

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑ: «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ»

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΟΥ DODINE ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ LACTOBACILLUS
PLANTARUM, LACTOBACILLUS PARACASEI ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΖΥΜΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ L. PARACASEI.**



ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΖΗΓΡΑ

Αγρο-οικολόγος

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΣ ΑΛΜΠΙΑΝΗΣ

ΠΡΥΤΑΝΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιωάννινα 2010



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ

Το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα (ΕΠ) αποτελεί τον κεντρικό πυλώνα της πολιτικής της Ελλάδας για την ανάπτυξη από το 2007 έως το 2013. Η Ελλάδα με το ΕΠ 2007-2013 είναι η πρώτη χώρα στην Ευρώπη που υιοθετεί έναν ολοκληρωμένο ΕΠ.

Το ΕΠ υλοποιείται στην Ελλάδα από το 2007 με τη βοήθεια της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (ΕΕ) και της Ευρωπαϊκής Τράπεζας (ΕΤ) και της Ευρωπαϊκής Κεντρικής Τράπεζας (ΕΚΤ).

Κατά τη διάρκεια της υλοποίησης του ΕΠ 2007-2013, η Ελλάδα έχει υλοποιήσει σημαντικές επενδύσεις στην ανάπτυξη της οικονομίας της. στη μνήμη της Επικούρης Καθηγήτριας Βασιλικής Μάιρα Στογιάννη.

Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας.

Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας.

Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας.

Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας. Η υλοποίηση του ΕΠ 2007-2013 είναι μια σημαντική στιγμή στην ιστορία της Ελλάδας.



Ευχαριστίες

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η συνέχιση και τελική ολοκλήρωση έγινε στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το αντικείμενο της έρευνας μου ανέθεσε η αείμνηστη Επίκουρη Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής Βασιλική Μάιπα σε συνεργασία με τον κ. Ιωάννη Ιωαννίδη, Διευθυντή Τομέα ΚΙΨΥ και Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Ιωάννη Αλαμάνο, Επίκουρο Καθηγητή του Παν/μιου Ιωαννίνων.

Ευγνωμονώ την αείμνηστη καθηγήτριά μου Βασιλική Μάιπα για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία και οργάνωση της μελέτης μου, την ακούραστη παρακολούθησή της, τις υποδείξεις, τις συμβουλές της, την συμπαράστασή της και την συνεχή καθοδήγησή της στην συγγραφή αυτής της μελέτης.

Θερμά ευχαριστώ και ευγνωμοσύνη εκφράζω επίσης στον Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθηγητή της Χημείας και υπεύθυνο καθηγητή μου κ. κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη για την προτροπή, ενθάρρυνση και οργάνωση στην συνέχιση και ολοκλήρωση της ερευνάς μου καθώς και για την πολύτιμη εμπειρία που αποκόμισα από την συνεργασία του.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή, Δ/ντη του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής, κ. Ιωάννη Ιωαννίδη καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Αλαμάνο για την βοήθειά τους στα αρχικά στάδια της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτωρ του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Αλεξάνδρα Κουτσοτόλη, τον Λέκτορα της Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Ανδρέα Τζάκο καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Δήμητρα Δήμου και Δημήτρη Βάσσο για την πολύτιμη, αμέριστη και ακούραστη βοήθειά τους στην εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ιστορία των προβιοτικών (probiotics) δεν είναι καινούργια. Ξεκινάει από πολύ παλιά από την εποχή που ο πρωτόγονος ακόμη άνθρωπος «έπηξε» το γάλα χρησιμοποιώντας γιαούρτη της προηγούμενης ημέρας και έφτιαχνε τυρί με «πυτιά» χωρίς βέβαια να γνωρίζει ότι τελικά βακτήρια είναι αυτά που συμμετέχουν στην πήξη του γάλακτος και την μετατροπή του σε ζυμούμενα προϊόντα.

Τον 19 αιώνα ξεκινάει η έρευνα πάνω στο θέμα της μικροβιολογίας τροφίμων. Ο Γάλλος βιοχημικός Pasteur σε δημοσιευμένη ερευνά του, που έφερε πραγματική επανάσταση, αποδείκνυε ότι καλλιέργειες βακτηρίων είναι αυτές που οδηγούν στις ζυμώσεις των διαφόρων τροφίμων. (Annual Record of Science and Industry, Louis Pasteur 2010, Louis Pasteur 2009)

Από τότε μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές και αξιόλογες μελέτες και έχει συγκεντρωθεί αρκετή γνώση για την σημασία των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Merenstein DJ et al, 2010, Giraffa G et al, 2010), τον τρόπο που δρουν στις ζυμώσεις των τροφίμων (Schmidt RJ and Kung LJr, 2010) και τις επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. (Gratz SW et al, 2010, Weichselbaum E.,2010, De Vrese M., 2009, Gill H and Prasad J, 2008).

Η σημερινή τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιεί μια πλειάδα μικροοργανισμών στα λειτουργικά της τρόφιμα, όπως τα προβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης γάλακτος, το κρασί, οι χυμοί, το τουρσί κ.α. λόγω της ιδιαιτερότητας τους να συμβάλλουν στην γαλακτική και αλκοολική ζύμωση αντίστοιχα και να παράγουν προϊόντα ζύμωσης.

Την τελευταία δεκαετία ολοένα και πληθαίνουν οι έρευνες που αφορούν τα προβιοτικά όπου συνεχώς διαπιστώνεται η ευεργετική τους δράση στην ανθρώπινη υγεία και ευεξία (Kumar M et al, 2010, Stamatova I and Meurman JH , 2009, Snelling AM., 2005) καθώς και η αντιμικροβιακή τους δράση σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Ohland CL and Macnaughton WK, 2010, Vassos D et al, 2009), εφοδιάζοντας την διεθνή βιβλιογραφία με αξιόπιστα δεδομένα και ενισχύοντας την άποψη πολλών που τα θεωρούν ακόμη και σαν ασπίδα πρόληψης πολλών ασθενειών.

Οι έρευνες που έγιναν και εξακολουθούν να γίνονται μελετούν τα προβιοτικά με δύο τρόπους:



- ❖ Με μελέτη της επίδρασης των προβιοτικών των ζυμούμενων τροφίμων στον ανθρώπινο οργανισμό με εργασίες και in vitro μελέτες (Jankovic I et al, 2010, Ohashi Y, 2009, Dong H et al, 2010)
- ❖ Και με κλινικές δοκιμές, συστηματικές έρευνες και μετα-αναλύσεις σε ανθρώπους με διάφορες παθήσεις χορηγώντας τους προβιοτικά είτε σαν σκευάσματα είτε σαν παράγωγα γάλακτος π.χ. γιαούρτη(Kale-Pradhan PB, 2010, Hoveyda N, 2009, Eren M, 2010, Lionetti E, 2010).

Από την πληθώρα των δημοσιεύσεων και ερευνών προκύπτουν πολλά συμπεράσματα για την ευεργετική δράση των προβιοτικών σε πολλές ασθένειες (διάρροια των ταξιδιωτών, παιδική διάρροια, μείωση χοληστερίνης, σωστή εντερική λειτουργία, κ.α) ενώ δεν είναι και λίγες εκείνες που μέχρι στιγμής δεν αποδεικνύουν βελτίωση με χορήγηση προβιοτικών όπως είναι η ελκώδη κολίτιδα και η ασθένεια Crohn (Zigra et al, 2007, Mallon PT et al , 2007).

Το σίγουρο είναι ότι παρά την πληθώρα ερευνών το θέμα της αποτελεσματικότητας των προβιοτικών και της αξιοποίησής τους προς όφελος του ανθρώπου, έχει ακόμη τεράστιο πεδίο έρευνας. Επίσης μη ξεχνάμε ότι στην πραγματικότητα η αποτελεσματικότητα ενός προβιοτικού επηρεάζεται από παράγοντες που στο εργαστήριο δεν λαμβάνονται υπόψιν όπως ο μικροβιακός ανταγωνισμός με άλλους μικροοργανισμούς, καθώς και συστατικά των τροφίμων που μπορεί να παίζουν ανασχετικό ή βελτιωτικό παράγοντα στην ανάπτυξη και δράση τους. Τι γίνεται όταν π.χ. το γάλα ή το κρασί περιέχει υπολείμματα φυτοφαρμάκων; Μπορούν να επηρεάσουν την δράση των προβιοτικών και να δώσουν λανθασμένα συμπεράσματα σε εργαστηριακές έρευνες;

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στο:

να αποδείξει με πειραματικό τρόπο αν τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη, ζύμωση και αντιμικροβιακή δράση των προβιοτικών. Στην παρούσα μελέτη των λακτοβακίλλων *Lactobacillus para. paracasei* και *Lactobacillus plantarum* που χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα σαν προβιοτικά με ευεργετικές ιδιότητες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1. ΠΕΡΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	9
1.1. Προβιοτικά- εισαγωγή	9
1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	11
1.2.1. Γένος <i>Lactobacillus sp.</i> (λακτοβάκιλλοι)	12
1.2.2. Γένος <i>Streptococcus sp.</i>	14
1.2.3. Γένος <i>Enterococcus sp.</i>	15
1.2.4. Γένος <i>Pediococcus sp.</i>	17
1.2.5. Γένος <i>Lactococcus sp.</i>	18
1.2.6. Γένος <i>Leuconostoc sp.</i>	20
1.2.7. Γένος <i>Bifidobacterium sp.</i>	22
1.2.8. Γένος <i>Aerococcus sp.</i> και <i>Tetragenococcus sp.</i>	24
1.2.9. Γένος <i>Micrococcus sp.</i>	24
1.2.10. Γένος <i>Carnobacterium sp.</i>	25
1.2.11. Γένος <i>Vagococcus sp.</i>	25
1.2.12. Γένος <i>Brevidobacterium sp.</i>	25
1.2.13. Γένος <i>Propionibacterium sp.</i>	26
1.2.14. ΖΥΜΕΣ (ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ).....	26
1.2.14.1. <i>Saccharomyces boulardii</i>	27
1.2.14.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
1.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	28
1.3.1. <i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	28
1.3.1.1. Τρόφιμα που βρίσκεται.....	28
1.3.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
1.3.2.1. Τρόφιμα που βρίσκεται.....	30
1.3.2.2. Θεραπευτικές- αντιμικροβιακές ιδιότητες	30
1.4. ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ	31
1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	32



1.6. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΩΦΕΛΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ.....	33
1.7. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.....	35
1.8. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΤΟΥ ΜΕΛΛΟΝΤΟΣ	36
2. ΠΕΡΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	38
2.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	38
2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ.....	39
2.3. Η ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	40
2.4. ΜΕΓΙΣΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΑ ΟΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ-MRLs.....	44
2.5. ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ.....	45
2.6. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟΥ	49
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	54
3.1.1. Επιλογή των προβιοτικών.....	54
3.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	54
3.1.3. Χημικά αντιδραστήρια.....	54
3.1.4. Λοιπά υλικά.....	55
3.1.5. Επιλογή του μυκητοκτόνου.....	55
3.1.6. Επιλογή των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου.....	55
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	56
4.1. «Καθαρισμός» των λακτοβακίλλων.....	56
4.2. «Σταντάρισμα» των λακτοβακίλλων.....	56
4.3. Ετοιμασία των αραιώσεων του μυκητοκτόνου.....	57
4.4. Βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη.....	58
4.5. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων λακτοβακίλλων..	58
4.6. Προσδιορισμός παραγωγής οξέος και πρόκλησης ζύμωσης.....	59
4.7. Στατιστική επεξεργασία.....	60
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60



5.1. Πίνακες ανάπτυξης λακτοβακίλλων	60
5.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	63
5.3. ΖΥΜΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ <i>L. PARACASEI</i>	64
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
6.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	67
6.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	71
6.3. ΖΥΜΩΣΗ.....	73
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	76
8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	77
9. SUMMARY	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78
ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	113

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΕΡΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

