργειες με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - γ) Καλλιέργειες με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - δ) Υπερκείμενο υγρό με OD (θετική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - ε) Υπερκείμενο υγρό με pH (αρνητική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - στ) Υπερκείμενο υγρό με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (πίνακες 134, 135 & 137)
 - ζ) Γαλακτικό οξύ με OD (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
 - η) Γαλακτικό οξύ με pH (αρνητική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
 - θ) Γαλακτικό οξύ με οξύτητα % (θετική συσχέτιση) (όλες οι περιπτώσεις)
- Όλες οι άλλες περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Όπως προαναφέρθηκε (Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας 1.2) στη χώρα μας κατά το θέρος παρατηρούνται συχνά υψηλές θερμοκρασίες που αγγίζουν τους 40° – 42° C. Παράλληλα η θερμοκρασία που απαιτείται για την επώαση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας, την έναρξη της πήξης και τον χειρισμό των γαλακτοκομικών προϊόντων κυμαίνεται περί τους 41° – 45° C(322). Τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι θα έπρεπε να αναζητηθούν θερμοφιλά στελέχη, που θα έχουν την δυνατότητα να παραμένουν ζώντα κατά το στάδιο παρασκευής των γαλακτοκομικών προϊόντων, ώστε να μπορούν να αποικίσουν ή να προσκολληθούν απλώς στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου μετά την κατανάλωση των προϊόντων και να αποδώσουν τις προβιοτικές δράσεις τους (24, 83, 179, 198, 202).

Η μελέτη των χαρακτηριστικών ανάπτυξης των απομονωθέντων αυτόχθονων οξυγαλακτικών βακτηρίων έδειξε ότι μερικά από αυτά είχαν καλή ανάπτυξη όχι μόνο στους 37° C αλλά και στους 45° C, όταν είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι δεν αναπτύσσονται στους 45° C. Παρόμοια συμπεριφορά έδειξαν τα στελέχη *L. plantarum* και *L. paracasei* subsp. *paracasei* (166, 167, 170, 172).

Τα συγκεκριμένα είδη σχετίζονται άμεσα με την βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων και χαρακτηρίζονται ως ασφαλή στη χρήση τους (3, 33, 195, 196).

Οι παραπάνω λόγοι αποτέλεσαν κριτήριο επιλογής των απομονωθέντων αυτόχθονων στελεχών του *L. plantarum* και *L. paracasei* subsp. *paracasei* για περαιτέρω μελέτη στην παρούσα εργασία.

Ο εντερικός σωλήνας των νεογέννητων είναι εκ γενετής αποστειρωμένος, όμως ταχύτατα αποικίζεται από βακτήρια της χαρακτηριστικής μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα που προέρχεται κυρίως από το μητρικό ή το περιβάλλον καταγωγής (319, 346). Όταν η μικροχλωρίδα των νεογέννητων εγκατασταθεί και εδραιωθεί τα νεογέννητα είναι πιο ανθεκτικά στις λοιμώξεις από τα εξωγενή βακτήρια και το γεγονός αυτό έχει περιγραφεί ως «ανθεκτικότητα στην αποίκιση» (347, 348). Βακτήρια του γένους *Enterococcus* sp., όπως *E. faecium* και *E. faecalis* αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (349, 350). Παρά την μεγάλη συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται στο περιβάλλον η ακριβής ταυτοποίηση τους, είχε πάντα δυσκολίες, βασίζεται

δε κυρίως στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στα απομονωθέντα στελέχη (351, 352, 353).

Σε σχέση με το γένος *Enterococcus sp.* έχουν εισαχθεί στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων στελέχη εκκινητές, που κρατούν κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση, ανάπτυξη και βελτίωση ειδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα προϊόντα αυτά κατά την ωρίμανσή τους (351, 352).

Ανάμεσα στα είδη του γένους *Enterococcus sp.* που απαντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα τα *E. faecium* και *E. faecalis* θεωρούνται τα σημαντικότερα από μικροβιολογικής και τεχνολογικής πλευράς (351, 352). Τα είδη αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως και ως προβιοτικά (30, 33, 39, 172, 211).

Οι παραπάνω λόγοι αποτέλεσαν κριτήριο επιλογής των απομονωθέντων αυτόχθονων στελεχών *E. faecium* και *E. faecalis* για περαιτέρω μελέτη, στην παρούσα εργασία.

Από το σύνολο των 466 συνολικά στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματά μας (γαλακτοκομικά παραδοσιακά προϊόντα και κόπρανα παιδιών ηλικίας 1-3 ετών (πίνακας 13) που μετά την ταυτοποίησή τους βρέθηκαν να ανήκουν σε 14 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (πίνακας 13), επελέγησαν για όλους τους παραπάνω λόγους που παραπάνω αναφέρθηκαν για περαιτέρω μελέτη στην παρούσα εργασία τα παρακάτω:

- 14 στελέχη *L. plantarum*
- 9 στελέχη *L. paracasei* subsp. *paracasei*
- 14 στελέχη *E. faecium*
- 11 στελέχη *E. faecalis*

4.2 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ

ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα βασικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν περιγραφεί από πλείστους ερευνητές (1, 2, 3, 4, 5, 6, 166, 167, 171, 173). Το κυριότερα από αυτά είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος από την ζύμωση της γλυκόζης με ή χωρίς αέριο (5, 10, 11).

Παράλληλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν και σημαντικά άλλα χαρακτηριστικά χρήσιμα από τεχνολογικής άποψης για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως: δυνατότητα πήξης του γάλακτος (322), η μη παραγωγή H₂S (332, 333) και η ανθεκτικότητα παρουσία NaCl (327, 328, 329). Πέραν των ανωτέρω εκτελέστηκαν και όλες οι δοκιμές όπως

περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.3. (Μέθοδοι απομόνωσης στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων) και στην παράγραφο 3.2.1. και μαζί με τα δεδομένα των δικλείδων του Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (9th Edition 1986) ευρέθη ότι τα στελέχη που επελέγησαν παρουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Τέλος η ταυτοποίηση των στελεχών όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3. έδειξε ότι πρόκειται για στελέχη γνωστών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι μικρές διαφοροποιήσεις στα συστήματα API 50 CHL Medium και API 20 STREP Microsystem και VITEK 2 και Rapid ID 32 Strep API, ως προς την ζύμωση των υδρογονανθράκων ήταν το χαρακτηριστικό της ομαδοποίησης των 206 αρχικά απομονωθέντων στελεχών στα 48 στελέχη που επιλέχθηκαν τελικά να μελετηθούν (παράγραφος 321).

Από τα βασικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η δυνατότητα τους επιβίωσης και προσωρινής αποίκισης στον γαστρεντερικό σωλήνα (179, 2002, 203). Η ικανότητά τους ως εκ τούτου ανθεκτικότητας στις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν στον γαστρεντερικό σωλήνα είναι σημαντική και καθοριστική για την επιλογή τους για περαιτέρω μελέτη (10, 83, 198, 199, 200).

Τα στελέχη μας μελετήθηκαν για την ικανότητα ανθεκτικότητας παρουσία διαφόρων τιμών του pH, χολικών αλάτων, φαινόλης και λυσοζύμης και παρουσίασαν αξιοσημείωτη συμπεριφορά όπως παρακάτω αναλυτικά περιγράφεται. Επίσης μελετήθηκαν και ως προς την ανθεκτικότητά τους σε αντιβακτηριακούς παράγοντες (αντιβιοτικά).

4.3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

4.3.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΤΙΜΕΣ PH

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο στόμαχος είναι ένα όργανο όπου επικρατούν στείρες συνθήκες και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί θανατώνονται από την οξύτητα που επικρατεί από το γαστρικό οξύ κατά τη διόδό τους.

Επειδή το pH του γαστρικού υγρού του στομάχου έχει τιμή 1,2, οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται από το στόμαχο πιθανόν να αντικατοπτρίζουν μεταφερόμενο, πρόσκαιρο μικροβιακό φορτίο (354). Βακτήρια που είναι ανθεκτικά στο γαστρικό οξύ φαίνεται ότι είναι εκείνα που συναντώνται πιο συχνά στο περιβάλλον του στομάχου (355).

Είναι γνωστό ότι στελέχη του *L. paracasei* subsp. *paracasei* είναι σχεδόν ανενεργά σε pH=3, μετά από 2 ώρες επώασης (356). Η παρατηρούμενη γενικά ανθεκτικότητα στο

γαστρικό οξύ, διαφόρων στελεχών του γένους *Lactobacillus* φαίνεται να είναι σπάνια στον στόμαχο του ανθρώπου και οι ανευρισκόμενοι πληθυσμοί είναι πάντοτε μικροί (320).

Οι ίδιες παρατηρήσεις καταγράφηκαν και από την παρούσα μελέτη. Πλήρης ευαισθησία των στελεχών μας παρατηρήθηκε σε ακραίες τιμές του pH (pH=1,0) ενώ ενδιάμεσες ήταν οι τιμές σε pH=2,0. (πίνακες 18, 19, 20 και 21. Στατιστική παρουσίαση των αποτελεσμάτων ανθεκτικότητας των στελεχών μας σε τιμές pH δίδεται στην παράγραφο 3.2.2.1.

Όλα τα αυτόχθονα στελέχη συγκρινόμενα με τα πρωτότυπα (referens) στελέχη παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα.

4.3.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΧΟΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

Η χολή περιέχει κυρίως χολικά οξέα, χοληστερόλη, λεκιθίνη και χολοχρωστικές (χολερυθίνη). Τα χολικά οξέα συνδέονται με τα αμινοξέα ταυρίνη και γλυκίνη και απαντούν αποκλειστικά ως άλατα με διάφορα κατιόντα (κυρίως Na⁺). Το pH της χολής είναι αλκαλικό (357, 358, 359).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αποδέσμευση της χολερυθίνης σε ουροχολινογόνο και άλλα παρόμοια συστατικά οφείλεται στη δράση της β-γλυκορουινιδάσης, ενός ενζύμου που παράγεται από αρκετά βακτήρια του εντερικού σωλήνα (360). Όντως μερικά στελέχη επιδεικνύουν ότι κατέχουν την ενεργότητα της β-γλυκορουινιδάσης και έτσι σχετίζονται ενεργά με τη μετατροπή της συνδεδεμένης χολερυθίνης σε ουροχολινογόνο (361).

Απενεργοποίηση και αποικοδόμηση των παραπάνω συστατικών της χολής από βακτηριακά στελέχη θα μπορούσε να αιτιολογήσει την μη αποτελεσματική δράση της χολής πάνω σε αυτά τα βακτήρια και το παρατηρούμενο ανθεκτικό προφίλ των βακτηρίων αυτών.

Η ανθεκτικότητα στη χολή είναι σημαντικός παράγοντας για κάποιο μικροοργανισμό για τον οποίο είναι επιθυμητό να εγκατασταθεί και να αναπτυχθεί στο οικοσύστημα του εντερικού σωλήνα (362). Όλα τα στελέχη μας παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην παρουσία χολικών αλάτων, σε αντίθεση με τα πρωτότυπα (referens) στελέχη που παρουσίασαν διαφοροποιήσεις (παράγραφος 3.2.2.2.).

4.3.3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΦΑΙΝΟΛΗ

Η φαινόλη σχηματίζεται στο έντερο από τη δράση βακτηρίων πάνω σε αρωματικά αμινοξέα μεταφερόμενα με την διατροφή ή παραγόμενα ενδογενώς κατά την παραγωγή πρωτεϊνών (363).

Υψηλή ανθεκτικότητα ίδιων στελεχών των γονών *Lactobacillus sp.* και *Enterococcus sp.* καταγράφηκε και από άλλους μελετητές (356). Όμως έχει επίσης καταγραφεί και βακτηριοστατική δράση αρκετών στελεχών από την παρουσία φαινόλης (363).

4.3.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ENZYMA (ΛΥΣΟΖΥΜΗ)

Η λυσοζύμη είναι αντιβακτηριακός παράγοντας που υπάρχει στο σίελο. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε λυσοζύμη σε συγκέντρωση 100 ppm.