1.1 Προβιοτικά- εισαγωγή

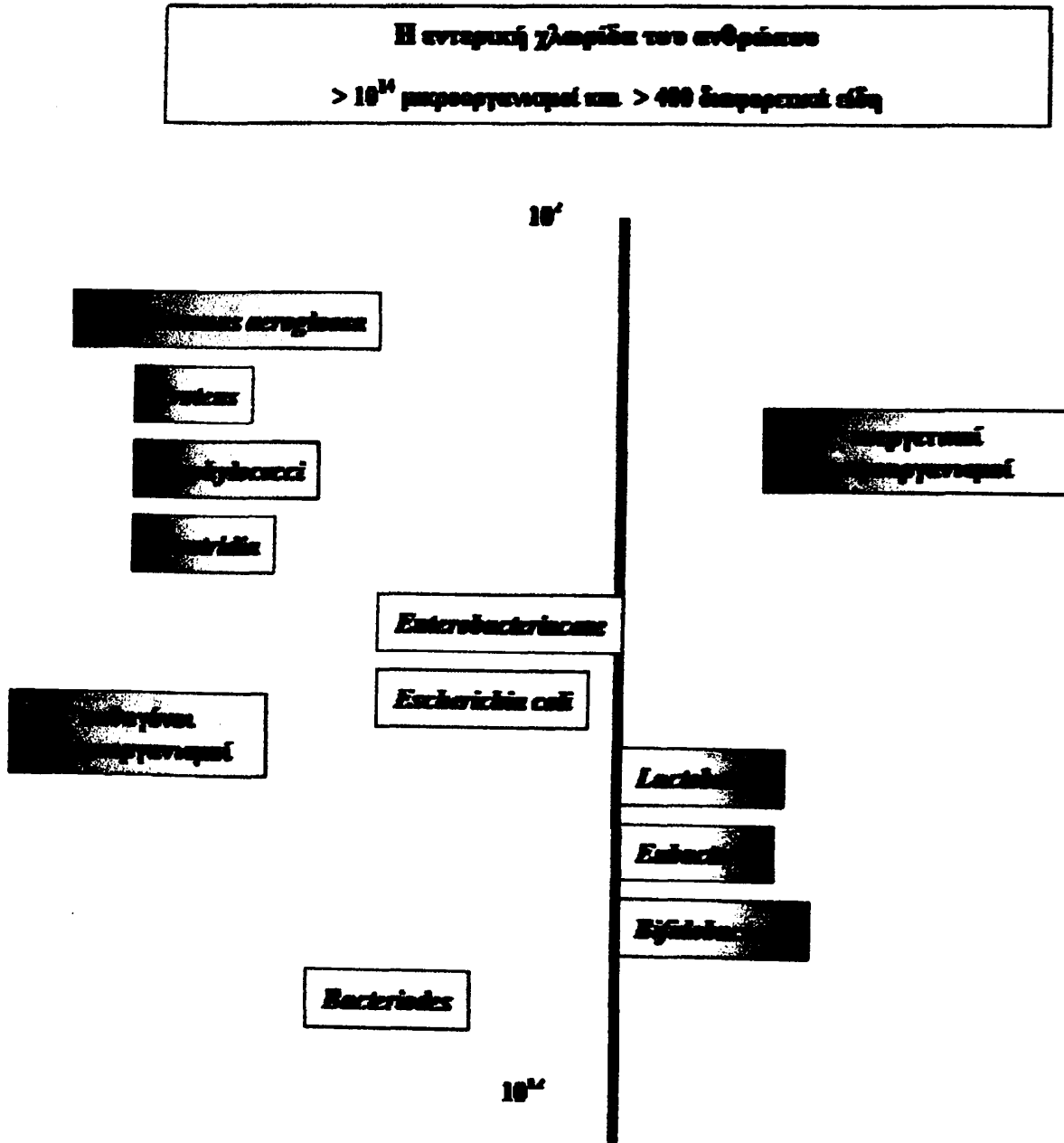
Η λέξη probiotic είναι σύνθετη από τη λέξη pro που σημαίνει για και τη λέξη biotic που σημαίνει βιοτικός-βίωτος-ζωή. Δηλαδή προβιοτικά=για τη ζωή (Fuller R., 1993, Lee Y-K et al, 1995.). Η λέξη προβιοτικός ειπώθηκε για πρώτη φορά το 1965 όπου σε αυτό αναφέρεται οποιοδήποτε συστατικό ή οργανισμός το οποίο συνεισφέρει στην διατήρηση της εντερικής χλωρίδας. Αργότερα άρχισε να αναφέρεται σε ζωντανό μικροοργανισμό τροφής περισσότερο παρά συστατικό και έγινε πιο σχετικό με τους ανθρώπους για να φτάσουμε στον ακόλουθο ορισμό για τα προβιοτικά: «Τα προβιοτικά βακτήρια είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε αρκετή ποσότητα, ασκούν υγιεινά οφέλη πέρα από την βασική τροφή» (Fuller R., 1989). Το πιο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι παράγουν γαλακτικό οξύ σαν κυρίαρχο τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους. 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. Ούτε καθορίζει κάποιο συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων που πρέπει να καταναλώνονται ημερησίως, αλλά γενικά είναι αποδεκτό ότι πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον 10^9 κύτταρα την ημέρα προκειμένου να έχουμε ευεργετικά αποτελέσματα. Στην περίπτωση των προβιοτικών προϊόντων τα βακτήρια επιλέγονται κυρίως με βάση την ικανότητά τους να παρουσιάζουν ιδιότητες που αφορούν την υγεία του οργανισμού αλλά και να έχουν και τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των LAB (Svensson U., 1999, Salminen S. et al, 1999). Τέλος, τα όποια ευεργετικά αποτελέσματα πρέπει να τεκμηριώνονται με καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Σταδιακά η γνώση πάνω στα προβιοτικά αλλάζει καθώς νέες μελέτες δείχνουν ότι ακόμη και νεκροί προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν αξιοσημείωτες επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Με αυτή την έννοια, ήδη πρέπει να αρχίσουμε να μιλάμε για τα προβιοτικά του μέλλοντος (Lee et al. 1999; Salminen et al. 1999).

Επίσης, οι προβιοτικοί οργανισμοί αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας. Ρόλος τους είναι να βελτιώνουν την εντερική ισορροπία βοηθώντας την



μικροχλωρίδα να δρα σαν αποτελεσματική άμυνα σε ανθρώπινες και ζωικές μολύνσεις (Startor RB, 2004, Williams NT., 2010.). Η ισορροπία αυτής της χλωρίδας επιτυγχάνεται με τις ανασταλτικές δράσεις των προβιοτικών στα παθογόνα μικρόβια που αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα. (εικόνα 1) (Εφη Τσακαλίδου).

Εικόνα 1:



1. 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα προβιοτικά δεν είναι μια με απόλυτη ευκρίνεια ταξινομημένη ομάδα ιδιαίτερα αυτά που ανήκουν στην κατηγορία των lactic acid bacteria (LAB) καθώς είναι μια μεγάλη ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει γένη βακτηρίων με διάφορα χαρακτηριστικά. Τα γένη των προβιοτικών σύμφωνα με τον Bergey (Bergey's manual) περιλαμβάνουν τα εξής βακτήρια (πίνακας 1):

Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. GG</i> <i>L. casei subsp. paracasei</i> <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. brevis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. phamnosus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. reuterri</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. crispatus</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus sp.</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Lactococcus sp.</i>	<i>L. lactis subsp. cremoris</i> <i>L. lactis subsp. lactis</i> <i>L. lactis subsp. diacetylactis</i>
<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>L. mesenteroides subsp. dextranicus</i> <i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. infantis</i>
<i>Propionibacterium sp.</i>	<i>P. freudenreichii</i>

Ζύμες	<i>P. shermanii</i> <i>S. boulardii</i> <i>S. cerevisiae</i>
Άλλοι μικροοργανισμοί	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium butyricium</i>

Τα πιο σημαντικά προβιοτικά περιγράφονται παρακάτω:

1.2.1. Γένος *Lactobacillus* sp. (λακτοβάκιλλοι)

Οι λακτοβάκιλλοι είναι ένα γένος από gram θετικά facultative αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια. Ονομάζονται έτσι επειδή πολλά από τα μέλη τους διασπούν την λακτόζη και άλλα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ. Τα κύτταρα των λακτοβακίλλων είναι μακρά και λεπτά με εμφανείς σχηματισμένες αλυσίδες (εικόνα).



Η θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 2-53°C με καλύτερη θερμοκρασία μεταξύ 30 και 40 °C(wikipedia).

Η τελευταία κατάταξη του Bergey (Bergey's manual) αναγνώρισε 44 είδη και 8 αμφισβητούμενα καθώς και αρκετά υποείδη. Από τον τρόπο διάσπασης των υδατανθράκων τα στελέχη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- ◆ Είδη υποχρεωτικά ομοζυγωτικά: δέκα πέντε (15)
- ◆ Είδη υποχρεωτικά ετεροζυμοτικά: δέκα οχτώ (18)
- ◆ Είδη προαιρετικά ετεροζυμοτικά: έντεκα(11).

Οι πιο βασικές από τις ιδιότητές τους είναι η μη ρευστοποίηση της ζελατίνης, η μη αναγωγή των νιτρικών αλάτων και ο μη σχηματισμός ινδόλης και υδρόθειου. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα οξέα και αναπτύσσονται σε όξινο pH (5,0 ή και λιγότερο). Σε pH ουδέτερο ή αλκαλικό παρατηρείται μια εμφανής μείωση της

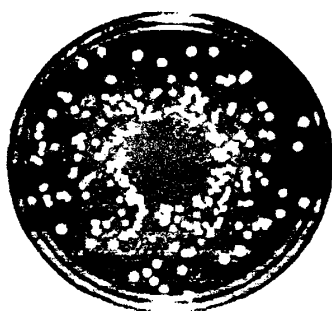
ανάπτυξής τους. Σήμερα πάνω από 80 είδη και υποείδη έχουν αναγνωρισθεί και ταξινομηθεί και καινούργια συνεχώς προσθέτονται (wikipedia).

Αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της μικροχλωρίδας ανθρώπων και ζώων (γαστρεντερικός σωλήνας, κόλπος, στόμα) (Μπαλατσούρας Γ., 2006).

Είδη λακτοβακίλλων ανιχνεύτηκαν σε γάλα και προϊόντα ζύμωσης γάλακτος, ζυμούμενα προϊόντα μαγιάς (μπύρα), κρασί, ζυμούμενα φυτικά προϊόντα, χυμούς φρούτων, νερό, κρέας, ψάρια και παράγωγά τους, απόβλητα, κόπρανα ζώων και ανθρώπων (Axelsson L., 1998).

Τα είδη που έχουν ιδιαίτερη σημασία στην μικροβιολογία και τεχνολογία τροφίμων είναι τα εξής:

↳ *L.casei*



Βακτήριο σε σχήμα ράβδου, gram θετικό και αναερόβιο. Δεν δημιουργεί σπόρους και τα κύτταρά του σχηματίζουν αλυσίδες(εικόνα). Μεσόφιλα υποείδη με θερμοκρασία ζύμωσης 15°C και χαμηλότερη. Το ιδανικό τους pH είναι 5,5. Σε σχέση με τα άλλα είδη λακτοβακίλλων το *L. Casei* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 45°C (εκτός από το *L.casei* subsp. *Rhamnosus*). Στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες. Ο *L. casei* υπάρχει στο έντερο ζώων και στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα.(wikipedia). Έρευνες έδειξαν να έχει ωφέλιμες ιδιότητες στην ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας (Lye HS.,2010, Baldwin C, 2010, de Vrese M, 2008). Μπορεί να βελτιώσει και να προωθήσει την πέψη (Shida K, 2009). Μερικά είδη του βακτηρίου βοηθούν στον έλεγχο της διάρροιας (Hickson M, 2007), ενώ άλλα έχουν μια αντι-φλεγμονώδη δράση στο έντερο (Fang HW, 2010). Άλλες ωφέλειες περιλαμβάνουν την μείωση της δυσανεξίας της λακτόζης (Gaόn D, 1995). Τα πιο γνωστά υποείδη του είναι:

↳ *L. Casei* subsp. *casei*

- ☞ *L.casei* subsp. *ramnosus*
- ☞ *L.casei* subps. *tolerans*
- ☞ *L.casei* subps. *pseudoplantarum*.

☞ *L. acidophilus*: Είναι ομο-ζυμωτικό είδος, ζυμώνοντας ζάχαρη σε



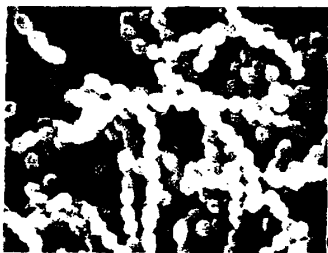
γαλακτικό οξύ.

Το ιδανικό του pH είναι κάτω από 5 και η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 30 °C. Βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων, στο στόμα και το σάλιο (wikipedia). Μερικά είδη του *L. acidophilus* θεωρούνται ότι έχουν προβιοτικά χαρακτηριστικά (Macouzet M, 2010). Τα είδη αυτά χρησιμοποιούνται σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα, μερικές φορές μαζί με τους *S. salivarius ssp. thermophilus* και τον *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* για την παραγωγή *acidophilus* τύπου γιαουρτιού (Zhu Y, 2010). Μερικά στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες.

1.2..2.. Γένος *Streptococcus* sp.

Οι στρεπτόκοκκοι έχουν σχήμα σφαιρικό ή ωσειδές που σχηματίζουν αλυσίδες ή ζεύγη. Η καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι στους 37°C. Η ταξινόμησή τους είναι πολύπλοκη και μη ολοκληρωμένη. Βρίσκονται στα φυτά, στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στους βλεννογόνους ανθρώπων και ζώων (wikipedia). Σήμερα έχουν ταξινομηθεί και αναγνωριστεί πάνω από 50 είδη και υποείδη στρεπτόκοκκων. Η τελευταία ταξινόμηση του Bergey (Bergey's manual) αναγνώρισε άλλα 37 είδη στρεπτόκοκκων με άλλα 10 με αβέβαιη ακόμη κατάταξη. Το είδος με ιδιαίτερη σημασία στην μικροβιολογία και τεχνολογία τροφίμων είναι το εξής:

↳ *S. salivarius subsp. thermophilus*: (κοινό όνομα *Streptococcus thermophilus*)

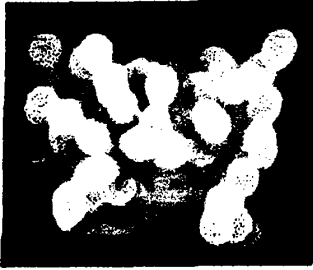


Gram θετικό, facultative αναερόβιο βακτήριο. Συναντάται σε ζεύγη ή σχηματισμένες αλυσίδες. Είναι ένα κυτόχρωμα-οξειδάση και καταλάση θετικός οργανισμός, δεν σχηματίζει σπόρια και θερμοφίλος. Αναπτύσσεται στους 20-52 °C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 37°C (wikipedia). Ταξινομείται σαν LAB (lactic acid bacterium) και βρίσκεται σε πληθώρα στα προϊόντα ζύμωσης γάλακτος (Broadbent JR et al, 2003). Βακτήριο πολύ ευαίσθητο στο αλάτι καθώς δεν μπορεί να αναπτυχθεί ούτε σε συγκέντρωση 2%. Υπάρχουν αμφιβολίες για την τοποθέτησή του σαν προβιοτικό (δεν επιβιώνει στο στομάχι των υγιή ανθρώπων) ενώ χρησιμοποιείται ευρέως σαν starter (καλλιέργεια εκκίνησης) στην παραγωγή γιαούρτης και τυριών (Low D et al, 1998, Broadbent JR et al, 2003).

1.2.3. Γένος *Enterococcus* sp.

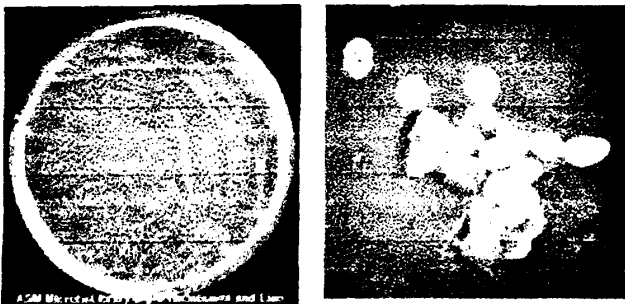
Οι εντερόκοκκοι έχουν σφαιρικό σχήμα ή ωσειδές. Μέλη αυτού του γένους είχαν ταξινομηθεί σαν Group D yeast μέχρι το 1984 όπου η ανάλυση DNA έδειξε ότι ήταν απαραίτητη μια χωριστή κατάταξή τους. Είναι gram θετικοί κόκκοι και είναι δύσκολο από τα φυσικά χαρακτηριστικά τους μόνο να διαφοροποιηθούν από τους στρεπτόκοκκους (wikipedia). Οι εντερόκοκκοι παίζουν σημαντικό ρόλο γιατί υπάρχουν στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων (Kiliç GB, 2010) με μερικά στελέχη να παρουσιάζουν προβιοτικές ιδιότητες όπως αντιμικροβιακή δράση κ.α. (Gu RX et al, 2008) . Οι εντερόκοκκοι με ιδιαίτερη σημασία για την τεχνολογία τροφίμων είναι:

↳ *E. faecium*:



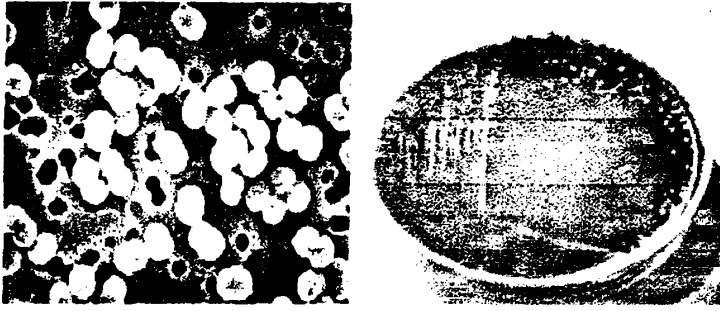
Ο *Enterococcus faecium* ανήκει στην ομάδα των group D, gram θετικών βακτηρίων του γένους *Enterococcus*. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 10- 45°C με καλύτερη αυτή των 37°C (wikipedia). Χρησιμοποιείται σαν «εκκινητής» (starter) στην παραγωγή προϊόντων ζύμωσης γάλακτος παρόλο που τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αμφισβητήσεις ως προς την καταλληλότητά του (Vassos D et al, 2009).

↳ *E. faecalis*:



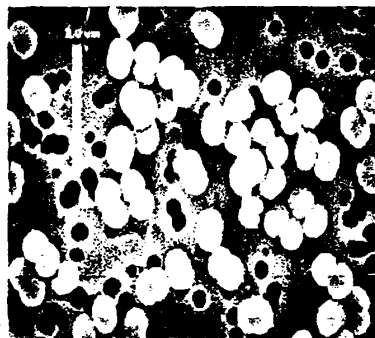
Ο *Enterococcus faecalis* – ταξινομείται σαν μέλος των group D στρεπτοκόκκων. Gram θετικό βακτήριο που βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων (wikipedia). Κάτω από κατάλληλες συνθήκες ο *E. faecalis* και ο *E. faecium* μπορεί να μετατραπούν σε ευκαιριακά παθογόνα (Sava IG, 2010). Η θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι από 10 έως 45°C. Όπως και ο *enterococcus faecium* χρησιμοποιείται σαν starter με αρκετές επιφυλάξεις για την χρησιμοποίησή του στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Vassos D et al, 2009).

1.2.4. Γένος *Pediococcus* sp.



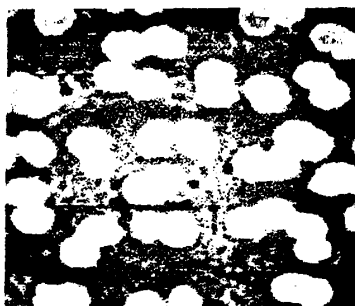
Οι πεδιόκοκκοι ανήκουν στα gram θετικά βακτήρια και ταξινομούνται στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Αναπτύσσονται σε ζευγάρια ή τετράδες (wikipedia). Υπάρχουν σε αφθονία στα ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος καθώς και προϊόντα ζύμωσης ψαριών και κρέατος (Vassos D et al, 2009). Παράγουν βακτηριοσίνες (wikipedia). Υπάρχουν 7 γνωστά είδη πεδιόκοκκων (Bergey's manual). Τα πιο σημαντικά για την Τεχνολογία τροφίμων είναι:

- ↳ *Pediococcus dextrinicus*: Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι η 30-35°C. Μία πρόσφατη έρευνα προτείνει τον *Pediococcus dextrinicus* στην κατηγορία του γένους των λακτοβακίλλων με το όνομα *Lactobacillus dextrinicus* και όχι στο γένος των πεδιόκοκκων (Haakensen M et al, 2009). Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες για την σωστή κατάταξη του είδους.



- ↳ *Pediococcus pentasaceus*:

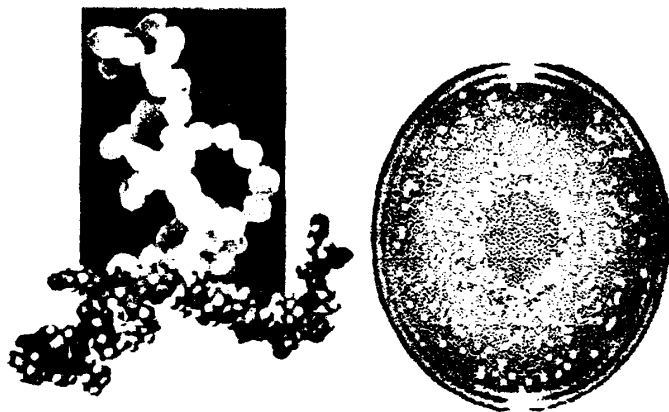
Ο *Pediococcus pentasaceus* ανήκει στα βιομηχανικά σημαντικά βακτήρια (Jonganurakkun B. et al, 2008). Μορφολογικά σχηματίζει τετράδες. Αναπτύσσεται άριστα στους 40°C (wikipedia). Παράγει βακτηριοσίνες (Shin MS et al, 2008). Βρίσκεται σε ποικιλία τυριών και φυτικών προϊόντων. Χρησιμοποιείται σαν starter στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών (Βάσσος Δημήτριος, Διδακτορική Διατριβή, 2009).



↳ *Pediococcus acidilactici*:

Ο *Pediococcus acidilactici* βρίσκεται στα τρόφιμα, στα φυτά, στις μύρες. Παράγει γαλακτικό οξύ. Τεχνολογικά χρησιμοποιείται για την παρασκευή ζυμούμενων λαχανικών, ζυμών και μπίρας (wikipedia). Υπάρχει στο ανθρώπινο έντερο σαν προβιοτικό όπου βοηθάει στην διατήρηση της ισορροπίας της μικροχλωρίδας στο εντερικό σύστημα και την αποτροπή εντερικών παθογόνων αποικιών (Millette M et al, 2008).

1.2.5. Γένος *Lactococcus* sp.

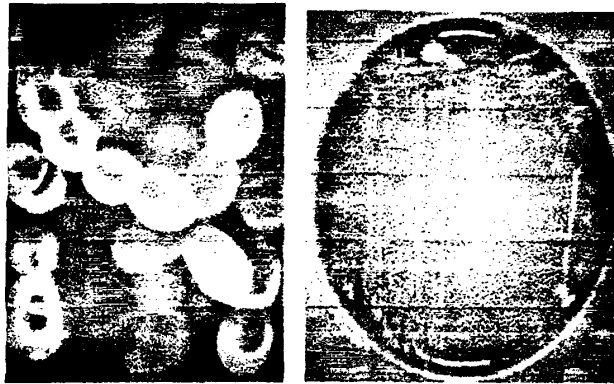


Οι λακτόκοκκοι είναι ένα γένος LAB που περιλαμβάνονται στο γένος των στρεπτοκόκκων Group N1. Αρκετά στελέχη παράγουν βακτηριοσίνες. Είναι κόκκοι gram θετικοί, καταλάση θετικοί που αναπτύσσονται σε ζεύγη, μόνα ή σε αλυσίδες. Το είδος περιέχει στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 10-45°C. Οι λακτόκοκκοι είναι οι πιο κοινοί starters που χρησιμοποιούνται μόνοι ή με άλλα LAB όπως οι λακτοβάκιλλοι και οι στρεπτόκοκκοι στην παρασκευή πολλών ειδών τυριών (wikipedia). Πέντε είδη και τρία υποείδη αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν (Bergey's manual). Αυτά είναι:

- ↳ *L. lactis*
- ↳ *L. lactis subsp. lactis*
- ↳ *L. lactis subsp. cremoris*

- ↳ *L. lactis subsp. hordniae*
- ↳ *L. garvieae*
- ↳ *L. plantarum*
- ↳ *L. raffinolactis*
- ↳ *L. piscium*

Η τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιεί τα παρακάτω είδη:



↳ *Lc. Lactis* :

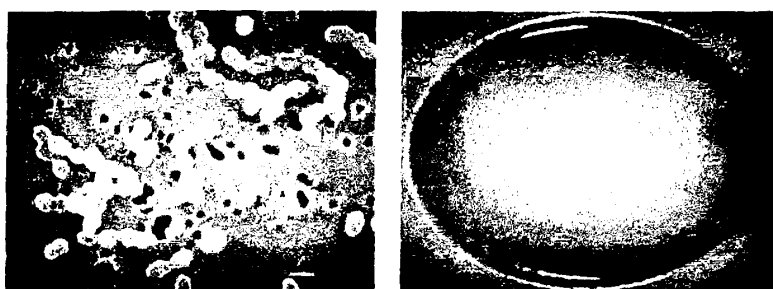
Ασπορογόνο, Gram θετικό βακτήριο (κόκκος) που αναπτύσσεται σε ζευγάρια ή μικρές αλυσίδες. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 10- 40°C με άριστη τους 30°C (wikipedia). Παράγει την βακτηριοσίνη νισίνη (νισίνη A: εννιά στελέχη και νισίνη Z: δύο στελέχη) για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Alegria A et al, 2010). Ο *Lc. lactis* είναι ένα βακτήριο με μεγάλη σημασία στην παρασκευή προϊόντων όπως το buttermilk και τα τυριά. Χρησιμοποιείται επίσης και σε άλλες παρασκευές όπως την παραγωγή pickled λαχανικών, μπύρας ή κρασιού καθώς και μερικών ειδών ψωμιού. Τα στελέχη αυτά ευθύνονται και για την οξεία οξίνιση του γάλακτος (Βάσσος Δ., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα 2009). Η βακτηριοσίνη νισίνη που παράγουν μερικά στελέχη του παρεμποδίζει την ανάπτυξη της *Listeria* στο τυρί (Reviriego C et al, 2007). Εκτός από τον *Lc. lactis* η Τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιεί και ορισμένα υποείδη αυτού τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

- ↳ *Lc. lactis subsp. lactis*: Μελέτες απέδειξαν ότι μερικά στελέχη του υποείδους αυτού (*Lactococcus lactis subsp. lactis* TFF 221, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 2111) παράγουν βακτηριοσίνες που είναι χρήσιμες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων (Rattanachaiakunsorn P. and Phumkhachorn P., 2008,) και συμβάλλουν στην αναχαίτιση μερικών

παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα τρόφιμα όπως *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus* (Noonpakdee W et al, 2003).

- ↳ *Lc. lactis subsp. diacetylactis*: Εμπλουτισμός γάλακτος με *Lc. lactis subsp. diacetylactis* έδειξε την μέγιστη αναχαίτιση ανάπτυξης της παθογόνου *E. coli* 3339 και της *Salmonella enteritis* σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς (Mufandaedza J et al, 2006).
- ↳ *Lc. lactis subsp. cremoris*: Χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. (M S Salama et al, 1993).

1.2.6. Γένος *Leuconostoc* sp.



Οι λευκόνοστοι είναι gram θετικά βακτήρια (κόκκοι) που αναπτύσσονται σε αλυσίδες ή ζεύγη. Όλα τα είδη είναι αρνητικά στην καταλάση, χαρακτηριστικό που τα διαχωρίζει από τους σταφυλόκοκκους. Βρίσκονται και αναπτύσσονται με μορφή βλέννας σε ζυμώμενα φυτικά και ζωικά προϊόντα (ελιές, τουρσί, γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα) καθώς και επίφυτα σε φρούτα και λαχανικά (wikipedia).

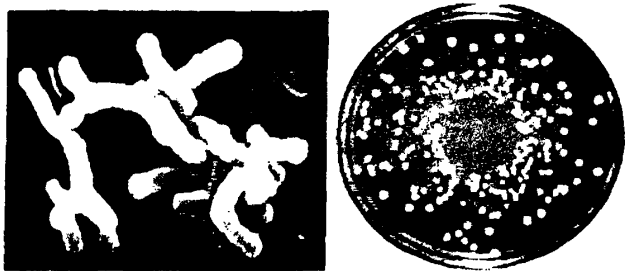
Στην τεχνολογία γαλακτοκομικών δύο είδη παίζουν σημαντικό ρόλο οι *Lc. lactis* και *Lc. mesenteroides* καθώς παράγουν διακετύλιο που βελτιώνει την γεύση του βουτύρου και της κρέμας και CO₂ στο οποίο προέρχονται οι χαρακτηριστικές οπές στα τυροκομικά προϊόντα (Βάσσος Δημήτριος, Διδακτορική Διατριβή, 2009). Σήμερα έχουν αναγνωριστεί και τυποποιηθεί τέσσερα είδη:

- ↳ *Leuconostoc oenos*: Προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Η θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 10-35°C με άριστη αυτή των 20°C (wikipedia). Μία καινούργια έρευνα προτείνει την μετονομασία του *leuconostoc oenos* σε *oenococcus oeni* και τον διαχωρίζει από τα άλλα είδη των *leuconostoc spp.* (Dicks LM, 1995). Έχει μεγάλο ενδιαφέρον στην

τεχνολογία τροφίμων καθώς χρησιμοποιείται σαν starter στην αλκοολική ζύμωση και την παραγωγή κρασιού (Mills DA et al, 2005, Lonvaud-Funel A. , 1999).