Αυτή η συγκέντρωση συνήθως παρουσιάζει λυτικές δραστηριότητες στα βακτηριακά κύτταρα, δρώντας κυρίως δια της υδρολύσεως. Όμως και άλλοι παράμετροι θα ήταν δυνατόν να συσχετισθούν με το αποτέλεσμα αυτό, δεδομένου ότι και χαμηλές συγκεντρώσεις λυσοζύμης έχουν εμπλακεί σε φαινόμενο λύσης βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων (361).

Παρομοίως υψηλή ανθεκτικότητα στην παρουσία λυσοζύμης ανέφεραν και άλλοι ερευνητές (353, 363, 364).

Στην μελέτη μας όλα τα αυτόχθονα στελέχη παρουσίασαν αξιόλογη ανθεκτικότητα παρουσία λυσοζύμης (πίνακες 18, 19, 20 και 21). Το χαρακτηριστικό αυτό είναι επιθυμητό δεδομένης της αντιβακτηριακής δράσης της λυσοζύμης.

4.3.5. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Βαθιές αλλαγές μπορεί να επέλθουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του ανθρώπου από τη μη σωστή χρήση των αντιβιοτικών κατά την θεραπευτική αγωγή με αυτά. Η χρήση των αντιβιοτικών μπορεί να επιφέρει διαταραχή της ισορροπίας του γαστρεντερικού σωλήνα (365). Στελέχη του γένους *Lactobacillus sp.* απομονωθέντα από κόπρανα ανθρώπων έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικά σε penicillin (366), ενώ κόπρανα ζώων έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικά στην Vancomycin, Polymixin B και Chloramphenicol (367).

Το εύρος των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί, έτσι ώστε και τα βακτήρια που βρίσκονται συνήθως ως μικροχλωρίδα στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα να μην αποτελούν εξαίρεση. Η ανθεκτικότητα αυτή αποτελεί θέμα για τη Δημόσια Υγεία κυρίως αν εστιάζεται προς αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική Ιατρική. Η ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών στην Vancomycin είναι ένας σημαντικός και ιδιαίτερος παράγοντας ανησυχίας και ενδιαφέροντος δεδομένου ότι η ουσία αυτή είναι ένα από τα τελευταία όπλα της Ιατρικής για την καταστολή και εξουδετέρωση κλινικών λοιμώξεων, που οφείλονται σε παθογόνα στελέχη με πολυανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (368, 369, 370). Μερικά στελέχη LAB όπως των γενών *L. casei*, *L. rhamnosus* και *L. plantarum* αλλά και *Pediococcus sp.* και *Leuconostoc sp.* είναι ανθεκτικά στη Vancomycin, η ανθεκτικότητά τους όμως είναι εγγενής και κωδικοποιείται με τα χρωματοσώματα, με αποτέλεσμα να μην είναι μεταφερόμενη σε άλλα βακτηριακά είδη (371, 372, 373, 374).

Το χαρακτηριστικό όμως αυτό όμως της ανθεκτικότητας είναι δυνατόν να οδηγήσει στη μεταφορά ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά σε άλλα βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και παθογόνων του γαστρεντερικού σωλήνα ιδιαίτερα όταν αυτή η ανθεκτικότητα οφείλεται σε πλασμίδια. Στελέχη που διαθέτουν παρόμοια πλασμίδια δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά στον άνθρωπο και τα ζώα.

Αν και η μεταφορά ανθεκτικότητας στη Vancomycin από στελέχη *Lactobacillus sp.* σε άλλα βακτηριακά είδη δεν είναι πλήρως μελετημένη, αντίθετα στα στελέχη *Enterococcus sp.* η ανθεκτικότητα αυτή είναι συνήθως πλασμιδιακής προέλευσης και συχνά μεταφερόμενη (375, 376).

Η ταυτόχρονη χορήγηση προβιοτικών και αντιβιοτικών είναι ένα υποσχόμενο θεραπευτικό σχήμα για αντιμετώπιση διαταραχών της εντερικής μικροχλωρίδας(377). Ως εκ τούτου απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή και περαιτέρω μελέτη για την χρησιμοποίηση των προβιοτικών.

Η ανθεκτικότητα των στελεχών μας στην παρουσία των αντιβιοτικών είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό διότι αυτά πρέπει να επιβιώνουν α) σε σύγχρονη λήψη αντιμικροβιακών παραγόντων για έλεγχο της λοίμωξης και β) σε περιπτώσεις που το γάλα το προοριζόμενο για παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων περιέχει αντιβιοτικά, λόγω αλόγιστης χρήσης των στην θεραπεία των μαστίτιδων των παραγωγικών ζώων, γεγονός σύνθηρες τις τελευταίες δεκαετίες.

Στην παρούσα μελέτη τα περισσότερα στελέχη μας ήταν ευαίσθητα στο συνδυασμό Amoxicillin with Clavulanic Acid και κυρίως εκείνα του γένους *Enterococcus sp.* (πίνακες 22, 23, 24 και 25).

Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά η ευαισθησία των στελεχών μας παρουσίαζε ποικιλία. Στατιστικά δεδομένα της ανθεκτικότητας των στελεχών μας στα διάφορα αντιβιοτικά δίδονται στην παράγραφο 3.2.2.5.

Τα στελέχη μας και η ανθεκτικότητά τους σε αντιμικροβιακούς παράγοντες που εκτιμήθηκε με βάση τις δικλείδες κατά Kirby-Bauer (338).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν δοκιμές προσδιορισμού της MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) δύο σημαντικών αντιβιοτικών της Vancomycin και Teicoplanin όπως συνιστούν οι δικλείδες της National Committee for Clinical Laboratory Standards όπως επίσης και δοκιμές με τη χρήση της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ «agar dilution method». Τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά για τα εξεταζόμενα στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* είναι όμοια με αυτά της μελέτης της Ana Belen Florez (2005).

Τα αποτελέσματά μας έρχονται επίσης σε συμφωνία με αυτά άλλων μελετητών (379, 380) όσον αφορά την ανθεκτικότητα των στελεχών μας στη Vancomycin, ενώ έρχονται σε διαφωνία με τις τιμές που κατεγράφησαν από την Cosentino S. et all (2004) η οποία σε μελέτη έδειξε μόνο ένα στέλεχος *L. faecium* να είναι ανθεκτικό στην Vancomycin.

Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά την ανθεκτικότητα στη χρήση Tetracycline έρχονται σε συμφωνία με δεδομένα άλλων μελετητών (382).

Γεγονός είναι τα περισσότερα στελέχη των *E. faecium* και *E. faecalis* έδειξαν ευαισθησία στα αντιβιοτικά Gentamycin, Ampicillin, Penicillin G. και Amoxicillin με Clavulanic Acid, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρώτη γραμμή άμυνας στην κλινική ιατρική για την θεραπεία λοιμώξεων στον άνθρωπο με αιτιολογικό παράγοντα τα στελέχη του γένους *Enterococcus*.

Η παρουσία ανθεκτικών στελεχών προβιοτικών στα τρόφιμα είναι ένα διφορούμενο σχήμα αφ' ενός μεν γιατί η ανθεκτικότητα είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό αφ' ετέρου όμως λόγω πιθανής πολυανθεκτικότητας μεταβιβαζόμενης με πλασμίδια είναι συγχρόνως και ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό. Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να αποφευχθεί αν πραγματοποιούνται εκ των προτέρω δοκιμές ευαισθησίας στους αντιβακτηριακούς παράγοντες των στελεχών που επιθυμούμε να χρησιμοποιήσουμε.

Είναι γεγονός ότι πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με το προφίλ της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των οξυγαλακτικών προβιοτικών στελεχών εν τούτοις όμως επίσημα προκαθορισμένα όρια στα αντιβιογράμματα των διαφόρων χρησιμοποιούμενων αντιβακτηριακών παραγόντων δεν υφίσταται ακόμη (163, 344, 383, 384, 385, 386).

4.4. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα αυτόχθονα οξυγαλακτικά στελέχη μας τέλος υποβλήθηκαν σε δοκιμές έναντι τεσσάρων σαλμονελλών (όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.5.) των *S. arizonae*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* και *S. typhi* για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής (προβιοτικής) δράσης των.

Στους πίνακες 26 έως και 57 αναγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα κάθε αυτόχθονου στελέχους έναντι κάθε ενός χωριστά στελεχών σαλμονελλών στις 24 και 48 ώρες και στους 37° C και 45° C. Όπως προαναφέρθηκε ο πειραματισμός έλαβε χώρα και στις 3 και 6 ώρες, αλλά δεν καταγράφηκαν τα αποτελέσματα γιατί δεν σημειώθηκε καμία αντιβακτηριακή δράση.

Από την μελέτη των παραπάνω πινάκων προκύπτει ότι δεν υφίστανται αξιόλογες διακυμάνσεις των τιμών των ζωνών αναστολής των παθογόνων μεταξύ 24 και 48 ωρών (με τις δεύτερες ελαφρά μειωμένες) ούτε μεταξύ των 37° C και 45° C (με τις δεύτερες ελαφρά μειωμένες) στις καλλιέργειες, στο υπερκείμενο υγρό και στο γαλακτικό οξύ.

Το αξιοσημείωτο που προκύπτει από τους παραπάνω πίνακες είναι η σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των ζωνών αναστολής των καλλιεργειών, έναντι των τιμών του υπερκείμενου υγρού και των τιμών του γαλακτικού οξέος.

Στους πίνακες 58 έως και 72 που παρουσιάζουν την ανάλυση διασποράς των μέσων τιμών με τυπική απόκλιση των πινάκων 26 έως και 57 καθίσταται σαφές ότι οι τιμές που προέκυψαν από τις καλλιέργειες είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος και ότι διαφέρουν στατιστικά από αυτές, δεδομένου ότι σε όλες τις περιπτώσεις η τιμή P (πιθανότητα) τείνει προς το μηδέν.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το παρατηρούμενο ανασταλτικό αποτέλεσμα δεν μπορεί αν συσχετισθεί και να αποδοθεί σε ικανοποιητικό βαθμό ούτε με το υπερκείμενο υγρό που πιθανά είναι πλούσιο σε βακτηριοσίνες, ούτε με το καθαρά γαλακτικό οξύ, αλλά με αυτό καθ' εαυτό το βακτηριακό κύτταρο και με δράσεις του που χρήσουν περαιτέρω διερευνήσεις.

Υπάρχουν αναφορές κατά τις οποίες οι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν ένα μηχανισμό προστασίας και ανθεκτικότητας έναντι στο γαλακτικό οξύ, ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ακραίων συνθηκών stress λόγω επίδρασης χαμηλού pH για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (387). Κάτι τέτοιο θα δικαιολογούσε την παρουσιαζόμενη ανθεκτικότητα των υπό εξέταση στελεχών των σαλμονελλών στο γαλακτικό οξύ στην παρούσα μελέτη.

Υπάρχουν επίσης αναφορές (163) κατά τις οποίες είναι απαραίτητος ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων ώστε να παραχθούν οι απαραίτητες ποσότητες βακτηριοσινών που θα είναι ικανές να προκαλέσουν αποτελεσματική ανασταλτική δράση σε βακτήρια που είναι ευαίσθητα σε βακτηριοσίνες.

Η ικανότητα της παρεμπόδισης των Gram(-) στελεχών, όπως είναι τα στελέχη *Salmonella* αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση, λόγω του ότι οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram(+) στελέχη, όπως είναι τα υπό μελέτη αυτόχθονα οξυγαλακτικά στελέχη μας, δεν μπορούν να παρεμποδίζουν Gram(-) μικροοργανισμούς, γεγονός που οφείλεται στην ιδιαίτερη δομή της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος (388, 389). Αναφέρονται όμως βιβλιογραφικά και περιπτώσεις βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά στελέχη με φάσμα παρεμπόδισης που να περιλαμβάνει και Gram(-) στελέχη (85).

Τα πρότυπα στελέχη αναφοράς (reference strains) έδωσαν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερες τιμές ζωνών αναστολής από τα δικά μας αυτόχθονα στελέχη, ενώ σε μερικές περιπτώσεις κυρίως σε επώαση στους 45° C τα στελέχη των *L. plantarum* και *L. paracasei* subsp. *paracasei* δεν αναπτύχθηκαν επαρκώς.