- ↪ *Leuconostoc mesenteroides*: Η θερμοκρασία ανάπτυξης του κυμαίνεται από 10-37°C με άριστη τους 25°C (wikipedia). Αποτελείται από διάφορα υποείδη τα οποία είναι:
- ↪ *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*: Απομονώθηκε από ένα είδος τυριού (Artisanal Italian goat cheese) και μαζί με τον *Leuconostoc cremonis* συμμετέχει στην διαδικασία ζύμωσης (Colombo E et al, 2010).
- ↪ *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*: Έχει απομονωθεί και συμμετέχει στην διαδικασία ζύμωσης μερικών ειδών τυριών (π.χ. Artisanal Italian goat cheese) (Colombo E et al, 2010).
- ↪ *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*: Παράγει μια βακτηριοσίνη την μεσεντερισίνη (*Mesentericin ST99*) που αναχαιτίζει την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, μερικών ειδών *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus thermophilus* (Todorov SD and Dicks LM., 2004)
- ↪ *Leuconostoc paramesenteroides*: Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης παρατηρείται στους 18-24°C (wikipedia).
- ↪ *Leuconostoc lactis*: Βακτήριο με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Εμφανίζει το υψηλότερο επίπεδο κασεολυτικής δραστηριότητας στην παραγωγή του τυριού (González L et al, 2010)

1.2.7. Γένος *Bifidobacterium* sp.

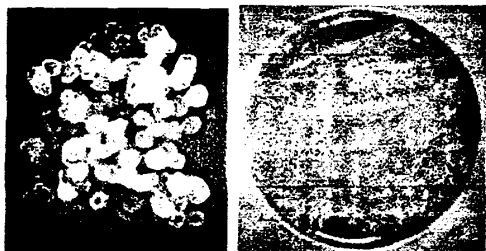


Τα bifidoβακτήρια εντάσσονται στα αναερόβια βακτήρια πράγμα το οποίο κάνει πολύ δύσκολη την απομόνωσή τους. Από την ζύμωση των σακχάρων παράγουν γαλακτικό και οξικό οξύ (Βασσος Δ., Διδακτορική Διατριβή, 2009). Gram θετικά βακτήρια που κατοικούν στο εντερικό σύστημα (Palframan RJ et al, 2003, Duez H et al, 2000) και το σάλιο (Beighton D et al, 2008). Ο πεπτικός σωλήνας των βρεφών κατά τη διάρκεια του θηλασμού (Vassos D et al, 2009) και των ενηλίκων ανθρώπων και ζώων είναι ο κύριος ξενιστής τους (Duez H et al, 2000). Τα bifidoβακτήρια βοηθούν στην πέψη (Zhong Y et al, 2006, de Vrese M et al, 2001, Chen RM et al, 1999) καθώς και στην αποτροπή ανάπτυξης μερικών όγκων (Cronin M et al, 2010). Μερικά από αυτά χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικά (Hong KS et al, 2009, Brenner DM and Chey WD, 2009, Whorwell PJ et al, 2006). Πριν το 1965 τα είδη των bifidoβακτηριδίων αναφέρονταν σαν «*lactobacillus bifidus*» (Macquiddy El Sr., 1964, Miller LG and Finegold SM., 1967). Σήμερα αναγνωρίστηκαν και ταξινομήθηκαν πάνω από 32 είδη και υποείδη (Βάσσος Δ., Διδακτορική διατριβή, 2009). Αυτά που είναι χρήσιμα στην τεχνολογία γαλακτοκομικών και χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι:

↳ *Bif. Animalis*- *Bif. Lactis*: Βρίσκεται στο μεγάλο έντερο των περισσότερων θηλαστικών και του ανθρώπου (Duez H et al, 2000). Το *Bifidobacterium animalis* και το *Bifidobacterium lactis* αρχικά περιγράφηκαν σαν δύο διαφορετικά είδη. Πρόσφατα, και τα δύο θεωρούνται *B. animalis* με τα υποείδη *Bifidobacterium animalis* subsp *animalis* και *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*. (Βασσος Δ., Διδακτορική Διατριβή, 2009). Χρησιμοποιείται στην παρασκευή μερικών εναλλακτικών προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων (Kongo JM et al, 2006)

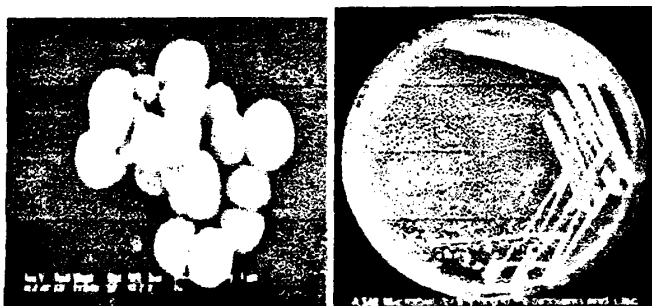
- ↳ *Bif.breve*: Είναι προβιοτικό του γιαουρτιού. Παρουσιάζει την μεγαλύτερη επιβίωση σε όλα τα επίπεδα κατεργασίας στο γιαούρτη σε σχέση με τα άλλα προβιοτικά. (Rosburg V, 2010).
- ↳ *Bif. bifidum*: Είναι γνωστό σαν ένα είδος καλού βακτηρίου που ζει στο ανθρώπινο σώμα, συγκεκριμένα στο γαστρεντερικό σύστημα (Turroni F et al, 2009, Ventura M, et al, 2004). Το *Bifidobacterium bifidum* παίζει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες όπως η υγιής «χώνεψη» (Marteau P et al, 2002, Chen RM et al, 1999) και στην ανάσχεση παθογόνων βακτηρίων (Chen RM et al, 1999).
- ↳ *Bif. infantis*: Βρίσκεται στο μεγάλο έντερο νηπίων (Sela DA, et al, 2008, Gueimonde M et al, 2007) και ενηλίκων (Turroni F et al, 2009). Όπως άλλα *Bifido*βακτήρια, μπορεί να αναχαιτίσει την αποίκιση του κόλου από συγκεκριμένα είδη βλαβερών βακτηρίων (O'Hara AM et al, 2006). Μελέτες απέδειξαν ότι παρουσία *Bif. infantis* στο κόλον βοηθάει στην μείωση περιστατικών διαφόρων ειδών διάρροιας (Williams MD et al, 2010, Vivatvakin B and Kowitdamrong E., 2006, Lee MC et al. 2001).
- ↳ *Bif.longum*: Απομονωμένο το 1977, το είδος *Bifidobacterium longum* BB536 είναι το πιο ευρέως μελετημένο όσο αφορά τις ιδιότητές του και τα οφέλη στην υγεία. Αρκετές μελέτες, μιλάνε για τον ρόλο του στη εντερικό περιβάλλον (Turroni F et al, 2008, He T et al, 2008, Zhong Y et al, 2006, Ventura M, et al, 2004) και στην διατήρηση ενός υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος (López P et al, 2010, Medina M et al, 2007)
- ↳ *Bif. adolescentis*: Μελέτες δείχνουν την επίδραση του *bif. adolescentis* στην αποτροπή του καρκίνου του κόλου (Lee do K et al, 2008, Kim Y et al, 2008)

1.2.8. Γένος *Aerococcus* sp. και *Tetragenococcus* sp.



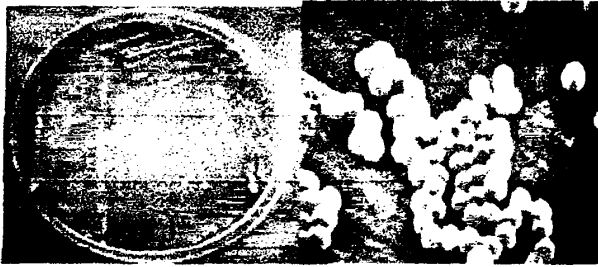
Κόκκοι που αναπτύσσονται σε τετράδες. Η ταξινόμησή τους συνεχώς αλλάζει καθώς όλο και περισσότερα στοιχεία και ιδιότητές τους γίνονται γνωστές με αποτέλεσμα την δυσκολία τοποθέτησής τους σε συγκεκριμένη ομάδα (Vela AI et al, 2007). Μορφολογικά μοιάζουν με τους πεδιόκοκκους ενώ φυσιολογικά με τους εντερόκοκκους. Μπορούν να θεωρηθούν ως LAB (wikipedia).

1.2.9. Γένος *Micrococcus* sp.



Ανήκουν στα αυστηρώς αερόβια βακτήρια και αναπτύσσονται σε τετράδες (Dastager SG et al, 2010). Στο περιβάλλον υπάρχει σε αφθονία σε διάφορα είδη όπως στο νερό (Máthé I et al, 2010), στο έδαφος (Dastager SG et al, 2010, Tallur PN et al, 2008), στα απόβλητα (Oyetibo GO et al, 2010), γάλα (Callon C et al, 2007) και γαλακτοκομικά προϊόντα (Mounier J et al, 2005), παρασκευάσματα κρέατος (Hinrichsen LL et al, 1994) ακόμη και στο δέρμα των ανθρώπων (Chiller K et al, 2001).

1.2.10. Γένος *Carnobacterium* sp.



Βάκιλοι με ανάπτυξη σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες ή μεμονωμένα. Έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί 8 είδη (*C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. viridans*) (Cailliez-Grimal C et al, 2005) μερικά από τα οποία παράγουν βακτηριοσίνες (Jasniewski J et al, 2009⁽¹⁾, Jasniewski J et al, 2009⁽²⁾). Βρίσκονται σε μαλακά τυριά (Cailliez-Grimal C et al, 2005), κατεργασμένο κρέας (Schirmer BC et al, 2009), γαστρεντερικό σωλήνα ψαριών (Alves VF et al, 2005) ακόμη και ανθρώπινο αίμα (Hoenigl M et al, 2010).

1.2.11. Γένος *Vagococcus* sp.

Σφαιρικά κύτταρα που αναπτύσσονται μόνα τους, σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες (wikipedia). Βρίσκονται στα νερά (Gao J, et al, 2006, Collins MD et al, 1989) καθώς και σε κόπρανα πουλερικών (Collins MD et al, 1989) και ψαριών (Wallbanks S et al, 1990).

1.2.12. Γένος *Brevibacterium* sp.



Είναι gram θετικοί μικροοργανισμοί. Αυστηρά αναερόβια βακτήρια. Το γένος *Brevibacterium* είναι δύσκολο να ταξινομηθεί λόγω της μορφολογικής ιδιότητάς του με τα άλλα είδη (Onraedt A et al, 2005). Βρίσκονται σε μερικά είδη τυριών (Rea MC et al, 2007, Mounier J et al, 2005).

1.2.13. Γένος *Propionibacterium* sp.



Τα βακτήρια αυτά πήραν το όνομά τους από την ικανότητά τους να παράγουν προπιονικό οξύ. Δεν ανήκουν στα LAB καθώς δεν παράγουν γαλακτικό οξύ αλλά συμμετέχουν σαν ενισχυτικά των starters καθώς μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ των LAB προς προπιονικό οξύ, οξεϊκό οξύ και CO₂ (Βάσσος Δ., Διδακτορική Διατριβή, 2009). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των γαλακτοκομικών (Van der Merwe IR et al, 2004, Barefoot SF and Nettles CG, 1993). Από τα 11 είδη που αναγνωρίστηκαν μέχρι σήμερα μερικά παράγουν βακτηριοσίνες (Van der Merwe IR, 2004, Barefoot SF and Nettles CG, 1993).

1.2.14. ΖΥΜΕΣ (ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ)

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκυττάριοι οργανισμοί. Ανήκουν στο γένος των μυκήτων. Μακροσκοπικά σχηματίζουν λείες αποικίες, που μοιάζουν με αυτές των βακτηρίων. Οι μύκητες θα μπορούσαν να διακριθούν σε φίλιους και εχθρικούς. Οι φίλιοι μύκητες παράγουν αντιβιοτικά, ένζυμα και παρασιτοκτόνα, βοηθούν στο καθαρισμό των θαλάσσιων υδάτων από το πετρέλαιο και συμμετέχουν στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, την παραγωγή σοκολάτας, στα ποτά τύπου Cola. Οι εχθρικοί μύκητες συμβάλλουν στην καταστροφή του δομικού υλικού και προκαλούν αλλεργίες, δερματοπάθειες και πνευμονοπάθειες, όπως η νόσος των κτιρίων (Αριστέα Βελεγράκη).

1.2.14.1. *Saccharomyces boulardii*



Ταξινομείται στις μη παθογόνες ζύμες (Katz JA., 2006). Η *Saccharomyces boulardii* έχει ευρέως μελετηθεί για τα προβιοτικά οφέλη της (McFarland LV, 2010, Vandenplas Y et al, 2009, Czerucka D et al, 2007). Βρίσκεται σε πληθώρα προβιοτικών προϊόντων (Vanhee LM et al, 2010). Αρκετοί ερευνητές μελέτησαν τον ρόλο της στην θεραπεία και αποτροπή διαφόρων τύπων διάρροιας (McFarland LV, 2006, Katz JA. 2006, Johnston BC et al, 2006) και άλλων ασθενειών όπως η ασθένεια Crohn (Guslandi M et al, 2000) και η Ελκώδης Κολίτιδα (Guslandi M et al, 2003)

1.2.14.2. *Saccharomyces cerevisiae*



Ταξινομείται στις ωφέλιμες ζύμες. Από την αρχαιότητα θεωρείται η πιο σημαντική ζύμη όσον αφορά την ζύμωση του κριθαριού και την παραγωγή μπίρας (Lodolo EJ et al, 2008). Εκτός από την μπίρα βρίσκεται και στο κρασί (Santamaría P et al, 2005) όπου συμμετέχει μαζί με άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς στην αλκοολική ζύμωση (Blanco P et al, 2010, Querol A, et al, 1993).

1.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΗΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

1.3.1. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*



Ο *Lactobacillus paracasei* ανήκει στα είδη των υγιών βακτηρίων (Verdenelli MC et al, 2009). Ονομάζεται ακόμη χλωρίδα ή προβιοτικό. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη υγιών βακτηρίων που βοηθούν στην βελτίωση της υγείας του εντέρου παλεύοντας με τα παθογόνα βακτήρια που εισέρχονται στο σώμα. Στην ουσία αυτά τα βακτήρια είναι «βοηθοί» του εντέρου (Ljungh A and Wadström T., 2006, Servin AL and Coconnier MH., 2003). Όταν ένα άτομο καταναλώνει αντιβιοτικά, όλα τα βακτήρια, ωφέλιμα και μη, θανατώνονται πράγμα το οποίο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα όπως ανάπτυξη μυκήτων στο σώμα. Τα «καλά» βακτήρια βοηθούν το σώμα διατηρώντας τόσο την υγεία του εντέρου όσο και την βελτίωση της ανοσοποιητικής λειτουργίας (Cribby S et al, 2008, Lombardo L.,2008). Ο *L. paracasei* αποδείχθηκε ότι έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες σε μερικά είδη παθογόνων σαλμονελλών όπως η *salmonella typhimurium*, *salmonella tiphi*, *salmonella entetiridis* και *salmonella ancona* (Βασσος Δ., Διδακτορική διατριβή) και σε άλλα παθογόνα μικρόβια (Hütt P et al, 2006).

Αρκετά από τα στελέχη του γένους *L. casei* ταξινομήθηκαν τα τελευταία χρόνια ως *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Κοινό χαρακτηριστικό των ομάδων *L. casei* και *L. paracasei* subsp *paracasei* είναι ότι αναπτύσσονται στους 10 και πολύ μικρή ανάπτυξη στους 45°C (Βάσσος Δ., Διδακτορική διατριβή,2009). Μερικά στελέχη του παράγουν βακτηριοσίνες (Chen J et al, 2009, Pangsomboon K et al, 2009, Lozo J,et al, 2007).

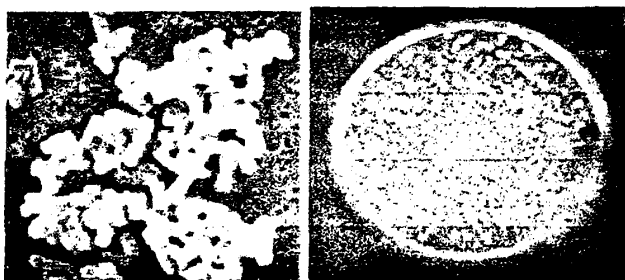
Σε επίπεδο υγείας έγιναν πολυάριθμες μελέτες για την δράση του *Lactobacillus paracasei* σε αρκετές ασθένειες όπως διάρροιες (Grossi E et al, 2010, Andriulli A et al, 2008, McFarland LV.,2006), ασθένειες του εντερικού συστήματος (Simrén M et al, 2010, Andriulli A,et al, 2008, Peluso I,et al, 2007), διαβήτη (Doi A, et al, 2010, Teanpaisan R et al, 2009,),καρκίνους (Fotiadis CI et al, 2008, Geier MS et al, 2006, Saikali J,et al 2004, Biffi A et al, 1997).



1.3.1.1. Τρόφιμα που βρίσκεται

Ο *Lactobacillus paracasei* βρίσκεται σε πληθώρα στα προϊόντα ζύμωσης γάλακτος (Samelis J, et al, 2010, González L et al, 2010, Uchida K et al, 2009) και φυσικά γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το τυρί από ωμό γάλα (Colombo F et al, 2009, Roznanski E, et al, 2004). Οι ωφέλειες αυτών των τροφίμων στην υγεία του ανθρώπου είναι γνωστές και έχουν αναφερθεί λεπτομερώς στην παρούσα εργασία. Βρίσκεται σε μικρά ποσοστά στο παστεριωμένο γάλα, γιατί η διαδικασία παστερίωσης καταστρέφει όλα τα καλά και βλαβερά βακτήρια σε σχέση με τα άλλα συστατικά (Jordan KN and Cogan TM., 1999). Καλλιεργείται και αναπτύσσεται στο υλικό MRS.

1.3.2. *Lactobacillus plantarum*



Είναι ένα ευρύ είδος του γένους *Lactobacillus*. Όπως και ο *L. paracasei* έτσι και ο *L. plantarum* υπάρχει στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου καθώς έχει απομονωθεί από κόπρανα ανθρώπων (Bixquert Jiménez M., 2009, Maukonen J, et al, 2008). Υπάρχει ακόμη στο σάλιο (από το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά) (Maukonen J, et al, 2008). Gram θετικό, αερόβιο βακτήριο που αναπτύσσεται στους 15 όχι όμως στους 45 °C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-35 °C (wikipedia). Παράγει βακτηριοσίνες (Diep DB et al, 2009, Allende A et al, 2007) τις οποίες ερευνητές προτείνουν σαν φυσικό συντηρητικό για την διατήρηση των τροφίμων (Allende A et al, 2007, Olasupo NA., 1996). Από τους πιο ευρέως μελετημένους λακτοβάκιλλους, τόσο για τις προβιοτικές του ιδιότητες (Del Piano M et al, 2010, Oudhuis GJ, et al, 2010, Borthakur A, et al, 2010), όσο και για την δράση του σε συγκεκριμένες ασθένειες όπως το irritable bowel syndrome (φλεγμονώδη νόσο του εντέρου) (Bixquert Jiménez M., 2009, Saggiaro A., 2004), καρκίνους (Paolillo R et al, 2009, O'Keefe SJ et al, 2009, Ko JS et al, 2007,), διάφορους τύπους διάρροιας (Lönnemark E et al, 2010, Szymański H et al, 2008, Wullt M et al,

2007). Ο *Lactobacillus plantarum*, όπως και άλλα είδη λακτοβακίλλων καλλιεργείται και αναπτύσσεται στο υλικό MRS.

1.3.2.1. Τρόφιμα που βρίσκεται

Βρίσκεται σε αφθονία σε πολλά ζυμούμενα προϊόντα φυτικής προέλευσης (Molin G, 2001,) προϊόντα ζύμωσης ψαριών (Saithong P et al,2010) καθώς και σε μερικά τυριά (Samelis J et al, 2010, Pereira CI et al, 2010).

1.3.2.2. Θεραπευτικές- αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η ικανότητα του *L. plantarum* να παράγει αντιμικροβιακά συστατικά και η επιβίωσή τους στον γαστρο-εντερικό σωλήνα το οδήγησαν στην *in vivo* απομόνωσή του και την περαιτέρω μελέτη του σαν θεραπευτικό ή αντιμικροβιακό βακτήριο (Abdel-Mohsein H et al, 2010, Βάσσος Δ., Διδακτορική διατριβή, 2009). Τα παραγόμενα αντιμικροβιακά συστατικά του έδειξαν σημαντικές επιδράσεις στην μείωση της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων (Müller DM et al, 2009, Puertollano E et al, 2009) και στην περαιτέρω εξάπλωσή τους στον γαστρεντερικό σωλήνα (Βάσσος Δ., διδακτορική διατριβή, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες των δύο λακτοβακίλλων:

Πίνακας 2: Ιδιότητες *L. paracasei subsp. paracasei* και *L. plantarum*

<i>L. paracasei</i>	
Ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none">⇒ Ωφέλιμο βακτήριο⇒ Βρίσκεται στο εντερικό σύστημα⇒ Όρια θερμοκρασίας αναπτύξεως: 10-35°C⇒ Βελτίωση εντέρου και ανοσοποιητικής λειτουργίας⇒ Αντιμικροβιακή δράση⇒ Βακτηριοσίνες⇒ Ωφέλειες σε διάφορες ασθένειες
Τρόφιμα που βρίσκεται	<ul style="list-style-type: none">⇒ Προϊόντα ζύμωσης γάλακτος⇒ Ωμό γάλα



Υλικό ανάπτυξης	MRS
<i>L. plantarum</i>	
Ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Ωφέλιμο βακτήριο ⇒ Βρίσκεται στο εντερικό σύστημα και στο σάλιο ⇒ Όρια θερμοκρασίας αναπτύξεως: 15-40°C ⇒ Αντιμικροβιακή δράση ⇒ Βακτηριοσίνες ⇒ Ωφέλειες σε διάφορες ασθένειες
Τρόφιμα που βρίσκεται	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Προϊόντα ζύμωσης ψαριών ⇒ Ζυμούμενα φυτικά προϊόντα ⇒ τυριά
Υλικό ανάπτυξης	MRS

1.4. ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν την πιο σημαντική ιδιότητα των προβιοτικών και αυτές που μελετήθηκαν περισσότερο όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση (Βάσσος Δ., 2009, Διδακτορική Διατριβή, De Vuyst L and Leroy F, 2007). Είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως που παράγονται λόγω του μεταβολισμού τους από πληθώρα προβιοτικών και διακρίνονται για την μεγάλη ετερογένεια στην δομή τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους, και τον τρόπο δράσης τους (Abee T et al, 1995, Chikindas ML, 2002, Samelis J, 2003).

Οι βακτηριοσίνες των LAB παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων Gram θετικών περισσότερο και Gram αρνητικών λιγότερο βακτηρίων διαφορετικών γενών από τα LAB (Klaenhammer T.R, 1988., Abee T et al, 1995). Λόγω αυτής τους της ιδιότητας γίνονται έρευνες πάνω σε φυσικούς τρόπους προστασίας τροφίμων χωρίς την παρουσία χημικών συντηρητικών δηλ. στην χρησιμοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων ή μεταβολιτών των βακτηριοσινών ως συντηρητικά τροφίμων (Abee T et al, 1995, Gálvez A et al, 2008, Gálvez A et al, 2007 .).

Η τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιεί περισσότερο των μεγάλο αριθμό των βακτηριοσινών που παράγονται από τα LAB (Galvez A et al, 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που παράγουν τον μεγαλύτερο αριθμό βακτηριοσινών είναι τα γένη: *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Carnobacterium sp* (Gálvez A et al, 2007).

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Υπάρχουν ορισμένες προϋποθέσεις για την επιλογή των μικροοργανισμών ως προβιοτικών οι οποίες είναι:

1. Η ικανότητα επιβίωσής τους στον πεπτικό σωλήνα:

Οι μικροοργανισμοί πρέπει να καταφέρνουν να επιβιώνουν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα, δηλ. σε χαμηλές τιμές pH, στα υδρολυτικά ένζυμα του πεπτικού σωλήνα και στα χολικά άλατα (Rolfe RD,2000).

2. Η προσκόλληση στον βλεννογόνο του εντέρου:

Η ικανότητα προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο είναι σημαντικός παράγοντας για επιλογή όσον αφορά την ικανότητα των προβιοτικών είτε να εμποδίζουν τη προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών, είτε να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο έντερο και να επιτελούν ανοσορυθμιστικό ρόλο. Η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών ποικίλει. Φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από τα γαστρικά υγρά όσο και από τη διαδικασία παρασκευής των ίδιων των προβιοτικών (Tuomola et al. 2000; Ouwehand et al. 2001).

3. Το τεχνολογικό δυναμικό:

Τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να διαθέτουν καλό τεχνολογικό δυναμικό, δηλαδή να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, να μπορούν να καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα και να συμβάλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των προϊόντων ζύμωσης στα οποία χρησιμοποιούνται (Oliveira RP et al, 2009, Sodini I et al, 2002, Heller KJ., 2001).

4. Η βιωσιμότητα τους:

Η βιωσιμότητα των προβιοτικών θεωρείται σημαντικό κριτήριο. Μέχρι στιγμής οι κλινικές μελέτες που έχουν γίνει με τη χρήση ζωντανών προβιοτικών, δείχνουν ότι τα ζωντανά κύτταρα είναι βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ανοσορυθμιστικής δράσης (Temmerman et al. 2001; Hamilton-Miller 2001). Πρέπει να σημειωθεί πάντως,

ότι τα τελευταία χρόνια άρχισαν να γίνονται μελέτες και με τη χρήση μη ζωντανών μικροοργανισμών (Ouwenhand and Salminen 1998).

Διάφορα είδη και γένη μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά. Τα πιο γνωστά είναι τα LAB και πιο συγκεκριμένα οι *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, και *Bifidobacterium sp.* (Yan F and Polk DB, 2010).

Από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς οι λακτοβάκιλλοι χρησιμοποιούνται ευρέως ως προβιοτικά καθώς είναι γενικά ανθεκτικοί στις συνθήκες που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και ταυτόχρονα διαθέτουν τεχνολογικό δυναμικό (Kligler B- Cohrssen A., 2008). Τα πιο πολλά από τα άλλα προβιοτικά είδη δεν χρησιμοποιούνται στη παραγωγή προϊόντων ζύμωσης, αλλά κυκλοφορούν υπό μορφή διαιτητικών συμπληρωμάτων και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Trafalska E -Grzybowska K., 2004).

Οι ιδιότητες των προβιοτικών πρέπει να μην αλλοιώνονται τόσο κατά τη διαδικασία παραγωγής του τροφίμου ή του σκευάσματος, όσο και κατά τη συντήρησή τους. Η καθαρότητα των προβιοτικών παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Έχουν αναφερθεί επιμολύνσεις σε προβιοτικά σκευάσματα. Η σωστή ταυτοποίηση των στελεχών και η τήρηση των κανόνων υγιεινής κατά τη παρασκευή είναι πολύ σημαντικά. 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 (Donohue DC, 2006, Bansal T and Garg S., 2008).