Από την μελέτη του συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (πίνακες 74 έως και 137) προκύπτει ότι σε αρκετές περιπτώσεις υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και εμφανίζεται ικανοποιητικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0,05$ μεταξύ των παραμέτρων (τιμές των ζωνών αναστολής των καλλιιεργειών, του υπερκείμενου υγρού και του γαλακτικού οξέος αφ' ενός και αφ' ετέρου της OD, του pH και της οξύτητας %) αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις ισχύει το αντίθετο, οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις δεν αξιολογούνται θετικά τα προκύψαντα αποτελέσματα. Είναι γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ισχυρή συσχέτιση και ικανοποιητικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας έδειξαν οι τιμές του γαλακτικού οξέος. Δεδομένου όμως του ότι το γαλακτικό οξύ δεν παρήχθη από τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα των αυτόχθονων στελεχών μας, αλλά προστέθηκε υπολογιζόμενο από την εκάστοτε οξύτητα% που παρουσίαζαν οι καλλιιεργειες είναι δυνατόν οι τιμές των ζωνών

αναστολής του γαλακτικού οξέος να μην είναι αξιολογήσιμες στατιστικά ως προς συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson.

Το γεγονός ότι η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε *in vitro* δεν αντανάκλα τον τρόπο εμφύτευσης και εγκατάστασης των στελεχών *Lactobacillus* και *Enterococcus* στον εντερικό σωλήνα δεδομένου ότι μια πληθώρα άλλων παραγόντων στο σύνολό τους όπως επίσης και ο ίδιος ο ξενιστής θα πρέπει να διερευνηθούν ώστε να μελετήσουμε την εντερική ισορροπία (320, 321, 351).

Η καταγραφόμενη ανασταλτική αντιβακτηριακή δραστηριότητα των αυτόχθονων στελεχών μας των *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. faecium* και *L. faecalis* ενισχύει την επιτυχή επιλογή πολλών ερευνητών στη χρήση αυτών, ώστε να βελτιωθούν ή να προκύψουν νέα σκευάσματα ζυμούμενων τροφίμων τα οποία θα δρουν ευεργετικά για τον άνθρωπο.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν και με την Fooks L.J. (2002) που ασχολήθηκε με το γεγονός της εγκατάστασης αντιμικροβιακής προστασίας από στελέχη των *L. plantarum* έναντι της *Salmonella enteritidis*.

Σύμφωνα με την παραπάνω ερευνήτρια η αντιβακτηριακή δράση του *L. plantarum* πιθανόν να επιτυγχάνεται με ένα από τους παρακάτω τρόπους: α) μείωσης της τιμής του pH του θρεπτικού υποστρώματος λόγω της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων με μικρές αλυσίδες (SCFA – Short Chain Fatty Acids) β) απόσπαση και στέρση από τα παθογόνα ειδικών ουσιών απαραίτητων για την διατροφή των τελευταίων και γ) παραγωγή βακτηριοσινών.

Σε ανάλογα συμπεράσματα με αυτά της παρούσης μελέτης όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση στελεχών του *Lactobacillus* sp. επί στελεχών *Salmonella* κατέληξαν και άλλες ερευνητικές εργασίες (21, 22, 206, 383).

Τα αυτόχθονα (άγρια) στελέχη πιθανόν λόγω ανταγωνισμού στο μικροπεριβάλλον που επιβιώνουν να έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα και να χαρακτηρίζονται από ιδιότητες που δεν απαντούν ή απαντούν σε μικρότερο βαθμό σε καλλιεργημένα στο εργαστήριο βιομηχανοποιημένα οξυγαλακτικά στελέχη.

Αυτός είναι πιθανός ο λόγος που διαφοροποιούμενα από τα πρότυπα (referens) στελέχη παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας αφ' ενός και αντιμικροβιακής δράσης σε μεγαλύτερο βαθμό αφ'ετέρου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία είχε σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μελετηθούν ως προς την αντιβακτηριακή τους (προβιοτική) δράση τα αυτόχθονα οξυγαλακτικά στελέχη που θα ανευρίσκοντο στα παραδοσιακά τρόφιμα και τα κόπρανα, ως ενιαίο σύνολο προερχόμενο από διάφορα οικοσυστήματα.

Σκοπός μας όπως προαναφέρθηκε (παράγραφος 1.2.) δεν ήταν ο εντοπισμός ενός ή μερικών βακτηρίων που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σαν εξαιρετικά σε σχέση με την προβιοτική και οξυγαλακτική τους δράση.

Ως προς το σημείο αυτό η παρούσα μελέτη πέτυχε απολύτως τον σκοπό της. Πράγματι αποδείχθηκε ότι τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται στην περιοχή της Ηπείρου και τα κόπρανα παιδιών της περιοχής αυτής είναι ένας εξαιρετικός βιότοπος πλούσιος σε αυτόχθονα (άγρια) στελέχη με αξιόλογες δράσεις.

Τα αυτόχθονα στελέχη μας παρουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων των αντίστοιχων ειδών στα οποία ταυτοποιήθηκαν. Αυτό δηλώνει ότι σε ενδεχόμενη τεχνολογική χρήση τους π.χ. παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων είναι απολύτως ικανά να αποδώσουν τις οξυγαλακτικές τους ιδιότητες.

Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν επίσης αξιόλογη ανθεκτικότητα σε παρεμποδιστικούς αντιβακτηριακούς φραγμούς του γαστρεντερικού σωλήνα (χαμηλές τιμές pH που διαμορφώνονται από το γαστρικό οξύ του στομάχου, χολικά άλατα, φαινόλη και πρωτεολυτικά ένζυμα). Άρα είναι δυνατόν να διέλθουν ζώντα ώστε να εγκατασταθούν προσωρινά ή να αποικίσουν το έντερο του ανθρώπου, προϋπόθεση απαραίτητη για να αποδοθούν οι προβιοτικές τους ιδιότητες.

Παράλληλα αρκετά από αυτά παρουσίασαν μια ενδιαφέρουσα ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών που συνήθως σήμερα χρησιμοποιούνται στην κλινική ιατρική, ιδιότητα απαραίτητη ώστε να παραμένουν ζώντα σε σύγχρονη για διάφορους λόγους παρουσία προβιοτικών και αντιβιοτικών.

Από την μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των αυτόχθονων στελεχών μας προέκυψε ότι εμφανίζουν *in vitro* αξιόλογη δράση έναντι στελεχών του γένους *Salmonella sp.* υπεύθυνων για γαστρεντερικές λοιμώξεις. Η δράση αυτή είναι κατά πολύ πιο αξιόλογη από εκείνη που επέδειξαν τα πρότυπα (*referens*) στελέχη που υποβλήθηκαν

στις ίδιες δοκιμασίες. Άρα τα δικά μας στελέχη παρουσιάζουν αξιόλογη (in vitro τουλάχιστον) προβιοτική δράση χρήσιμη για περαιτέρω μελέτη.

Η προβιοτική δράση των στελεχών μας φαίνεται ότι οφείλεται στο βακτηριακό κύτταρο και όχι στις βακτηριοσίνες ή στο γαλακτικό οξύ που παράγουν, δεδομένου ότι οι τιμές των ζωνών αναστολής των παθογόνων βακτηρίων που προέκυψαν από τις καθαρές καλλιέργειες ήταν στατιστικά πιο μεγάλες από εκείνες του υπερκείμενου υγρού (πλούσιο ενδεχομένως σε βακτηριοσίνες) και του γαλακτικού οξέος.

Συμπερασματικά τα αυτόχθονα οξυγαλακτικά στελέχη μας συγκεντρώνουν όλες τις προϋποθέσεις για να εισέλθουν σε πειραματικά πρωτόκολλα με ζώντα πειραματόζωα και να μελετηθούν έτι περισσότερο, ώστε να χρησιμοποιηθούν για τις προβιοτικές τους ιδιότητες

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα εργασία αναζητήθηκαν αυτόχθονα θερμοφιλά οξυγαλακτικά βακτήρια από διάφορες πηγές (γαλακτοκομικά προϊόντα, απαστερίωτο γάλα, τυτιές παραδοσιακά κατασκευασμένες και κόπρανα παιδιών ηλικίας 1- 3 ετών) στην περιοχή της Ηπείρου της Ελλάδος και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των παθογόνων Σαλμονελλών: *S.arizonae*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium* και *S.typhi*, που είναι συνήθη αίτια γαστρεντερικών λοιμώξεων.

Εξετάστηκαν συνολικά 120 δείγματα και απομονώθηκαν 206 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που ανήκουν σε 14 διαφορετικά είδη. Μετά την ομαδοποίηση αυτών επιλέχθηκαν 48 στελέχη που ανήκουν στα είδη *L.plantarum* (14 στελέχη), *L.casei* subsp. *paracasei* (9 στελέχη), *E.faecium* (14 στελέχη) και *E.faecalis* (11 στελέχη), τα οποία υποβλήθηκαν σε περαιτέρω δοκιμές.

Από τις δοκιμές αυτές διαπιστώθηκε ότι:

1. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν όλα τα τυπικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων.
2. Τα στελέχη αυτά είναι ικανά να επιβιώσουν στις συνθήκες διέλευσης ή αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα, διότι είναι ανθεκτικά σε ακραίες τιμές του pH, στην παρουσία χολικών αλάτων, φαινόλης και πρωτεολυτικών ενζύμων.
3. Αρκετά από τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν αξιόλογη ανθεκτικότητα στην παρουσία αντιβακτηριακών παραγόντων, που συνήθως χορηγούνται σε λοιμώξεις του γαστρεντερικού σωλήνα.
4. Αρκετά από τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση έναντι των παθογόνων Σαλμονελλών: *S. arizonae*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium* και *S.typhi*, που συνήθως προκαλούν γαστρεντερικές λοιμώξεις.
5. Τα στελέχη αυτά διαφοροποιούνται πλήρως και διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα από τα αντίστοιχα πρότυπα (references) στελέχη, με τα οποία συγκρίθηκαν όσον αφορά την αντιβακτηριακή τους δράση.

6. Η αντιβακτηριακή τους δράση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως το ίδιο το βακτηριακό κύτταρο, σαν οντότητα με συγκεκριμένες φυσιολογικές δράσεις, οι μεταβολίτες και κυρίως οι βακτηριοσίνες που παράγουν και το γαλακτικό οξύ που παράγεται από αυτά κατά τη ζύμωση της γλυκόζης.
7. Από τους παραπάνω προαναφερόμενους παράγοντες στην παρούσα μελέτη καταδείχθηκε ο πρώτος, ο οποίος είναι ο πλέον καθοριστικός για την αντιβακτηριακή τους δράση των στελεχών αυτών.

A study, in the Regional area of Epirus (Greece), of autochthones thermophiles bacteria isolated from traditional dairy product and their antimicrobial profile

Thesis by Dimitrios Vassos

Summary

The present research focuses on a study, in the Regional area of Epirus (Greece), of autochthones thermophiles bacteria originated from various sources as, dairy products, unpasteurized milk, traditional “renner” and finally feces from infants aged 1 to years old.

Futhermore, their antimicrobial activity was evaluated against classic food pathogens of the genus *Salmonella* sp.: *S.arizonae*, *S.entetitidis*, *S.typhimurium* and *S.typhi*, which are usually involve in gastrointestinal infections.

From a total of 120 samples, 206 strains of lactic acid bacteria belonging to 14 different species were recovered.

By grouping them, 48 strains belonging to the following species, *L.plantarum* (14 strains), *L.paracasei* subsp. *paracasei* (9 strains), *E.faecium* (14 strains), *E.faecalis* (11 strains) were entered on detailed study.

The following conclusions were obtained:

1. All strains showed typical characteristics of lactic acid bacteria.
2. The strains have the ability to transit or colonize the gastrointestinal tube, as they are reported to be resistant to the presence of phenol, proteolytic enzymes, bile salts and extreme pH values.
3. Most of the wild strains showed considerable resistance to antimicrobial drugs given therapeutically in gastrointestinal infections.
4. Most of the strains showed considerable antimicrobial activity against classic food pathogens of the genus *Salmonella* sp.: *S.arizonae*, *S.entetitidis*, *S.typhimurium* and *S.typhi*, which are usually implicated in gut infections.