1.6. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΩΦΕΛΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Τα προβιοτικά βακτήρια και κυρίως τα οξυγαλακτικά (lactic acid bacteria-LAB), χρησιμοποιούνταν για χιλιάδες χρόνια για παραγωγή προϊόντων γαλακτικής και αλκοολικής ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων γάλακτος (Jung SW et al, 2008). Πρώτος ο Ρώσος χημικός Elie Metchnikoff (1845-1916) υποστήριξε ότι οι γαλακτοβάκιλλοι της γιαούρτης έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία και τη μακροημέρευση, ενώ σύμφωνα με τον Ιάπωνα μικροβιολόγο Minoru Shirota (1899-1982) μια ισορροπημένη και υγιής εντερική χλωρίδα αποτελεί τη βάση για μια μακρά και υγιή ζωή. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί 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 (εικόνα 2) (Εφη Τσακαλίδου).

Οξυγαλακτική βακτήρια σε ζυμωμένα τρόφιμα

Γαλακτοκομικά προϊόντα

- γιαούρτι
- τυρί
- κεφίρ
- ξινόγαλα

Προϊόντα κρέατος

- αλλαντικά

Λαχανικά

- Ξινό λάχανο
- Πίκλες

Ψωμί

- κρούσιμα

Ποτά

- κρασί

Παραδοσιακά

- *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*
- *Streptococcus thermophilus*
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

Πως πρόσφατα

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus johnsonii*
- *Bifidobacterium* spp.

Εικόνα 2: Προβιοτικά που υπάρχουν στα προϊόντα ζύμωσης γάλακτος

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και εμφανίζονται στην αγορά νέοι τύποι γιαούρτης που παρασκευάζονται με τη χρήση των λεγόμενων προβιοτικών βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά πιστεύεται ότι αυξάνουν τη ευεργετική επίδραση του γιαουρτιού, και γενικότερα των τροφίμων στα οποία απαντώνται, στην υγεία του ανθρώπου (Tok E and Aslim B., 2010, Haukioja A., 2010, Guarner F et al, 2005).

Επίσης, σήμερα οι ερευνητές στρέφονται σε εφαρμογές των προβιοτικών βακτηρίων πέραν του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου, ενώ παράλληλα συζητάνε για προβιοτικά βακτήρια με εξειδικευμένη λειτουργικότητα (Xiao JZ et al, 2003, Pereira DI and Gibson GR.,2002).

1.7. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1. **Ρύθμιση της εντερικής χλωρίδας.** Η αρχική ιδέα για τη δράση των προβιοτικών ήταν ότι αλλάζουν τη σύσταση της εντερικής χλωρίδας ευνοώντας την επικράτηση των ευεργετικών μικροοργανισμών (*lactobacilli*, *bifidobacteria*) έναντι των επιβλαβών (*coliforms*, *clostridia*), ιδιαίτερα όταν οι αρχικοί πληθυσμοί των πρώτων είναι χαμηλοί. 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 αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. οργανικά οξέα, βακτηριοσίνες) από τα προβιοτικά (Serivin AL., 2004, Koninkx JF and Malago JJ., 2008). Παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση του *L. rhamnosus GG* σχετίζεται με την αύξηση των *bifidobacteria* στα κόπρανα (Benno et al. 1996), ενώ η κατανάλωση του *L. salivarius UCC 118* του προκαλεί αύξηση των επιπέδων των εντεροκόκκων (Mattila-Sandholm et al 1999).
2. **Ανοσορυθμιστική δράση.** Η εντερική χλωρίδα είναι ένα σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού του εντέρου (Guarner F.,2006). Εκτός όμως από την εντερική δράση των προβιοτικών πολύ σημασία δόθηκε στα οφέλη μερικών προβιοτικών στο ανοσολογικό σύστημα (Gill H and Prasad J, 2008, Gupta V and Garg R., 2009, Trafalska E and Grzybowska K., 2004). Υπάρχουν αποδείξεις ότι μερικά στελέχη προβιοτικών μπορούν να αλλάξουν την μονοκύττωση και την δράση των φυσικών «φονιάδων» κυττάρων στο αίμα (MacDonald TT and Bell I., 2010). Ο *Lactobacillus GG* έχει αποδειχθεί να έχει ωφέλιμες δράσεις στην εσωτερική ανοσολογία. (Gupta V and Garg R., 2009). Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι λαμβάνοντας συγκεκριμένα προβιοτικά ευνοούνται οι αντιδράσεις των αντισωμάτων στην κατάποση ή την συστηματική χορήγηση φαρμάκων και εμβολίων. Η έρευνα είναι ακόμη στα πρώτα στάδια και δεν αποδεικνύεται με διάφορες μελέτες σε όλα τα εμβόλια (MacDonald TT and Bell I., 2010). Μια συστηματική έρευνα στο μέλλον θα παρουσιάσει καλύτερα αποτελέσματα, ιδιαίτερα στον τρόπο που εμπλέκονται οι διάφοροι μηχανισμοί σε αυτήν την δράση καθώς και την συχνότητα και



διάρκεια που απαιτείται σε διαφορετικές συνθήκες για διαφορετικούς πληθυσμούς αρρώστων.

1.8. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΤΟΥ ΜΕΛΛΟΝΤΟΣ

Προκειμένου να σχεδιασθούν τα προβιοτικά του μέλλοντος πρέπει να διασαφηνιστούν τα κριτήρια επιλογής τους, επομένως πρέπει να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών. Χρειάζονται παραπέρα έρευνες για τα είδη και γένη των προβιοτικών που πρέπει να χορηγούνται καθώς και για την δοσολογία και τρόπο χορήγησής τους στις διάφορες περιπτώσεις. 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 (Ouwenhand et al. 1999), και ότι επηρεάζεται από τη φυσιολογία του επιθηλίου ανάλογα με το αν ο άνθρωπος ασθενεί ή είναι υγιής (Ouwenhand et al. 2002).

Τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες για το κατά πόσο μη ζωντανά κύτταρα προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να έχουν εξ ίσου ευεργετικά αποτελέσματα. Τα μη ζωντανά βακτήρια πλεονεκτούν έναντι των ζωντανών σε πολλά σημεία. Έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής, μικρότερο κόστος συντήρησης και μεταφοράς και είναι πιο ασφαλή. Μελέτες που έχουν γίνει με μη ζωντανά κύτταρα έχουν δείξει μείωση της διάρκειας διάρροιας από rotavirus (Kaila et al. 1995) και καταπράυνση σε περιπτώσεις δυσανεξίας στη λακτόζη (Vesa et al. 2000).

Μέχρι σήμερα η χρήση των προβιοτικών στοχεύει το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και τη μικροχλωρίδα του. Θεωρητικά, κάθε μέρος του ανθρώπινου σώματος 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 περιδοντιτίτιδα. Έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση γιαούρτης μειώνει τους βλαβερούς στρεπτοκόκκους που ευθύνονται για την τερηδόνα (Petti et al. 2001).

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 H_2O_2 (Redondo-Lopez et al. 1990). Η διατάραξη της χλωρίδας των γαλακτοβακίλλων φαίνεται ότι σχετίζεται με τον κίνδυνο λοιμώξεων. Πειράματα που έγιναν με επιλεγμένα στελέχη γαλακτοβακίλλων έδειξαν μείωση των υποτροπών τέτοιων λοιμώξεων. Η παραγωγή H_2O_2 και τασιενεργών ουσιών από τους γαλακτοβακίλλους φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο σ' αυτό (Reid et al. 2001).

Η επιδερμίδα διαθέτει επίσης μικροχλωρίδα που ποικίλει ανάλογα με το μέρος του σώματος. Τα πιο συνηθισμένα γένη που συναντάμε είναι τα *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* και η ζύμη *Malassezia*. Αρκετά είδη αυτών των γενών μπορεί να είναι ευκαιριακά παθογόνα. Μία συστηματική έρευνα που διεξήγαγε η Susanne Boneberger και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι τα προβιοτικά είναι αποτελεσματικά στην θεραπεία δερματικών παθήσεων (Boneberger S et al, 2010). Μια παρόμοια έρευνα έγινε και για τη περιοχή του άνω και κάτω αναπνευστικού συστήματος που διαθέτει τη δική του μικροχλωρίδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν όφελος των προβιοτικών στην βαρύτητα και διάρκεια των συμπτωμάτων αλλά όχι στην μείωση των ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος (Vouloumanou EK et al, 2009).

Σήμερα πλέον η Τεχνολογία Τροφίμων χρησιμοποιεί συγκεκριμένες ποικιλίες starters για την ζύμωση των τροφίμων. Οι βασικές αρχές σχεδιασμού τους στηρίζονται τόσο στην γνώση του βακτηριακού μεταβολισμού και της φυσιολογίας όσο στην αλληλεπίδραση με τα προϊόντα των τροφίμων. Οι πληθώρα νέων ερευνών πάνω στα προβιοτικά θα επηρεάσει αρκετά τις μελλοντικές καλλιέργειες των προβιοτικών και την χρησιμοποίησή τους στην βιομηχανία τροφίμων. Θα δημιουργήσει μια ανάγκη της Βιοτεχνολογίας να φτιάξει καλύτερα και ασφαλέστερα προϊόντα, ή μπορεί να περιορίσει την χρήση των starter καλλιέργειών σε μερικά είδη που πραγματικά παίζουν ρόλο στα τρόφιμα. Επιτυχείς καλλιέργειες βασισμένες στην μοντέρνα τεχνολογία περιμένουμε να εφαρμοστούν στις περιοχές των: προβιοτικών, βιο-προστασίας, καλλιέργειας και βελτίωσης των ήδη χρησιμοποιημένων στελεχών και πιθανών στην εισαγωγή στελεχών που να ζυμώνουν άλλα προϊόντα τροφίμων. Μία επιστημονική βάση με πρωτοπορίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα βιομηχανικά στελέχη έχει ήδη αρχίσει να χρησιμοποιείται (Hansen EB, 2002).

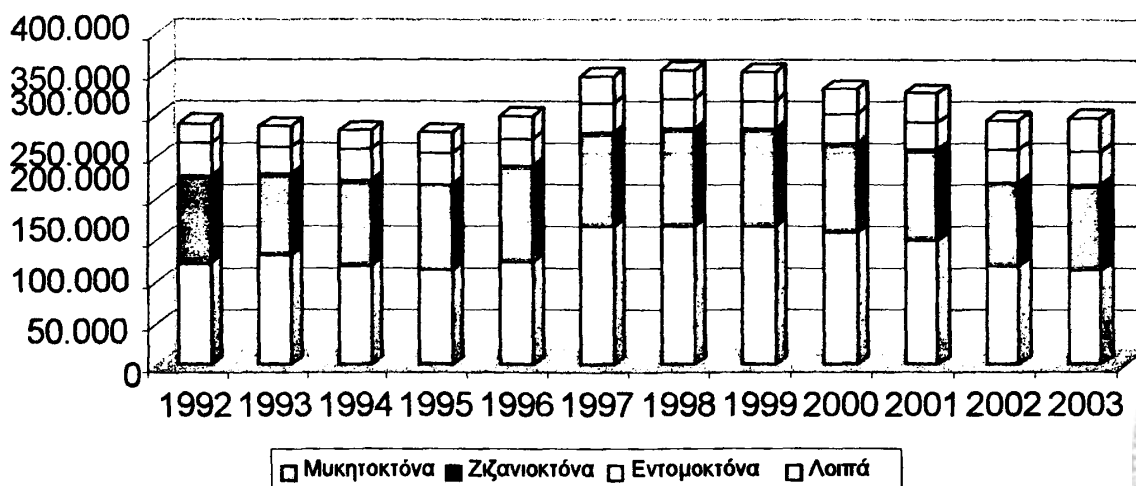
2. ΠΕΡΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως παρασιτοκτόνα (pesticides) ή φυτοφάρμακα ή γεωργικά φάρμακα ορίζονται οι χημικές ουσίες ή τα μίγματα χημικών ουσιών, που προορίζονται για να αποτρέψουν, να μετριάσουν ή να σταματήσουν τη δράση των παρασίτων (pests). Στον παραπάνω ορισμό συμπεριλαμβάνονται τα προϊόντα προστασίας της φυτικής και της ζωικής παραγωγής, καθώς επίσης οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές αύξησης των φυτών (Κουτσοτόλη Α., Διδακτορική Διατριβή, Danis T., et al, 2002, Αλμπάνης Γ., 1999, Αλμπάνης Γ., 1997).

Η χρήση των χημικών ουσιών στη γεωργία εμφανίστηκε από τους ομηρικούς χρόνους με τη χρήση του καιγόμενου θείου. Η πρώτη όμως συστηματική μελέτη χημικών ουσιών και η χρησιμοποίησή τους ως γεωργικών φαρμάκων εμφανίστηκε στα μέσα του 19ου αιώνα. Τα πρώτα φάρμακα ήταν ανόργανες ενώσεις απλής χημικής σύστασης (Ελένη-Μαλάτου, Διδακτορική διατριβή, 1997). Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες η χρήση των παρασιτοκτόνων εξαπλώθηκε σε ολόκληρο τον πλανήτη (Ελένη-Μαλάτου, 1997, Mallatou H. et al, 1997). Η παγκόσμια χρήση εντομοκτόνων έχει αυξηθεί σημαντικά συνοδευόμενη με αλλαγές στις καλλιεργητικές πρακτικές (Konstantinou et al, 2007). Σήμερα περισσότερα από 800 εντομοκτόνα που ανήκουν σε 100 διαφορετικές χημικές τάξεις χρησιμοποιούνται ευρέως στην αγροτική πρακτική παγκοσμίως (Botitsi Helen et al, 2007). Το 1980 χρησιμοποιήθηκαν παγκόσμια 4,5 εκατομμύρια τόνοι παρασιτοκτόνων, ενώ η ποσότητα αυτή ξεπέρασε τα 6,5 εκατ. τόνους μετά το 1990 (πίνακας 3) (Ελένη Μαλλάτου Μπομπίνη, 2007).

Πίνακας 3 : Πωλήσεις δραστικών ουσιών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (σε τόνους) στην ΕΕ-15 (www.agrotypos.gr).



2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ

Η μεγάλη πληθώρα των παρασιτοκτόνων οδήγησε στην ταξινόμησή τους σε διάφορες κατηγορίες. Η ταξινόμηση γίνεται ανάλογα με την χημική τους δομή και την βιολογική τους δράση.

Ανάλογα με τη χημική τους δομή (Αλμπάνης Τ., 1999, Αλμπάνης Τ., 1997)

Η ταξινόμηση αυτή γίνεται με βάση τις διάφορες χημικές ομάδες, ανάλογα με την δραστική ουσία που περιέχουν και οι κυριότερες απ' αυτές είναι :

- α) χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες
- β) οργανοφωσφορικοί εστέρες
- γ) καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους
- δ) ενώσεις των χλωρο- και αμινο- τριαζινών
- ε) ενώσεις της ομάδας των ουριών και των ανιλιδίων
- στ) πυρεθρινοειδή και φυσικές πυρεθρίνες
- ζ) φερομόνες
- η) ανόργανα άλατα των μετάλλων *As, Zn, Cu* κ.α.

Ανάλογα με τη βιολογική τους δράση (Αλμπάνης Τ., 1999, Αλμπάνης Τ., 1997)

Τα παρασιτοκτόνα ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ταξινομούνται σε:

- α) εντομοκτόνα,
- β) ζιζανιοκτόνα,
- γ) μυκητοκτόνα,
- δ) αφιδοκτόνα,
- ε) ακαρεοκτόνα,
- στ) νηματοκτόνα,
- ζ) μαλακιοκτόνα,
- η) τρωκτοκτόνα,
- θ) βακτηριοκτόνα,
- ι) φερομόνες και

κ) ρυθμιστές αύξησης των φυτών.

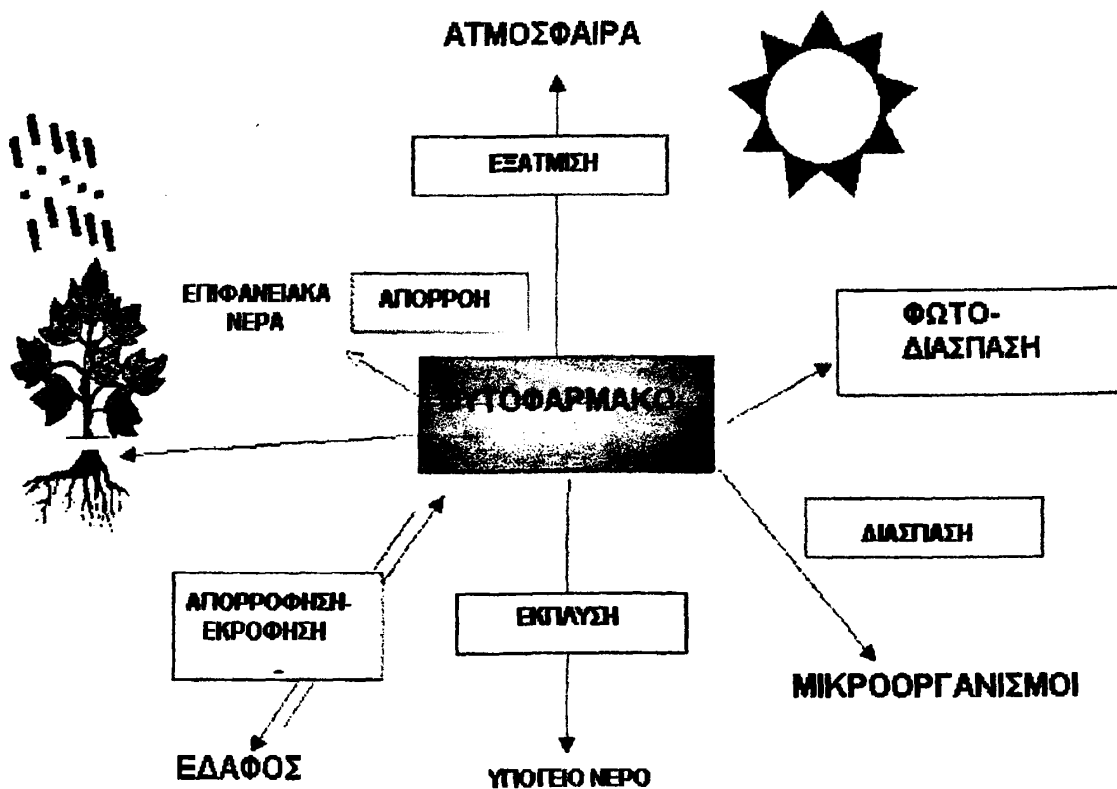
Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι τα **ζιζανιοκτόνα** και **εντομοκτόνα** ενώ ακολουθούν τα **μυκητοκτόνα**.

- ◆ **Ζιζανιοκτόνα (herbicides)** :είναι ενώσεις χλωριωμένων υδρογονανθράκων (2,4-D, 2,4,5-T, trifluralin, διχλωροδιφαινύλια κ.α.) και των ομάδων της τριαζίνης και της ουρίας (proprazine, simazine, atrazine, monuron, fenuron, diuron, linuron κ.α.).
- ◆ **Εντομοκτόνα (insecticides)**: είναι κυρίως οργανοφωσφορικοί εστέρες (parathion, m. parathion, azimphos methyl, phosphamintion κ.α.), χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (DDT, lindane, dieldrin, hephtachlor, chlordane κ.α.), καρβαμιδικές ενώσεις (carbaryl, carbofuran, barban κ.α.) και πυρεθρίνες.
- ◆ **Μυκητοκτόνα (fungicides)**: είναι κυρίως καρβαμιδικές ενώσεις (captan, ferbam, nabam κ.α.) και εστέρες αλειφατικών οξέων (TCA, dalapon κ.α.) (Αλμπάνης Τ., 1999, Αλμπάνης Τ., 1997).

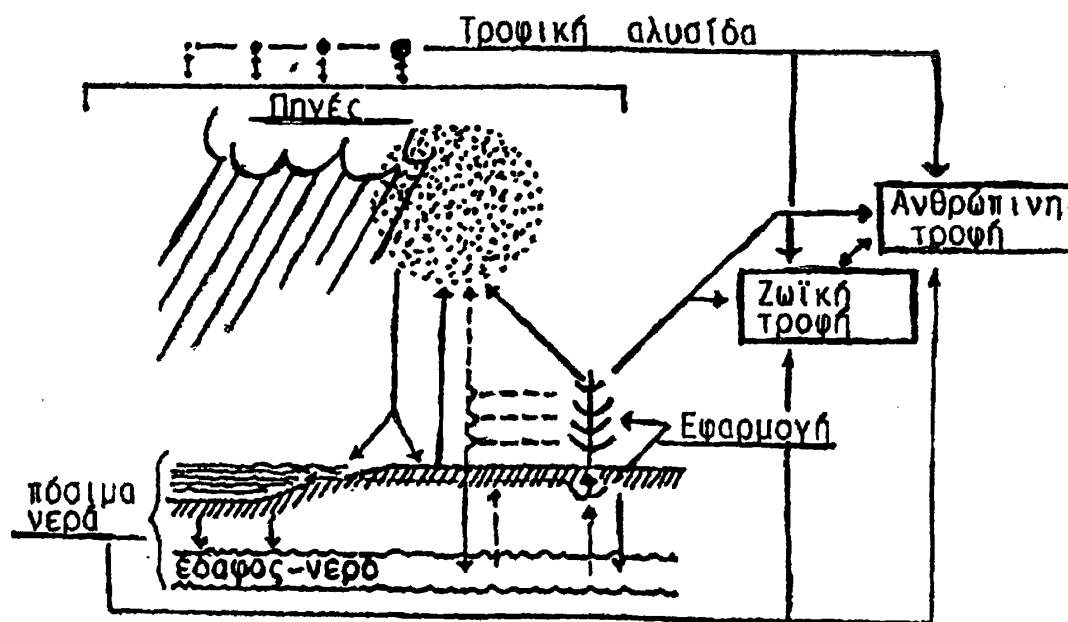
2.3. Η ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα φυτοφάρμακα, μετά την εφαρμογή τους, στα φυτά ή στο έδαφος υφίστανται μια σειρά διαδικασιών φυσικών, χημικών και βιολογικών (υδρόλυση, οξειδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά κ.α.) (Τ. Αλμπάνης, 1997) (εικόνα 3). Πολλά όμως από τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν εύκολα βιοαποικοδομήσιμα με αποτέλεσμα να αρχίσει η συσσώρευσή τους στη φύση (εικόνα 4). Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα των οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον ήταν γνωστή από τις πρώτες εφαρμογές των προϊόντων, η υπολειμματική τους όμως δράση και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον ανακαλύφθηκαν αργότερα (Μαλάτου- Μπομπίνη Ε., διδακτορική διατριβή).

Έτσι, η διαδεδομένη χρήση των παρασιτοκτόνων στις καλλιέργειες είχε και εξακολουθεί να έχει ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του περιβάλλοντος, του εδάφους, των νερών των ποταμών, των λιμνών και των θαλασσών και την εμφανισή τους σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα, το γάλα και τα λιπαρά μέρη του ανθρώπινου σώματος (Τ. Αλμπάνης, 1999).

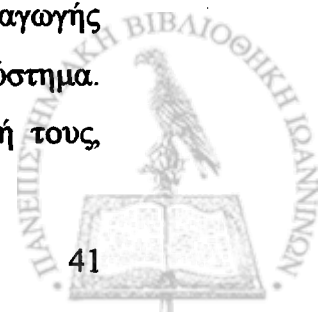


Εικόνα 3: Τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον (Α. Κουτσοτόλη, Διδακτορική Διατριβή)

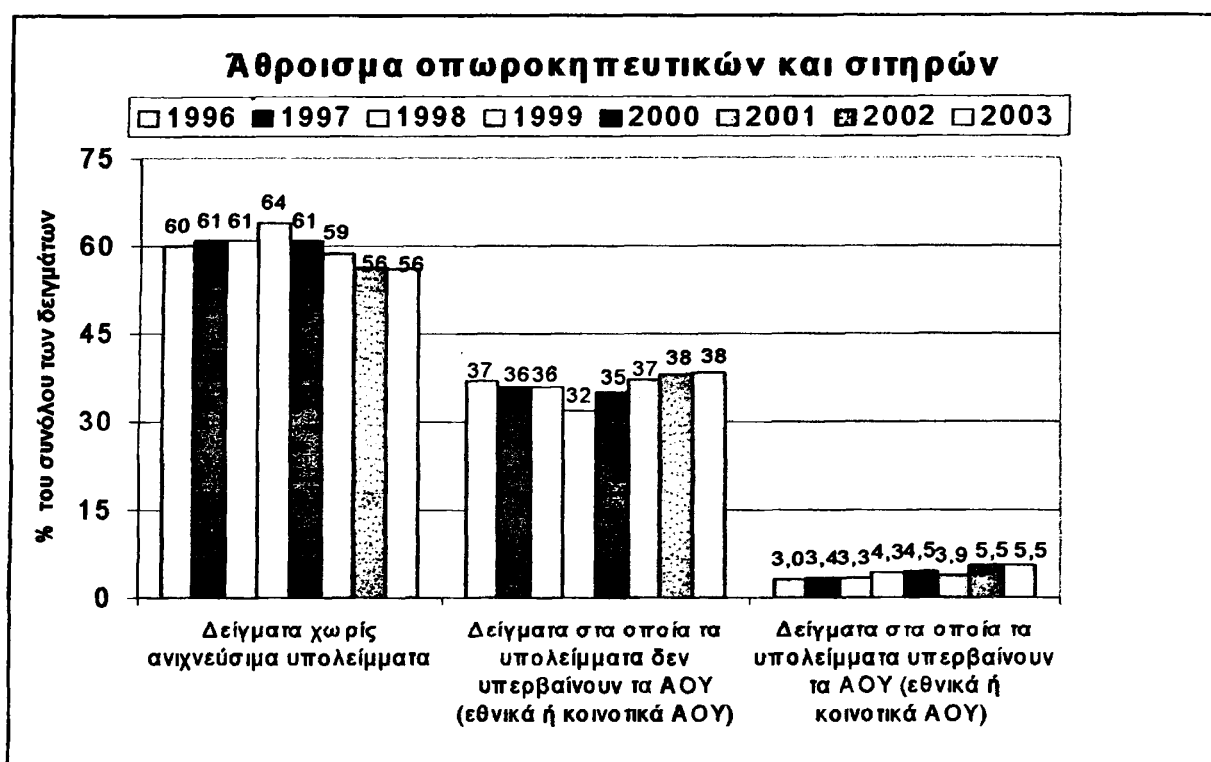


Εικόνα 4: Παραστατική απεικόνιση της τύχης των φυτοφαρμάκων και της πιθανής κατάληξης των υπολειμμάτων τους (Αλμπάνης Τ., 1997).

Σήμερα ούτε η επιστήμη ούτε και οι ίδιες οι βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων δεν αμφισβητούν τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο οικοσύστημα. Γίνεται προσπάθεια ώστε να παρθούν μέτρα για την καλύτερη αξιοποίησή τους,



ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές τους συνέπειες παρ' όλα αυτά η αλόγιστη χρήση έχει γίνει πλέον καθημερινή πράξη. Έτσι, η εκτεταμένη χρήση τους είχε ως αποτέλεσμα υπολείμμάτα τους να βρίσκονται σήμερα, σχεδόν, σε όλο τον έμψυχο και άψυχο κόσμο του πλανήτη, στο νερό, στο έδαφος, στα φυτά, στα ζώα και στον άνθρωπο. (Ε. Μαλάτου- Μπομπίνη, Διδακτορική διατριβή, Konstantinou et al, 2007, Zisis Vryzas et al, 2007, Lambropoulou Dimitra A. and Albanis Triantafyllos A, 2007). Στην γη επίπεδα «κινδύνου» υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων έχουν ανιχνευθεί στον αέρα, στο νερό, στο έδαφος, ακόμη και στα τρόφιμα και βιολογικούς παράγοντες (Lambropoulou Dimitra A. and Albanis Triantafyllos A, 2007) (πίνακας 4).