5. All wild strains presented higher antimicrobial activity against the tested pathogens, when, compared to the reference strains.
6. Antimicrobial activity of these strains seems to be associated to various factors as, the microbial cell itself, production of different metabolites. Moreover, this activity seems to be strongly correlated with the presence of bacteriocins producing lactic acid during glucose fermentation.
7. However, from all the studied factors the first one (microbial cell itself) seems to be essential for the antimicrobial establishing profile of wild lactic acid strains.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ramet, J. P.:** Lactic Starters. In: Eck A(ed) In Cheesemaking. Science and Technology Lavoisier Publishing Inc, Paris, 1986:108-125.
2. **Condon S.:** Responses of Lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rew., 1987, 46: 269-280.
3. **Salminen S., Von Wright A., Moreli L.:** Demonstration of safe of probiotics. International Journal of Food Microbiology 1998, 44: 39-106.
4. **Limsowtin G.K.Y., Broome MC., Powell I.B.:** Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1470-1478.
5. **Axelsson L.T.:** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S (ed) Lactic Acid Bacteria, Markel Dekker, 1993: 1-63.
6. **Tamine A.Y., Marshall V.M.E., Robinson R.K.:** Microbiological and technological aspects of milk fermented by *bifidobacteria*. J Dairy Res. 1995, 62:151-187.
7. **Nettles C.G., Barefoot S.F:** Biochemical and genetic characteristic of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Protect. 1993, 56: 338-356.
8. **Klaenhammer T.R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria Biochemie. 1988, 70: 337-354.
9. **Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shorth C., Salminen S.:** Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal. 1999, 9: 43-52.
10. **Ouwehand A.C., S. Salminen, S. Toekkoe, P.J. Roberts, J. Ovaska E. Salminen :** Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. Clin Diagn Lab Immunol. 2002, 9: 184-186.
11. **Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J.:** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEEMS Microbiol. Rew. 1990, 87: 149-164.
12. **Metchnikoff E.:** The prolongation of life: optimistic studies. London: Heinemann, 1907.
13. **Moro E.:** Uber den *Bacillus acidophilus* n. spec. ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Sauglings (*Bacillus acidophilys* n. spec.). (A contribution to the knowledge of the normal intestinal bacteria of infants). Jarbuch fur kinderheilkunde in German, 1900, 52: 38-55.
14. **Beijerick M.W.:** Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry). Arch. Neerland des sciences exacts et naturelles, 1901, 6: 212-243.
15. **Cahn Dr.:** Uberdie nach Gram farbbaeren Bacillen des Saulingsstuhles (*Bacilli* of infant stools stainable according to Gram). Centralblatt fur Bakteriologie I. Abteilung Originale, 1901, 30: 721-726.
16. **Doderlein A.:** Das Scheidensekret und seine Bedeutung fur das Puerperalfieber (The vaginal transsudate and its singnificance for childbed fever). Centralblatt fur Bacteriologie, 1892, 11: 699-700.
17. **Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.:** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutricion, 2001, 73: 365s-373s.

18. **Ashenafi M.:** Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. Food Microbiol., 1991, 8:303-310.
19. **Stecchini, M. L., Aquilli, V., Sarais, I.:** Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactobacillus lactis*. Intl. J. Food Microbiol. 1995, 25:301-310.
20. **Foegeding P.M., Thomaw A.B., Pilkington D.H, Klaenhammer T.R:** Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin dry fermented sausage production. Appl. Environ. Microbiol, 1992, 58: 884-890.
21. **Chateau N., Castellano I., Deschamps A.M.:** Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. J Appl. Bacteriol. 1993, 74: 36-40.
22. **Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, de Haen C, Gozzini L.:** Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiol Lett 1997, 153:455-63.
23. **Pant AR, Graham SM, Allen S, et al. :** *Lactobacillus GG* and acute diarrhea in young children in the tropics. J Trop Petriatr 1996, 42:162-5.
24. **Startor R.B.:** Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, prebiotics. Gastroenterology 2004, 126: 1620-1633.
25. **Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH.:** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. Lancet 1994, 344:1046-9.
26. **Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P.B. and Ross R.P.:** Market potential for probiotics, American journal of clinical Nutrition, 2001: 4765-4835.
27. **Isolauri E.:** Probiotics and gut inflammation. Curr. Opin. Gastroenterol. 1999, 15: 534-537.
28. **Perdigon G., Fuller R., Raya R.:** Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Curr Issues Intest. Microbiol 2001, 2: 27-42.
29. **Van den Driessche M., Veereman – Wauters G.:** Functional foods in pediatrics. Acta Gastroenterol Belg 2002: 45-51.
30. **Svensson U.:** Industrial perspectives. In probiotics: A critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham U.K., 1999: 57-64.
31. **Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. C., Holzappel W.H.:** Safety assessment of starters and probiotics. In M. Adams & R. Nisbet (eds), Fermentation and food safety, Gathersburg, M.D.: Aspen Publishers. 2000, : 239-251.
32. **Holzappel W.H., Schillinger U.:** Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 2002, 35: 109-116.
33. **Hammes W.P., Hertel C.:** Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. Food Research International, 2002, 35: 165-170.
34. **Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Frank A., Gibson G.R., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I.:** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition, 1998, 80: 147-171.
35. **Bezirtzoglou E.:** Contribution a l etude de l implantation de la flore fecale anaerobie du nouveau-ne mis au monde cesarienne. Doctorat no 13, Paris-Sud, 1985.

36. **Black F.T., Auelersen P.L., Orsekov J.:** Prophylactic efficacy of *Lactobacilli* on traveler's diarrhea Travel Med 1989, 7: 333-5.
37. **Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V., Tunail N., Litopoulou-Tzanetaki E.:** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes; milk. J of Appl. Microbiology 2001, 91: 861-870.
38. **Psoni L., Kotzamanides C., Andrighetto C., Lombardi A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E.:** Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzes a raw milk cheese. Intern. J. of Food Microbiology, 2006, 109: 109-120.
39. **Salminen S., Ouwehand A. C.:** Probiotics, Applications in Dairy Products. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press, Elsevier Science, Ltd, 2002: 2315-2321.
40. **Dellagio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C., Janssens D.:** Caracteristiques generales des bacteries lactiques. In: de Roissant H., Luquet F. M. (eds) Bacteries Lactiques: Aspects Foudamentaux et Technologiques. Vol I Uriage: Lorica, 1994: 25-116.
41. **Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds):** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
42. **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.:** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International journal of Food Microbiology, 1998, 41:103-125.
43. **Stiles M.E., Holzapfel W.H.:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 1997, 36: 1-29.
44. **Tamine A. Y.:** Microbiology of starter cultures. In: Robinson RK (ed) Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products. Applied Science Publishers, London, 1981 :113-156.
45. **Cogan T. M., Hill C.:** Cheese starter cultures. In Fox P.F (ed) In cheese: Chemistry Physics and Microbiology vol I Chapman and Hall, London, 1993: 179-239.
46. **Ανυφαντάκης Ε. Μ.:** Τυροκομία, Χημεία-Φυσικοχημεία-Μικροβιολογία Β΄ έκδοση, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, 2004:187-192.
47. **Ανυφαντάκης Ε. Μ.:** Οι μικροβιακές καλλιέργειες στη Βιομηχανία γάλακτος και η σημασία τους για την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοκομία Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Αθήνα, 1992:15-33.
48. **Pappa E., Anifantakis E.M.:** Effect of different concentrated culture on the protelysis and organoleptic characteristivs of Feta cheese. Milchwissenschaft, 2001, 56: 384-387.
49. **Law B.A.:** Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: Fox P.F. (ed) cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Elsevier Applied. Science, London, 1987: 365-392.
50. **Ballesteros Cr., LI. Palop., I. Schanchez. :** Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of "Almargo" eggplants. Int. journ. Of Food Microbiaol., 1999, 24, 3: 195-2002.
51. **Kotzekidou,P., I. Roykas :**The yeasts. A taxonomic study. 3rd Edition Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. 1987
52. **Gilliland, S.E., Speck L.M.:** Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. J. Food Prod., 1977, 49: 820-3.

53. **Isolauri E.:** Probiotics in Human disease. Am. J. Clin Nutr. 2001, 73: S1142-S1146.
54. **Heyman M.:** Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. J. Am. Coll Nutr 2000: 1375-1465.
55. **Felten A., Barreau C., Biget C., Lagrange P.H., Philippon A.:** *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. J Appl Microbiol. 1999, 37: 729-33.
56. **Sandine W.E.:** Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. J. Food Prot. 1979, 42: 259-262.
57. **Venema K., Abee A. J., Haandrikman K. J., Leenhouts K. J., Kok J., Konings W. N., Venema G.:** Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Applied Environ. Microbiol., 1993, 59: 1041-1048.
58. **Van Belkum, M. J.:** Lactococcal bacteriocins: genetics and mode of action. Ph. D. thesis University of Groningen, Groningen, The Netherlands 1991.
59. **Cindas L.M. , Casays MP, Fernandez MF, Hernandez PE :** Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and food-borne pathogenic bacteria. Food Microbiol, 1998, 15: 289-298.
60. **Silla, H., I. Molina, J. Flores, D. Silvestre:** A study of the microbial flora of dry-cured ham. isolation and growth. Fleischwirtsch, 1989, 69: 1128-1131.
61. **Duszkiewich-Reinhard, W., E., Gujska, K. Khan.:** Reduction of stachyose in legume flours by Lactic acid bacteria. J. Food Sci. 1994, 59: 115-117.
62. **Kyung, K. H., and H.P. Fleming:** Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. J. Food Sci. 1994 , 59: 125-129.
63. **Breidt F., K. A. Crowley, H.P. Fleming:** isolation and characterization of Nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* for use in cabbage fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 110s:3778-3783.
64. **Castro de, A., Manuel Brenes, :** Fermentation of washing waters of Spanish style green olive processing. Process Biochemistry. 2001, 36, 8-9:797-802.
65. **Khetarpaul W, B.M. Chauhan.:** Effect of germination and pure culture fermentation by yeasts and *lactobacilli* on phytic acid and polyphenol content of pearl millet. J. food Sci. 1990:1180.
66. **Edwards C. G., J. R. Powers, K. A. Jensen, K.M. Weller, J. C. Peterson:** *Lactobacillus* spp. From Washington State Wines. J. Food Sci. 1993:453-58.
67. **Sanni, A. L., J. Mrlon-Guyot and J. P. Guyot.:** New efficient amylase producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. Inter. Journal of Food Microbiol. 2002 , 72: 53-62.
68. **Svanberg U., W. Zorri, A.S. Sandberg :** Lactic fermentation of non-tannin and high-tannin cereals. Effects on in vitro estimation of iron availability and phytate hydrolysis. J. food Sci 1993: 408-412.
69. **Hoffman C. J., W.E.:** Marshall. lactic fermentation of ground soybean for use imitation cream cheese products. J. Foods Sci. 1985, 50, 2: 325-329.
70. **Villamil L., Figueras A., Planas M., Nonoa B :** Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 2003, 219 (1-4):43-56.

71. **Planas M., Vazquez JA, Marques I, Perez-Lomba R, Gonzalez MP Murado M:** Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 2004 , 240 (1-4):313-329.
72. **Vazquez JA, Gonzales MP, Murado MA:** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 2005 , 245:149-161.
73. **Moon-Soo H, Byung-Kyoo Y :** Screening of probiotic strains for use in aquaculture. *J Fish Sci Tech.* 2002, 5(3):200-205.
74. **Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H :** The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005, 243(1-4):241-254.
75. **Vaseeharan B, Lin J. Ramasamy P:** Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity and plasmid profiles of *Listonella anguillarum*-like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. *Aquaculture* 2004 , 241(1-4): 77-91.
76. **Kozasa M.:** Toyocerin (*Basillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding. *Microbial Aliment Nutr.* 1986, 4: 121-135.
77. **Gatesoupe F.J., Arakawa T., Watanabe T.:** The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 1989, 83; 39-44.
78. **Gatesoupe F.J.:** The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brechionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 1991, 96: 335-342.
79. **Austin B., Stuckey L.F., Robertson P.A., Effendi I., Griffith D.R.W.:** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis*, 1995, 18: 93-96.
80. **Griffith D.R.W.:** Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In *Larvi '95-Fish 8 Shsllfish Larviculture Society, Special Publication Nf-24*, Gent, Belgium, 1995: 478.
81. **Μπαλατσούρας Γ.:** Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις «Εμβρυο» Αθήνα, 2006:194-230.
82. **Hickey M.W., Hillier A.J., Jago G.R.:** Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homommentative *lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiology*, 1986, 51: 825-831.
83. **Axelsson L.:** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S. Von Wright A. (eds) *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, New York: Marcel Dekker 2nd eds. 1998:1-72.
84. **Καμιναρίδης Σ.:** Σύγχρονες εξελίξεις στη χρησιμοποίηση εναρκτήριων και συμπληρωματικών μικροβιακών καλλιεργειών καθώς και ενζύμων. Πρακτικά σεμιναρίου στη Γαλακτοκομία, Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Λάρισα, 2002: 223-245.
85. **Ακτύπης Α.:** Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από στελέχη οξυγαλακτικών καλλιεργειών που απομονώθηκαν από Ελληνικά παραδοσιακά προϊόντα, Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, 1999: 9-20.
86. **Jay, J. M.:** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbial.*, 1982, 44: 525-532.
87. **Hurst A., Hoover DG :** Nisin. In: *Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker Inc, New York, 1993: 369-407.

88. **Chikindas ML, Montville TJ** : Prespectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Control of foodborne microorganisms, Marcel Dekker, New York, 2002:303-321.
89. **Lucke F. K., Earnshaw R. G.**: Starter cultures. In : Russell N. J., Gould G. W., Food Preservatives, Blackie Glaskow and London , 1991 :215-234.
90. **Adams M.R.**: Topical aspects of fermented foods. Trends in Food Sci. Technol., 1990, 1: 140-144.
91. **Adams M.R., Hall C.J.**: Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and cet- ic acids and their mixtrures. Intem. J. Food Sc. Techn. 23, (1998) 287-292.
92. **Frank J.F., Hassan N.A.**: Starter cultures and their use. In: Mant E.M., Steel J.L. (eds) Applied dairy microbiology, Marcel Dekker Inc, New York, 1998: 173-194.
93. **Genigeorgis C.A.**: Microbial and safety implications of the use of modified atmo- spheres to extend the storage life of fresh meat and fish. Intem. J. of Food Microbiol., 1985:237-251.
94. **King A. D., Nagel C. W.**: Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Food Sci., 1975, 40:362-366.
95. **Dixon N. M., Kell D. B.**: A review. The inhibition by CO₂ of growth and metabolism of microorganisms. J. of Appl. Bacteriol., 1989, 67: 109-136.
96. **Gunsalus I. C., Umbreit W. W.**: The oxidation of glycerol by *Streptococcus faecalis*. J. bacterial. 1945, 49 : 347-357.
97. **Piard J. C. Muriana P. M., Desmazeaud M. J., Klaenhammer T. R.**: Purification and partial characterization of *lacticin* 481, a lanthionine-containing bacteriocin pro- duced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58: 279-284.
98. **Anasthaswamy H. N., Eigenstark A.**: Repair of hydrogen peroxide indused single- strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. J. Bacterial., 1977, 130:187- 191.
99. **Byczkowski, J., Gessner, T.**: Biological role of superoxide ion-radical. Intem. J. Bio- chem. 1988 :569-580.
100. **Juven, B. J., Weisslowicz, H., Harel, S.**: Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures. J. of Appl. Bacteriol., 1988, 65: 357-360.
101. **Lucke F. K., Popp J., Kreutzer R.**: Formation of hydrogen peroxide by *Lactoba- cilli* isolated from fermented and pasteurized sliced sausages. Chem.. Microbiol. Technol. Lebenesm., 1986, 10:78-81.
102. **Price, R. J., Lee, J. S.**: Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *lactobacilli*. J. of Milk Food Technol., 1990, 33: 13-18.
103. **Pruit K. M., Reiter B.**: Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: Pruit, K. M., Tenovuo, (eds) The Lactoperoxidase system, Immunology series, Dekker, M. Inc., NY. 1985: 143-178.
104. **Pruit K. M., Tenovuo J.** : Andrewes, R.W., McKane, T.: Lactoperoxidase cata- lyzed oxidation of thiocynate: polarographic study of the oxidation products. Bio- chemistry, 1982, 21: 562-567.
105. **Baumann E.**: Ueber bactericide Wirkung verschiedener Stoffe auf Tuberkelbacil- len. Klin. Wochenschr, 1938, 17:382-386.
106. **Moltagh, A. M., Johnson, M. C., Ray, B.**: Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. J. Food Prt. 1991, 54: 873-878.

107. **Egyad L. G.:** Studies on cell division: the effect of aldehydes ketones and a-ketonaldehydes on the proliferation of *E. coli*. *Curr. Med. Biol.* 1967, 1: 14-20.
108. **Branen A. L., Go H. C., Genske G. R.:** Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Food Sc.* 1975, 40: 446-450.
109. **Pulusani S. R., Rao D. R., Sunki G. R.:** Partial purification and characterization of antimicrobial compound produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* 1979, 44 (2): 575-578.
110. **Abdel-Bar, Harris N.D.:** Inhibitory effect of *Lactobacillus bulgaricus* on psychotropic bacteria in associative cultures and in refrigerated foods. *J. Food Protect.*, 1984, 47:61-64.
111. **Abdel-Bar, Harris N.D., Rill R.L.:** Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. food Sci.* 1987, 52: 411-415.
112. **Talarico T. L., Dobrogosz W. J.:** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33: 674-679.
113. **Talarico T. L., Casas I. A., Chung T. C., Dobrogosz W. J.:** Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1988, 32:1854-1858.
114. **Chung K. T., Dickson J. S., Grouse J. D.:** Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55:1329-1333.
115. **Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG :** Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4oC in vacuum packages. *Food Microbiol*, 2003, 20: 661-669.
116. **Cindas L.M., Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE :** Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Tech Int*, 2001, 7: 281-305.
117. **Davey G.P., Richardson B.C.:** Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol*, 1981, 41: 84-89.
118. **Davey G.P.:** Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. *N.Z.J. Sci. Technol* 1981, 16:187-190.
119. **Zajdel J.K., Geglowski P., Dobrzanski W.T.:** Mechanism of action of Lactostreptocin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol*, 1985, 49: 969-974.
120. **Nes I.F., Mortvedt C.I., Nissen-Meyer J., Skaugen M.:** Lactocin S, a lanthionine-containing bacteriocin isolated from *Lactobacillus sake* L45. In: De Vuyst, Vandamme E.J. (eds) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1994: 435-49.
121. **Frazer AC, Sharratt M., Hickman JR :** The biological effects of food additives. I. Nisin, *J Sci Food Agric*, 1962, 13: 32-42.
122. **Hurst A., Hoover D.G.:** Nisin. In: Davidson P.M., Branen A.L. (eds.). *Antimicrobials in foods*, NY: Marcel Dekker, Inc., 1993: 369-394.
123. **Einarsson H., Lauzon HL :** Biopreservation of brined shrimp (*pandalus-borealis*) by bacteriocins from lactic-acid bacteria. *Appl Eniromm Microbiol*, 1995, 61: 699-676.

124. **Mansour M, Milliere JB:** An inhibitory synergistic effect of anisin-monolaurin combination on *Bacillus* spp. Vegetative cells in milk. *Food Microbiol*, 2001, 18: 87-94.
125. **Yamazaki K., Yamamoti T, Kawai Y. Inoue N :** Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and didlycerol fatty acid ester. *Food Microbiol*, 2004, 21: 283-289.
126. **Masshalck B., Houdt RV., Michiels CW:** Higt pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin and nisin. *Int. J. Food Microbiol*, 2001, 64: 325-332.
127. **Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaongar KN, Barbuddle SB:** Effect of nisin and its components with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci*, 2000 , 56: 215-219.
128. **Zuckerman H., Avraham RB :** Control of growth of *Listeria monocytogenes* in fresh salmon using Microgard TM and nisin. *Lebensm Wiis Technol*, 2002, 35: 543-548.
129. **Branen JK., Davidson PM:** Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediamine-tetraacetic acid and lactoferrin. *Int J. Food Microbiol*, 2004, 90: 63-74.
130. **Andersson R.E., Daeschel M.A., Hassan H. M.:** Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie* 1988, 70:381-390.
131. **Abee T., Krockel L., Hill C.:** Bacteriocins: modes of action and pontentials in food preservation and control of food poisoning. *Intermit. J. Food Microbiol*. 1995, 28: 169-185.
132. **Asperger H., Url B.:** In vitro and in vivo efficiency of bacteriocins on *Listeria*. *FEMS Microbiol. Rev.* 1990, 87 :87-85.
133. **Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R.:** Purification and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 45 : 1808-1815.
134. **Barnby-Smith F. M., Roller, S. D., Woods L. F. J., Barker M. B., Nigthingale M., Gibbs P. A.:** Production of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 1989, 171: 1597-1601.
135. **West C. A., Warner P. J.:** Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988, 49 :163-165.
136. **Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., Coppola, S.:** Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, 74: 380-387.
137. **Vignolo G. M., De Kairuz M. N., De Ruiz Holgado A. A. P., Oliver G.:** Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78 : 5-10.
138. **Ward D. J., Somkuti G. A.:** Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43:330-335.
139. **Μεταξόπουλος Ι., Ματαράγκας Μ., Δροσινός Ε.Χ.:** Βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως βιοσυντηρητικών (II). *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας* 2003, 54: 69-77.

140. **Tichaczek P. S., Nissen-Meyer J., Nes I., Vogel R. F., Hammes W. P.:** Characterization of the bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH673. System. Appl. Microbiol. 1992, 15: 460-468.
141. **Tichaczek P. S., Vogel R. F., Hammes W. P.:** Cloning and sequencing of cur A encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. Arch. Microbiol., 1993, 160: 279-283.
142. **Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W.H.:** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 1996:158-164.
143. **Hugenholtz J., De Veer CJCM:** Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. In: G. Jung and H.G. Sahl (eds). Nisin and novel lantibiotics ESCOM, Leiden, 1991:440-448.
144. **Delves – Broughton:** The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria: Int Biodeterior Biodegr, 1993, 32: 87-97.
145. **Zottola E.A., Yezzi T.L., Ajao D.B., Roberts R.F.:** Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. Int J Food Microbiol, 1994, 24: 227-238.
146. **Giraffa G., Piccioni N., Neviani E., Carminati D.:** Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. Food Microbiol, 1995:301-307.
147. **Davies E.A, Bevis H.E., Delves-Broughton J.:** The use of the bacteriocin, nisin as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol, 1997, 24:343-346.
148. **Ferreira MASS, Lund B.M.:** The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. Lett Appl Microbiol, 1996, 22:433-438.
149. **Nissen H, Holo H., Axelsson L., Blom H.:** Characterization and growth of Bacillus spp. In heat-treated cream with or without nisin. J Appl Microbiol, 2001, 90:530-534.
150. **Stiles M. E., Hastings J. W.:** Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends in Food Science and Technology October Issue 1991: 247-251.
151. **Schillinger, U., Kya, M., Lucke F. K.:** Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J. Appl. Bacteriol. 1991, 70:473-478.
152. **Tichaczek PS, Vogel RF., Hammes WP.:** Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. Microbiol 1994, 140: 361-367.
153. **Holck A., Axelsson I., Birkeland S.E., Aukrust T., Bloom H:** Purification of amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB 706. J. Gen. Microbiol, 1992, 138: 2715-2720.
154. **Berry E.D., Liewen M.B., Mandigo R.W., Hutkins R.W.:** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. J. of Food Prot, 1990, 53: 194-197.
155. **Rayman K., Malik N., Hurst A.:** Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. Appl Environ Microbiol, 1983, 46: 1450-1452.

156. **Rayman K., Aris B., Hurst A.:** Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 375-380.
157. **Taylor L.Y., Somers E.B.:** Evaluation of the antibotulinum effectiveness of nisin in bacon. *J. Food Prot.*, 1985, 48: 949-952.
158. **Scott V.N., Taylor S.L.:** Effect of nisin on outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci*, 1981a, 46, 117-120.
159. **Scott V.N., Taylor S.L.:** Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci*, 1981/b, 46, 121-126
160. **Vescovo M., Orsi C., Scolari G., Torriani S. :** Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready to use vegetables. *Lett Appl Microbiol* 1995, 21:121-125.
161. **Jay, J. M.:** Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44: 525-532.
162. **Schillinger, U. Lucke F. K.:** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55: 1901-1906.
163. **Schillinger, U. Lucke F. K.:** Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. *Food. Microbiol.* 1987, 6: 229-242.
164. **Choi SY, Beuchat L.R.:** Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of Kimchi. *Food Microbiol* 1994, 11: 301-307.
165. **Gopal P.K.:** *Lactobacillus sp – L. acidophilus*. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1484-1487.
166. **Curry B., Crow V.:** *Lactobacillus sp*. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1479-1510.
167. **Kandler O., Weiss N.:** Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe E. and Holt J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins. 1986: 1209-1234.
168. **Tamine AY:** Microbiology of "Starter Cultures". In: Robinson RK (ed.) *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products*, vol. 2, 2nd, London: Elsevier Applied Science, 1990: 129-201.
169. **Crow V., Curry B:** *Lactobacillus delbrueckii* Group. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1494-1497.
170. **Dellagio F, Dicks LMT, Du Toit M and Torriani S:** Designation of ATCC334 in place of ATCC393 (NCDO161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41: 340-342.
171. **Buchanan R.E., Gibbans N.E.:** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, Williams – Wilkins comp., Baltimore, 1974: 576-593.
172. **Corsetti A., Gobbetti M.:** *Lactobacillus sp. – L. plantarum*. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1501-1507.
173. **Banwart G. J.:** *Basic Food Microbiology* 2nd ed. Avi Book. Van Nostrand Reinhold New York, 1989.

174. **Litopoulou – Tzanetaki E.:** Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of kefalotyri cheese. *J. Food Sci.*, 1990: 11-112.
175. **Hard L.J.H., Davey G.P., Heap H.A.:** *Lactococcus sp.* In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Elsevier Science, 2002: 1511-1516.
176. **Walter PH, Weiss N, Holzapfel W.:** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder W and Schleifer K (eds.) *The Prokaryotes*, 2nd and, New York: Springer-Verlag, 1992: 1535-1594.
177. **Gasser F., Montel M-C, Talon R, Champomier M.:** Taxonomie moleculaire appliquee a la classification des bacteries lactiques. In: de Roissart H and Luquet FM (eds). *Bacteries Lactiques: Aspects Fondamentaux et Technologiques*, 1994, 1, pp. 117-139. Uriage: Lorica.
178. **Ballongue J.:** *Bifidobacterium* and probiotic Acion In: Saminen S., *Lactic Bacteria*, Marcel Dekker, INC, New York, 1993: 357-428.
179. **Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtiere L, Salminen S.:** Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992, 37:121-8.
180. **Kaur I.P., Kanwaljit C., Amarpreet S:** Probiotics: potential pharmaceutical application, *European journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 15: 1-9.
181. **Lilley D.M. Stiuwell R.H. :** Probiotics: growth promoting factors produced by Microorganisms. *Science* 1965 , 147: 747-748.
182. **Parker R.B. :** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 1974, 29: 4-8.
183. **Fuller R.:** Probiotics in man animals. A review. *j Appl Bacteriol* 1989 66:365-78.
184. **Gyerraer F. and G.J. Schaafsma:** Probiotics *Int. J. Food. Microbiol.* 39, 1998 237-238..
185. **Chou C.C., Hou J.V.:** Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk during storage. *International journal of Food Microbiology* 2000: 113-121.
186. **Kailasapathy K., Rybka S.:** *L. acidophilus* and *Bifidobacterium sp.*-their therapeutic potential and survival in yogurt. *J Dairy Technol.* 1997, 52: 28-35.
187. **Martensson O., Oste R., Holt O.:** The effect of yogurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Research International*, Article in Rsesse, 2002
188. **Teuber M.:** Fermented milk products. In: Lund B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.W. (eds). *The microbiological safety and quality of food*. Aspen publisher, Gaithersburg, Maryland, 2000: 535-589.
189. **Ouwenhand A.C.and S. Salminen :** The health effects of cultured milk products with viable and non viable bacteria. *Int. diary j.* 1998, 8: 749-758.
190. **Kaila M., E. Isolauri, M. Saxelin, H. Arvilommi T.Vescari :**Viable versus inactivated *Lactobacillus strain GG* in acute rotavirus diarrhea. *Arch. Dis. Childhood.* 1995, 72: 51-53.
191. **Vesa T., P. Marteau, R. Korpela:** *Lactose intolerance*. *J. am. Coll. Nutr.* 2000, 19: 165S-175S.

192. **Lee Y.K., K. Nomoto, S. Salminen, S.L. Gorbach** : Salminen S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Lee (1999) Probiotics: how should they be defined. Trends Food Sci. technol. 1999, 10: 107.-110.
193. **Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huisin't Veld J.H.J.:** Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, 1998, 41: 85-101.
194. **Kailasapathy K., Chin J.:** Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* Immunol. Cell. Biol. 2000, 78: 80-88.
195. **Adams M.R., Marteau P.:** On the safety of Lactic Acid Bacteria from food. International journal of Food Microbiology, 1995, 27: 263-264.
196. **Salminen S., Vanwright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., Devos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Morgensen G., Birkeland J., Matilla-Sandhehn T.:** Demonstration of safety probiotics. Intern J. FD Microbiol. 1998, 44: 93-106.
197. **Gibson G. R., Saaverda J.M., Macfarlane S., Macfarlane G.T.:** Probiotics and intestinal infections, In: **Fuller R. (ed):** Probiotics 2: Applications and practical aspects by Chapman & Hall, 1997: 10-39.
198. **Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E., Salminen S.J.:** The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEEMS Microbiol. Lett. 1998, 167: 185-189.
199. **Tuomola E.M., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri Salminen** : Quality assurance criteria for probiotic bacteria. Am J. Clin Nutr 2000 , 73: S393-S398.
200. **Dunne C., Murphy L., Flynn S., O'Mahony L., O'Halloran S., Feeney M., et al:** Probiotics: from a myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek 1999: 279-92.
201. **Elo S., M. Saxelin S. Salminen** : Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. Lett. Appl. Microbiol. 1991, 13: 154-156..
202. **Alander M, Korpela R, Saxelin M. :** Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. Lett Appl Microbiol 1999, 24:361-4.
203. **Johansson M.L., Nobaek S., Berggren A., M. Nyman, Bjorck I., Ahrne S., Jeppson B., Molin G.:** Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843(229v) and effect on the short-fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. Int. J. Food Microbiol, 1998, 42: 29-38.
204. **Bernet-Camard M.F., V. Lievin, D. Brassart, J.R. Neeser, A.L. Servin, S. Hudault:** The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. Appl. Environ. Microbiol, 1997, 63: 2747-2753.
205. **Coconier M.H., Lieven V., Hemery E., Servin:** Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain L.B. Appl. Environ. Microbiol 1998, 64: 4573-4580.
206. **Hudault S., Lieven V., Bernet-Camard M.F., Servin A.L.:** Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. Appl. Environ Microbiol, 1997, 63: 513-518.

207. **Καμιναρίδης Σ., Μανωλοπούλου Ε., Ζωΐδου Ε.:** Εργαστηριακός έλεγχος οξυγαλακτικών καλλιέργειών. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοβιομηχανία. Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες στη Βιομηχανία Γαάλακτος, Εθνική Επιτροπή Γάλακτος, Αθήνα, 1992: 113-127.
208. **Temmerman R., G. Huys, B. Pot and J. Swings :** Identification and antibiotic resistance of isolates from probiotic products. Abstracts of 1001st ASM General Meeting 2001 : C-289.
209. **Hamilton – Miller J.M.T. :** A review of clinical trials of probiotics in the management of inflammatory bowel disease. Infect. Dis. Rev. 2001, 3: 83-87.
210. **Ronka E, Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M.:** Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*, International journal of Food Microbiology 2573, 2002, Article in Press.
211. **Limsowtin G. K. Y., Broome M. C., Powell I. B.:** Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press, Elsevier Science, Ltd, 2003: 1470-1513.
212. **McFarland LV, Elmer GW.:** Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. Anaerobe 1997, 3:73-8.
213. **Harris L.J., Daechsel M.A., Stiles M.E., Klaenhammer T.R.:** Antimicrobial activity of lactic bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 1989, 52: 384-387.
214. **McKay A. M.:** Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria sp.* Lett. Appl. Microbiol. 1990, 11: 15-17.
215. **Olsen A., Halm M., Jakobsen M.:** The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. J. Appl. Bacteriol., 1995, 75: 506-512.
216. **Saito Y., Hamanaka Y., Saito K., Takizawa S., Benno Y.:** Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. Curr Microbiol 2002, 44(5):368-73.
217. **Davidson, P.M., Hoover D.C.:** Antimicrobial components from lactic acid bacteria in Lactic Acid Bacteria (eds S. Salminen and A. von Wright) Marcel Dekker, New York, 1993: 127-59.
218. **Gronland M.M., H. Arvilommi, P. Kero, O.P. Lehtonen E. Isolauri :** Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months. Arch. Dis. Childhood 2000, 83: F186-F192.
219. **Nemcova, R. :** Criteria for selection of *Lactobacilli* for probiotic use. Vet. Med. 1997, 42: 19-27.
220. **Junen B.J., Schved F., Linder P.:** Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Prot., 1992, 55: 157-161.
221. **Launiala K. :** The effect of unabsorbed sucrose and manitol on the small intestinal flow rate and mean transit time. Scand. J. Gastroenterol. 1968, 3: 665-671.
222. **Alm L.:** Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. J Dairy Sci., 1982, 65: 346-52.

223. **Dehkordi N., Rao D.R. , Warren A.P.:** Lactose malabsorption as influenced by chocolate milk, skim milk, sucrose, whole, and lactic cultures. *J Am. Dietetic Ass.*, 1995, 95: 484-6.
224. **Callagher C.R., Molleson A.L., Caldwell J.H.:** Lactose intolerance and fermented dairy products. *J Am. Dietetic Ass.*, 1974, 65: 418-19
225. **Gaon D., Doweck Y., Zavaglia A.G.:** Lactose digestion by milk fermented with human strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Medicina*, 1995, 55: 237-42.
226. **Kim HS, Gilliland SE.:** *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.* 1983, 66:959-66.
227. **Claeson M. M.H. Merson :** Global progress in the control of diarrheal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990, 9: 345-355.
228. **Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L.:** Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997, 25:516-9.
229. **Kaila M., E. Isolauri, E. Soppi, E. Virtanen, S. Laine H. Arvilommi:** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus strain*. *Ped. Res.* 1992 , 32: 141-144.
230. **Sugita T. and M. Togawa :** Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. *Jpn. J. Periatr.* 1994 , 47: 2755-2762.
231. **Shornikova A-V, Isolayri E., Burnakova L., Lukovnikova S., Vesikari T.:** A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus GG* for treatment of acute diarrhea. *Acta Pediatr* 1997, 86: 460-5.
232. **Majamma M, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T.:** Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995, 20:333-8.
233. **Isolauri E., Kaila M., Mykkanen H., Ling WH., Salminen S.:** Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994, 39: 2595-600.
234. **Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanaukee P., Koivu,a T.:** A human *Lactobacillus strain (Lactobacillus Casei sp strain GG)* promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991, 88: 90-7.
235. **Salminen S.J., Saxelin M.:** Comparison of successful probiotic strains. *Nutrition Today*, 1996, 31: 32-34.
236. **Gorbach SL.:** Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterol* 2000, 95(1 Suppl): S2-4.
237. **Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T.:** Improved immunogenicity of oral D x PRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei GG*. *Vaccine* 1995, 13:310-2.
238. **Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, et al.:** A placebo – controlled trial of *Lactobacillus GG* to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999, 134:15-20.
239. **Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, et al.:** Double – blind report on the efficacy of lactic acid – producing *Enterococcus SF68* in the prevention of antibiotic – associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhea. *J Int Med Res* 1989, 17:333-8.
240. **Fukuda M., Kanauchi O., Araki Y., Andoh A., Mitsuyama K., Takagi K., Toyonaga A., Sata M., Fujiyama Y., Fukuoka M., Matsumoto Y., Bamba T.:** Pre-

- biotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int Mol Med* 2002; 65-70.
241. **Marteau PR., de Vrese M., Cellier CJ., Schrezenmeir J.:** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J. Clin Nutr* 2001, 73 (2 Suppl): 430S-436S.
 242. **Buydens P, Debeuckelaere S.:** Efficacy of SF68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo – controlled trial. *Scand J Gastroenterology* 1996, 31:887-91.
 243. **Jin LZ., Ho YW., Abdullah N., Ali MA., Jalaludin S.:** Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett Appl Microbiol* 1996,23: 67-71.
 244. **Midolo PD., Lambert JR., Hull R., Luo F., Grayson ML.:** In vitro inhabitation of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1995, 79: 475-9.
 245. **Bhatia SJ., Kochar N., Abraham P., Nair NG, Mehta AP.:** *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J Clin Microbiol* 1989, 27: 2328-30.
 246. **Ishihara K, Miyakawa H, Hasegawa A, Takazoe I, Kawai Y.:** Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1985, 49:692-4.
 247. **Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, et al.:** Effect of *Lactobacillus GG* Yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhea. *Ann Med* 1990, 22:57-9.
 248. **Tankanow RM, Ross Mb, Entel IJ, Dickinson DG, McCormic LS, Garfinkel JF.:** A double – blind, placebo – controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin – induced diarrhea. *Ann Pharmacol* 1990, 24:382 – 4.
 249. **Witsell DL, Garrett CG, Yarbrough WG, Dorrestein SP, Drake AF, Weissler MC.:** Effect of *Lactobacillus acidophilus* on antibiotic – associated gastrointestinal morbidity: a prospective randomized trial. *J Otolaryngol* 1995, 24:230-3.
 250. **Gismondo M.R., L. Drago A. Lombardi :** Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. j. Antimicrob. Agents* 1999, 12: 287-292.
 251. **Pochapin, M., :** The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 2000, 95: S11-S13.
 252. **DuPont HL, Ericsson CD.:** Prevention and treatment of traveler’s diarrhea. *N Engl J Med* 1993, 228:1821-7.
 253. **Oksanen PJ, Salminen S, Saxalin M, et al.:** Prevention of travellers’ diarrhea by *Lactobacillus GG*. *Ann Med* 1990, 22:53-6.
 254. **Gorbach SL., Chang TW., Goldin B.:** Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* 1987. 2: 1519 (letter).
 254. **Borgia M., Sepe N., Brancato V.:** A controlled clinical study on *Streptococcus faecium* preparation for the prevention of side reactions during long-term antibiotic treatments. *Curr Ther Res*, 1982, 31: 265-71.
 255. **Saaverda, J.M.:** Clinical application of probiotic agents. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 73: 1147S-1151S.
 257. **Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, et al.:** The effects of *Lactobacillus strains* and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996, 111:334-44.

258. **Gaon D., Garmendia C., Murrieto NO., de Cucco Games A., Cerchio A., Quintas R., et al.:** Effect of *Lactobacillus strains* (*L. casei* and *L. acidophilus strains* cereal) on bacterial overgrowth related chronic diarrhea. *Medicina (B Aires)* 2002; 159-63.
259. **Mattila - Sandhom T., S. Blum, J.K. Collins, R. Crittenden, W. De Vos, C. Dunne, et al.:** Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. technol.* 1999, 10: 393-399.
260. **Gupta P., H. Andrew, B.S. Kirschner and S. Guandalini :** Is *Lactobacillus GG* helpful in children with Crohn; s disease. Results of a preliminary, open-label study. *J. ped. Gastroenterol. Nutr.* 2000 , 31: 453-457.
261. **Guslandi M., G. Mezzi, M. Sorghi and P.A. Testoni :** *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn;s disease. *Digest. Dis. Sci.* 2000, 45: 1462-1464.
262. **Vanderhoof JA, Young RJ, Murray N, Kaufman SS.:** Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998, 27:155-60.
263. **Venturi A., Gionchetti P., Rizzello F., Johansson R., Zucconi E., Brigidi P., Matteuzzi D., Campieri M. :** Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1999 , 13: 1103-1108.
264. **Schultz M., Sartor R.B. :** Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 2000, 95: S19-S21.
265. **Sakamoto I., Igarashi M., Kimura K., Tagari A., Miwa T., Koga Y. :** Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716(LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47 (5): 709-710.
266. **Greenwald P. C.K. Clifford , J.A. Milner:** Diet and cancer prevention. *Eur. J. Cancer* 2001, 37: 948-965.
267. **Benno Y., T. Mitsuoka, Kanazawa :** Human faecal flora in health and colon cancer. *Acta. Chirur. Scand.* 1991, 521: 15-23.
268. **Hirayama K. and J. Rafter :** The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2000, 2: 681-686.
269. **Lankaputhra, W.E., Shah, N.P. :** Antimutagenic properties of probiotic bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. clin. Nutr.* 1999, 73 (6): 1124S-1130S.
270. **Pool – Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, et al.:** *Lactobacillus* – and *Bifidobacterium* – mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* 1996, 26:365-80.
271. **Rowland I.R.:** Cut microflora and cancer. In: Leeds R.A., Rowland I.R., eds. *Gut flora and health-past, present and future.* International Congress and Symposium Series no. 219. London: Royal Society of Medicine Press Ltd, 1996: 19-25.
272. **Goldin B.R., Gorbach S.L.:** The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J. Clin. Nutr* 1984, 33: 15-8.
273. **Ling WH, Hanningen O, Mykkanen H, Heikura M, Salminen S, Von Wright A. :** Colonization and fecal enzyme activities after oral *Lactobacillus GG*. Administration in elderly nursing home residents. *Ann Nutr Met* 1992, 36:162-6.

274. **Link-Amster H., Rochat F., Saudan K.Y. et al:** Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1994, 10: 55-63
275. **Fearon ER, Vogelstein B.:** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61:759-67.
276. **Marteau P, Pochart P, Flourie B, et al.:** Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic microflora. *Am J Clin Nutr* 1990, 52:685-8.
277. **Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G.:** The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998, 52:1-9.
278. **Bouhnik Y, Flourie B, Andreux C, Bisetti N, Briet F, Rambaud J-C.:** Effects of *Bifidobacterium sp* fermented milk ingested with or without inulin on colonic *bifidobacteria* and enzymatic activities in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 1996, 50:269-73.
279. **Orrhage K, Sillestrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J.:** Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and acid bacteria. *Mutat Res* 1994, 311:239- 48.
280. **Korpela R. :** Role of tye fibre and *Lactobacillus GG* in colonic metabolism. PhD thesis. Kuopio University, Finland. 1995.
281. **Lidbeck A, Nord CE, Rafter J, Nord C, Gustaffson J-A.:** Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. *Microbial Ecol Health Dis* 1992, 5:59-67.
282. **Nishioka, K., Miyamoto, T., Kataoka, K., Nakae, T.:** Preliminary studies on antimutagenic activities of lactic acid bacteria. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 1989, 60: 491-4.
283. **Bodana A.R.R, Rao D.R.:** Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, 1990, 73: 3379-84.
284. **Aso Y, Akazan H, BLP Study Group:** Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Int* 1992, 49:125- 9.
285. **Aso Y, Akazan H, Kotake t, Tsukamoto T, Imai K, BLP.:** Study Group. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double – blind trial. *Eur Urol* 1995, 27:104-9.
286. **Hosono A., Kitazawa H., Yamaguchi T.:** Antimutagenic and antitumour activities of lactic acid bacteria, In Fuller R. (ed): *Probiotics 2: Applications and practical aspects* by Chapman & Hall 1997: 87-132.
287. **Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP.:** The effect of *Lactobacillus GG* on the initiation and promotion of DMH – induced intestinal tumors in the rat, *nutr Cancer* 1996, 25:197-204.
288. **Rafter JJ.:** The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol* 1995, 30:497-502.
289. **De Simone C., Tzantzoglou S., Baldinelli L. et al.:** Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1988, 10: 399-408.

290. **De Simone C., Vesely R., Bianchi Salvadori B., Jirillo E.:** The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. *Int. J. Immunother.*, 1993 9:23-8.
291. **De Simone, C., Bianchi Salvadori B., Negri R. et al:** The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Reports Int.* 1986, 3: 419-31.
292. **Famularo G., Morettis S., Marcelli S., De Simone C.:** Stimulation of immunity by probiotics, In Fuller R. (ed): *Probiotics 2: Applications and practical aspects* by Chapman & Hall 1997: 133-161.
293. **Kirjavainen P.V., Einezami, H.S., Salminen S.J., Ahokas J.T., Wright P.F.:** Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999, 6: 799-802.
294. **Kirjavainen P.V., Gibson G.R.:** Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microflora. *Ann. Med.* 1999, 31: 288-292.
295. **Tejada-Simon, M.V., Pestka, J.J. :** Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 1999, 62: 1435-1444.
296. **Yasui H., Shida, K., Matsuzaki, T., Yokokura, T.:** Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999., 76: 383-389.
297. **Neumann, E., Oliveira, M.A. Cabral, C.A., Moura, L.N., Nicoli, J.R., Viera, E.C., Cara, D.C., Podoprighora, G.I., Viera, L.Q.:** Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz. J. med. Boil. Res.* 1998, 31: 1565-1573.
298. **Kato I., Endo-Tanaka K., Yokokura T.:** Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 MICE. *LIFE Sci.* 1998, 63: 635-644.
299. **Pessi T., Sutas Y., Saxelin M., Kallioinen H., Isolauri E.:** Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 , 65: 4725-4728.
300. **Fukushima Y., Kawata Y., Mizumachi K., Kurisaki J., Mitsuoka T.:** Effect of *bifidobacteria* feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 46: 193-197.
301. **Guarino A.:** effects of probiotics in children with cystic fibrosis. *Gastroenterol Int* 1998, 11(suppl):91.
302. **Ribeiro H, Vanderhoof JA.:** Reduction of diarrheal illness following administration of *Lactobacillus plantarum* 299v in a daycare facility. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998, 26:561.
303. **Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth M.A.:** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999, 276:G941-50.
304. **Jung LK.:** *Lactobacillus GG* augments the immune response to typhoid vaccination: a double-blinded, placebo-controlled study. *FASEB J* 1999, 13:A872 (abstr).
305. **Whelan K., Gibson GR., Judd PA., Taylor MA.:** The role of probiotics and prebiotics in the management of diarrhoea associated with enteral tube feeding. *J. Hum Nutr Diet* 2001: 14(6) 423-33.

306. **Guandalini S.:** The treatment of acute diarrhea in the third millennium: a pediatrician's perspective. *Acta Gastroenterol Belg* 2002, 65: 33-36.=
307. **Eizaguirre I., Urkia NG., Asensio AB., Zubillaga I., Zubillaga P., Vidales C., Garsia – Arenzana JM., Albazabal P.:** Probiotic supplementation reduces the risk bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J. Pediatr Surg* 2002, 37(5): 699-702.
308. **Reid G., Burton J.:** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 2002, 4: 319-324.
309. **Kalliomaki M., Salminen S., Arvilammi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E.:** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001, 357: 1076-1079.
310. **Petti S., G. Tarsitani and Simoneti D' Area :** A randomized clinical trial of the effect of yogurt on the human salivary microflora. *Arch. Oral Biol.* 2001, 46: 705-712.
311. **Redondo – Lopez V., R.L. Cook, J.D. Sobel:** Emerging role of *lactobacilli* in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* 1990, 12: 856-872.
312. **Reid G., A.W. Bruce, N. Fraser, C. Heinemann, J. Owen, B. Henning:** Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001, 30: 49-52.
313. **Asahara T., K. Nomoto, M. Watanuki, T. Yokokura:** Antimicrobial activity of intraurethally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2001, 45:1751-60.
314. **Ogawa M., K. Shimizu, K. Nomoto, M. Takahashi, M. Watanuki, R. Tanaka, T. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki, Y. Takeda :** Protective effect of *Lactobacillus casei* strain *shirota* on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infecti. Immun.* 2001, 69: 1101-8.
315. **De Waard , R. J. Garssen, G.C.A.M. Bokken and J.G. Vos :** Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. *Int. j. Food Microbiol.* 2002, 73: 93-100.
316. **Ztaliou I., Tsakalidou E., Tzanetakis N., Kalantzopoulos G.:** *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Greek screening for enzyme activities. *Lait*, 1996, 76: 209-216.
317. **Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Manolkidis K.:** Microbiology of kopanisti a traditional Greek cheese. *Food Microbiology*, 1987, 4: 251-256.
318. **Hammes W.P., Bantleon A., Min S.:** Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 87: 165-173.
319. **Tannock G.W., Munro K., Harmsen H.J.M., Welling G.W., Smart J., Gobal P.K.:** Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2578-2588.
320. **Bezirtzoglou E.:** The intestinal microflora during the first weeks of life. *Aerobe*. 1997, 3: 173-77.
321. **Bezirtzoglou E., Romond C.:** Occurrence of *Lactobacillus sp.* In newborns delivered by cesarian section. *Reviews Med. Microbiol.* 1997, 8(1): 101-4.

322. **Mantis A.:** In: Kyriakidis (ed) Milk and dairy products hygiene and technology (Greek language), University of Thessaloniki Publishing Co, Thessaloniki, Athens, Greece, 1991.
323. **Κούπαρη Γ., Ζαφειροπούλου Α., Τσιρέπα Μ., Ξένος Ν., Τζανετάκος Κ., Δεληγιάννη Β:** Κλινικοεργαστηριακή μελέτη γαστρεντερίτιδας από σαλμονέλλες σε παιδιά. Εφαρμοσμένη κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική, 1995, 10(3):195-206.
324. **Lambiri M., Marridou A., Richardson S.C., Papadakis I.A.:** Isolations of salmonellas from animals, foods, feeds and the environment during 1985-1990. Acta Microbiologica Hellenica, 1995, 40: 297-302.
325. **Καραμπαξόγλου Δ., Παπά Α., Κανσουζίδου Α., Τριανταφύλλου Γ., Μήτκα Σ., Αμιν Α., Δανηλίδης Β:** Σαλμονέλλες στα κοτόπουλα που καταναλώνονται στα νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης. Δελτίο Ελλην. Μικροβιολογικής Εταιρείας 1996, 41(3): 230-233.
326. **Βατσος Ε., Σαμπατάκου Ο., Αναστασιάδου Ε:** Ορότυποι σαλμονελλών που απομονώθηκαν σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης στην Ελλάδα από 1987-1994: Δελτίο Ελλην. Κτην. Εταιρείας, 1996, 47(2):104-110.
327. **Facklam R.R.:** Comparison of several laboratory media for presumptive identification of *enterococci* and group D *streptococci*. Appl Microbiol. 1973, 26: 138-45.
328. **Facklam R.R.:** *Streptococci* and *aerococci*. In: Lennette EH, Balows A., Hausler JR. WJ., Truant JP(ed), Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed, ASM, Washington DC, 1980.
329. **Manero, A. Blanch A.R.:** Identification of *Enterococcus sp.* with a biochemical key. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 4425-4430.
330. **Garcia-Garrote F., Cercenado E., Bonza E.:** Evaluation of a new system VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of *enterococci*. J Clin Microbiol 2000, 38: 2108-211.
331. **Eisner A., Gorkiewicz G., Feierl G., Leither E., Kofer J., Kessler H.H., Marth E.:** Identification of Glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infections Disease, 2005, 53: 17-21.
332. **Arici M., Bilgin B., Sagdic O., Ozdenur C.:** Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant feces. Food Microbiol, 2004, 21: 19-24.
333. **Lee B.H., Simard R.E.:** Evaluation of methods for detecting the production of H₂S, volatile sulphides and greening by *Lactobacillus*. J. Food Sci., 1984, 49: 881-983.
334. **Conway P. L. Gorbach S.L., Coldin B.R.:** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science 1987, 70: 1-12.
335. **Klaenhammer T.R:** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 1993, 12: 39-86.
336. **Teply M.:** Ciste mlekarske culture. Phara. SNTL Nakladatelstvi. Technicke Literaty. In Startes for fermented milks, IDF Bulletin (J.A. Kurmann), 1989, 227: 41-55.
337. **Brennam M., Wanismail B., Johnson M.C., Ray B:** Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Prot, 1986, 49: 47-53.
338. **Bauer A. W., Kirby W.M.M., Sheris J.C., Tuck M.:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1996, 45: 493-496.

339. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.:** Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 4th ed. Approved standard. NCCLS publication no. M11-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1997.
340. **Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.:** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food Prot. 1998, 61: 1636-43.
341. **Stokes E.J., Ridgway G.L., Wren M.W.D.:** Laboratory control of antimicrobial chemotherapy. In: Stokes E.J., Ridgway G.L., Wren M.W.D.(Eds) Clinical Microbiology, 7th edition Edward Arnold Boston, 1993: 234-280.
342. **Hindler J.A., Howard B.J., Keiser J.F.:** Antimicrobial agents and antimicrobial susceptibility testing. In: Howard B.J. (Ed) clinical and Pathogenic Microbiology, 2nd Edition, Mosby Washington, DC, 1994: 145-195.
343. **Arthur M., Cournalin P.:** Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrobial Agents and chemotherapy 1993, 37: 1563-1571.
344. **Fleming H.P., Etchells J.L., Costillow R.L.:** Microbiol inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Appl. Microbiol, 1985, 30: 1040-1042.
345. **De Vugst L., Vandamme E.J.:** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications. London: Blackie Academic and Professional, 1994, ISBN 0-75140174-9.
346. **Bezirtzoglou E.:** Contribution a l etude de l implantation de la flore fecale anaerobie du nouveeau-ne mis au monde cesarienne. Doctorat no 13, Paris-Sud, 1985.
347. **Kawai Y., Watanabe T., Suegara N., Mutai M.:** Distribution and colonization of human fecal *Streptococci*. Am J Clin Nutr 1980, 33: 2458-61.
348. **Bezirtzoglou E., Maipa V., Voidarou C., Tsiotsias A., Papapetropoulou M.:** Food-borne intestinal bacterial pathogens, MEHD, 2000, S2: 96-104.
349. **Ozawa K., Yabu-Uchi K., Yamanaka K., Yamashita Y., Nomura S., Oku I.:** Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. Appl Environ Microbiol. 1983, 45(5): 1513-18.
350. **Bosley G.S., Facklam R.R., Grossman D.:** Rapid identification of *Enterococci*. J Clin Microbiol. 1983, 18(5): 1275-77.
351. **Giraffa G.:** Functionally of enterococci in dairy products. Int J Food Microbiol. 2003, 88: 215-22.
352. **Hosono A., Sagae S., Tokita F.:** Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp her. Milchwissenschaft, 1986, 41: 142-5.
353. **Bosley G.S., Facklam R.R., Grossman D.:** Rapid identification of *Enterococci*. J Clin Microbiol. 1983, 18(5): 1275-77.
354. **Bezirtzoglou E., Romond C.:** Bacterial flora of the gastric fluid in newborns delivered by cesarian section. In: Clinical and molecular aspects of anaerobs, ED.SP. Borriello, Wrightson Biamedical Publishing LTD, Peterfied, U.K., 1989.
355. **Borriello P., Hudson M, Hill M:** Investigation of the gastrointestinal bacterial flora. Clin Gastroenterol 1978, 7: 329-49.
356. **Xanthopoulos V., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetajkis N.:** Food Microbiol 2000,17: 205-215.
357. **Σμοκοβίτης Α.:** Φυσιολογία, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1990: 707-708.

358. **Gordon E.R., Coresky C.A., Chan TH, Perlin AS.:** The isolation and characterization of bilirubin diglucuronide, the major bilirubin conjugate in dog and human bile. *Biochem J.* 1976, 155: 477-81.
359. **Midtvedt T., Guastafsson B.E.:** Microbial conversion of bilirubin to urobilins in vitro and in vivo. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B].* 1981, 89:57-80.
360. **Saxerholt H.:** Intestinal bilirubin metabolism. In: PhD Thesis Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 1990.
361. **Hawksworth G., Drasar B.S., Hill M.J.:** Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycolytic bonds. *J Med Microbiol.* 1971, 4(4): 451-59.
362. **Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C.:** Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:377-81.
363. **Suscovic J., Brkic B., Matosic S. Maric V.:** *Lactobacillus acidophilus* M 92 aw potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*, 1997, 52: 430-435.
364. **Bottazzi V., Battistitti B., Bosi F., Corradini C., Dellaqua E.:** Effect du lozozyme sur les ferments lactiques thermophiles. XX International Dairy Congress, Paris, 1978, 3:535-36.
365. **Kurmann J.A.:** Une nonvella generation de cultures au industrie laitiere: aspects mocrbiologiques, biotechnologiques et probiotiques de cultures debacteries composees de souches selectionnees d' origine intestinal umane. *Lait*, 1993, 73: 233.
366. **Yokokura T, Mutai M.:** Penicillin resistance and its elimination by treatment with acriflavine in *Lactobacillus fermenti*. *Jpn J Microbiol*, 1976, 20(3): 241-2.
367. **Sarra P.G., Morelli L., Bottazzi V:** The lactic microflora of fowl. In Wood BJB, (editor). *The Lactic Acid Bacteria*. vol. 1, *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier, New York, 1982: 3-19.
368. **Nicas T.I., Cole CT., Preston DA., Schabel A.A., Nagarajan R.:** Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant Gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989, 33: 1477-1481.
369. **Johnson A.P., Uttley AHC., Woodford N., George RC.:** Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 1990, 3: 280-291.
370. **Woodford N., Johnson A.P., Morrison D., Speller D.C.E.:** Current perspective on glycopeptide resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, 8: 585-615.
371. **Ruoff K.L., Kuritzkes D.R., wolfson J.S., Ferraro M.J.:** Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26: 2064-2068.
372. **Swenson J.M., Facklam R.R., Thornsberry C.:** Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34: 543-549.
373. **Handwerker S., Pucci M.J., Volk K.J., Liu J.P., Lee M.S.:** Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176: 260-264.
374. **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.:** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41: 103-105.

375. **Leclercq R., Derlot E.:** Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. New England Journal of Medicine, 1988, 21: 157-161.
376. **Quintiliani Jr.R., Evers S., Courvalin P.:** The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. Journal of Infections Diseases, 1993, 167: 1220-1223.
377. **Mattilla- Sandholt T., Matto J., Saarela M:** Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal microflora. Int Dairy, 1999, 9: 25-35.
378. **Florez AB., Delgado S., Mayo B:** Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Can. J. Microbiol, 2005, 51: 51-58.
379. **Giraffa G., Olivari AM., Neviani E.:** Isolation of vancomycin – resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. Food Microbiology, 2000, 17: 671-677.
380. **Sumru C., Nihal Y., Sati O.:** Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. International Journal of Dairy Technology, 2004, 57: 27.
381. **Cosentino S., Pisano MB., Corda A., Fadda ME., Piras C.:** Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Journal of Dairy Research, 2004, 71: 444-450.
382. **Huys G., Haene K.D., Collard JM., Swings J.:** Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* isolates from Food. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 1555-1562.
383. **Jacobsen C.N., Nielsen R., Hayford A.E., Moller P.L., Michaelsen K.F., Paerregaard A., Sandstrom B., Tvede M., Jacobsen M.:** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus sp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4949-956.
384. **Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B., Tsakalidou E.P.:** Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Int Dairy J. 2006, 16: 189-99.
385. **Sgouras D., Maragkoydakis P.A., Petraki K., Martinez-Gongalez B., Eviotou E., Michopoulos S., Mentis A.:** In vitro and in vivo inhibition of Helibacter pylori by *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. Appl Environ Microbiol. 2004, 70: 518-26.
386. **Sholeva Z., Stefaniva S., Chipeva V.:** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian *Lactobacillus strains*. J Culture Collections. 1997, 2: 15-20.
387. **Foster J.W. Hall H.K.:** Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 1991, 173: 6896-902.
388. **Tagg J.R., Mc Given A.R.:** Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 1971, 21: 943.
389. **Helander I.M., Von Wright A. Mattila-Sandholm T.M.:** Trends in Food Science and Technology, 1997, 8.
390. **Fooks L.J., Gibson G.R.:** In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 67-75.