Πίνακας 4: Αποτελέσματα των ελέγχων για την ανεύρεση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε οπωροκηπευτικά και σιτηρά στην ΕΕ-15 (www.minagric.gr).

Η εισαγωγή στο περιβάλλον ουσιών τοξικών για τους ζωντανούς οργανισμούς έχει εκτός από το επιθυμητό αποτέλεσμα, που είναι η καταπολέμηση των παρασίτων, και αρνητικές επιπτώσεις όπως είναι: η ελάττωση της βιοποικιλότητας, η ρύπανση των επιφανειακών και υπογείων υδάτων καθώς και η αύξηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία που προέρχεται είτε από την απ' ευθείας έκθεση στα φυτοφάρμακα είτε από τα υπολείμμάτα τους στις τροφές και το νερό (Α. Κουτσοτόλη, διδακτορική διατριβή, Μαλάτου- Μπομπίνη Ε., διδακτορική διατριβή).

Στους αγροτικούς πληθυσμούς είναι γνωστό ότι η προστασία της γεωργικής παραγωγής με τη χρήση διαφόρων φυτοφαρμάκων, δημιουργεί μακροπρόθεσμα, προβλήματα υγείας, όπως επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καρκινογόνο δράση, βλάβη στο αναπνευστικό σύστημα, δερματίτιδες, εγκαύματα κ.α όπως απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Τ., Αλιμπάνης, 1997).

1. Επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα
2. Δερματίτιδες, εγκαύματα και άλλες δερματικές ασθένειες
3. Στομαχικές διαταραχές και ελαφρές δηλητηριάσεις
4. Αδυναμία, ζαλάδες, παράλυση των κάτω άκρων
5. Βλάβες στο αναπνευστικό σύστημα, ερεθισμός βρόγχων και πνευμόνων
6. Επίδραση στη λειτουργία του συκωτιού και των νεφρών
7. Συσσώρευση στο αίμα πολλών τοξικών μεταβολιτών
8. Μεταλλαξιόγonos και καρκινογόνος δράση (επίδραση σε αναπτυσσόμενα έμβρυα)
9. Διάφοροι καρκίνοι (προστάτη, στομάχου, οισοφάγου, πνευμόνων, στόματος, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος)
10. Αναστολή πολλών βιολογικών λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος
11. Συνεργική δράση πολλών παρασιτοκτόνων με το κάπνισμα και τα οίνοπνευματώδη

Πίνακας 5: Κύρια χαρακτηριστικά επαγγελματικών ασθενειών σε χρήστες παρασιτοκτόνων

Λόγω των παραπάνω γεγονότων, τα τελευταία χρόνια η αυξανόμενη ανησυχία των κινδύνων που σχετίζονται με τα φυτοφάρμακα έχει οδηγήσει σε μια πιο αυστηρή και κριτική σκέψη της κοινωνίας σχετικά με την χρησιμοποίηση των φυτοφαρμάκων. Παράλληλα, πολλοί οργανισμοί (FAO/WHO), για λόγους προστασίας της δημόσιας υγείας, συμμετείχαν στην ψήφιση νόμων για τον περιορισμό ή την αυστηρή χρησιμοποίηση και παραγωγή αρκετών φυτοφαρμάκων. Με την πάροδο του χρόνου, διαμορφώθηκε ένα ιδιαίτερα εξελιγμένο σύστημα αξιολόγησης των κινδύνων της χρήσης φυτοφαρμάκων για την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον (περιοδικό ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ) και καθορίστηκαν ανώτατα ανεκτά όρια υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στα διάφορα τρόφιμα.

2.4. ΜΕΓΙΣΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΑ ΟΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ- MRLs.

Στη χώρα μας ισχύουν τα όρια που καθορίστηκαν με την Οδηγία 91/414/ΕΟΚ σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων (MRLs) στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές (Botitsi Helen et al, 2007, περιοδικό ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ). Τροποποίηση του κανονισμού 396/2005 ισχύει από την 1η Σεπτεμβρίου 2008, όπου νέες ρυθμίσεις επιβάλλουν σε όλη την Ένωση εναρμονισμένα ανώτατα όρια για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Σκοπός της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ είναι η πρόληψη των κινδύνων στην πηγή μέσω διεξοδικότατης εκτίμησης του κινδύνου κάθε δραστικής ουσίας και των προϊόντων που την περιέχουν, πριν εγκριθεί η χρήση τους. Η χορήγηση αδείας για ορισμένες χρήσεις ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος υποδηλώνει, επομένως πως υπό κανονικές συνθήκες, οι χρήσεις αυτές δεν συνεπάγονται απαράδεκτη επίδραση στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων ή στο περιβάλλον. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 396/2005 ορίζει ανώτατα όρια υπολειμμάτων – ΑΟΥ (ανώτατα όρια καταλοίπων - ΑΟΚ) δραστικών ουσιών σε φυτικά και ζωικά προϊόντα, με στόχο τον περιορισμό της έκθεσης των καταναλωτών στο τέλος της τροφικής αλυσίδας. Η παρακολούθηση της τήρησης των ΑΟΥ αποτελεί επίσης σημαντικό εργαλείο για να κριθεί κατά πόσο οι επαγγελματίες χρήστες στην ΕΕ (π.χ. οι γεωργοί) έχουν εφαρμόσει ορθά τις συστάσεις και τους περιορισμούς που περιλαμβάνονται στις χορηγούμενες από τα κράτη μέλη άδειες για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Ανάλογο σύστημα εκτίμησης θεσπίστηκε για τα βιοκτόνα με την οδηγία 98/8/ΕΚ1, η οποία υποχρέωσε πολλά κράτη μέλη να εκδώσουν για πρώτη φορά νομοθεσία σχετικά με τα προϊόντα αυτά (παραπομπές).

Αρκετές κατευθύνσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν προτείνει διαφορετικά MRLs για υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε λαχανικά και φρούτα στο ελάχιστο μικρογραμμάριο ανά κιλό (mg kg^{-1}). Ειδικά MRLs δίνονται στην ιστοσελίδα http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/ όπου αναγράφεται το ανώτατο υπολειμματικό όριο για κάθε φυτοφάρμακο σε κάθε κατηγορία τροφίμου (φρούτα, λαχανικά, σπόρους). Το MRLs κάθε φυτοφαρμάκου εξαρτάται από την τοξικότητα αυτού. Γενικότερα, στα φρούτα και λαχανικά τα οποία προορίζονται για την παραγωγή



παιδικών τροφών ένα MRLs του 0.01 mg kg⁻¹ είναι δεκτό σε όλα τα φυτοφάρμακα, MRLs κάτω του 0.01 mg kg⁻¹ έχει καθιερωθεί για μερικά τοξικά εντομοκτόνα (atrazine, carbosulfan κ.α.), ενώ η χρησιμοποίηση μερικών πολύ τοξικών εντομοκτόνων π.χ. methyl parathion, parathion, alachlor έχει απαγορευθεί (Botitsi Helen et al, 2007, περιοδικό ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ). Σε άλλα λιγότερο τοξικά εντομοκτόνα το MRLs είναι μεγαλύτερο από 0,01 (Canbendazim, Dodine, EPTC, Oxycarboxil κ.α.) ενώ σε άλλα (Carbon dioxide, Ethylene κ.α.) δεν απαιτείται MRLs.

2.5. ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ



Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ουσίες ή βιολογικοί οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν μύκητες ή σπόρους μυκήτων. Οι μύκητες μπορούν να προκαλέσουν σημαντική ζημιά στην γεωργία, με αποτέλεσμα την μείωση της σοδιάς και την έλλειψη ποιότητας και οφέλους. Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στην γεωργία με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον (Fai PB and Grant A., 2009). Τα χημικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των οωμυκήτων, που δεν είναι μύκητες, αναφέρονται όμως σαν μύκητες καθώς οι οωμύκητες χρησιμοποιούν τους ίδιους μηχανισμούς με τους μύκητες στην προσβολή των φυτών (Latijnhouwers M et al).

Για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα ένας μεγάλος αριθμός χημικών ενώσεων μυκητοκτόνων. Αυτές διακρίνονται στις εξής κατηγορίες (www.lib.teiher.gr):

1. Ανόργανα μυκητοκτόνα:

Περιλαμβάνουν το θείο (θειάφι) και ανόργανες ενώσεις βαρέων μετάλλων όπως το χαλκό και τον υδράργυρο.

2. Οργανομεταλλικά:

Οι ανόργανες ενώσεις των μετάλλων με μυκητοτοξικές ιδιότητες έχουν το ελάττωμα να είναι και πολύ τοξικές για τα φυτά καθώς και για τον άνθρωπο και τα άλλα θερμόαιμα. Η εκτελεστική τοξικότητα και η δραστικότητα βελτιώνονται αν το

μεταλλικό κατιόν συνδεθεί με άτομο άνθρακα οργανικής ρίζας σχηματίζοντας έτσι μία οργανομεταλλική ένωση. Το οργανικό μέρος του μορίου επίσης διευκολύνει πολλές φορές την πρόσληψη και διακίνηση του μετάλλου μέσα στους φυτικούς ιστούς προς τη θέση δράσης του. Έτσι ενώ ο ανόργανος κασσίτερος είναι σχεδόν ανενεργός βιολογικά, μερικές οργανικές ενώσεις του κασσίτερου είναι από τα πιο αποτελεσματικά βιοκτόνα που έχουν γίνει γνωστά μέχρι σήμερα.

3. Προστατευτικά οργανικά:

Η χρήση των ουσιών αυτών άρχισε με την ανακάλυψη της ομάδας των διθειοκαρβαμιδικών, μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1930. Τα οργανικά προστατευτικά μυκητοκτόνα δεν είναι φυτοτοξικά, έχουν μηδαμινή τοξικότητα για τα θερμόαιμα σε σχέση με τα οργανομεταλλικά και δεν είναι έμμονα στο περιβάλλον. Έχουν γενική τοξικότητα στο υποκυτταρικό επίπεδο, και έτσι δεν έχουν εκλεκτική δράση.

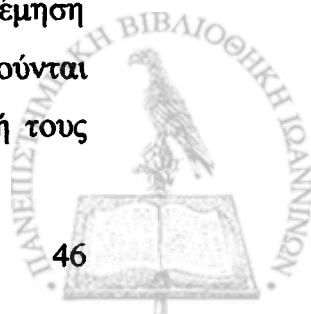
4. Διασυστηματικά:

Για να χαρακτηριστεί ένα γεωργικό φάρμακο κυριολεκτικά διασυστηματικό θα πρέπει να μπορεί να κυκλοφορεί στο εσωτερικό όλων των κυττάρων του φυτού και να μπορεί να μεταφερθεί και προς τα πάνω (αποπλαστική κίνηση) ή και προς τα κάτω (συμπλαστική κίνηση) μέσα στο σώμα του φυτού. Η συμπλαστική κίνηση γίνεται μέσα στο πρωτόπλασμα των κυττάρων δια μέσου της κυτοπλασματικής μεμβράνης με ενεργό μεταφορά. Η αποπλαστική κίνηση γίνεται μέσα σε νεκρά κύτταρα, π.χ. τραχείες ή από τον ελεύθερο χώρο ανάμεσα στους πρωτοπλάστες γειτονικών κυττάρων. Συνήθως σε αυτήν την περίπτωση πρόκειται για μαζική ροή, από τις ρίζες προς τα φύλλα, νερού και ουσιών διαλυμένων σε αυτό.

5. Αντιβιοτικά:

Είναι οργανικές ενώσεις πολύπλοκης χημικής δομής που παράγονται από μικροοργανισμούς και είναι τοξικές σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις σε άλλους μικροοργανισμούς. Πολλά αντιβιοτικά παράγονται σήμερα με σύνθεση για χρήση σε εμπορική κλίμακα.

Αν και πολλά αντιβιοτικά ήταν αποτελεσματικά στην καταπολέμηση ασθενειών των φυτών σε πειραματική κλίμακα, λίγα από αυτά χρησιμοποιούνται σήμερα στη γεωργική πράξη επειδή στις περισσότερες περιπτώσεις η τιμή τους



είναι ψηλότερη από των συνθετικών φυτοφαρμάκων. Άλλωστε στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχουν αντιρρήσεις σχετικά με την πλατειά χρήση τους για λόγους δημόσιας υγείας.

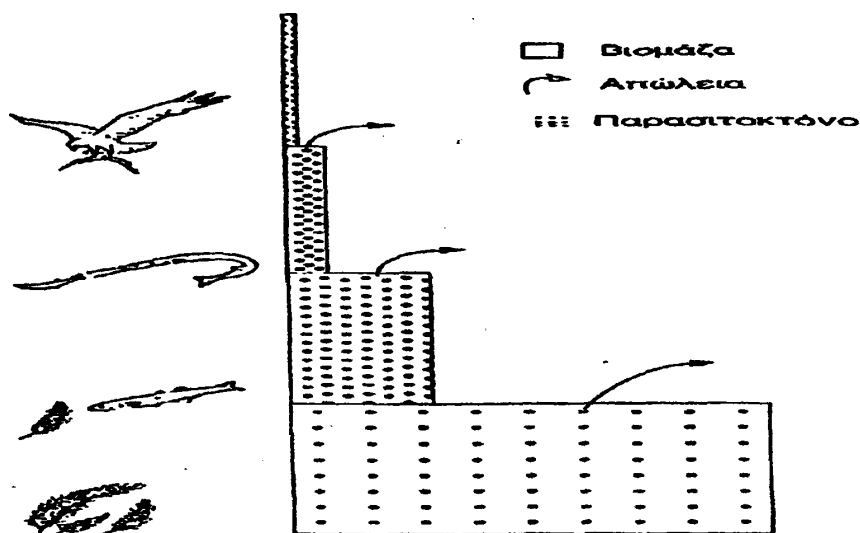
Τα αντιβιοτικά έχουν κατά κανόνα διασυστηματική δράση. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητά τους για την καταπολέμηση βακτηρίων ή μυκήτων διακρίνονται σε αντιβακτηριακά και αντιμυκωτικά.

Τα κυριότερα μυκητοκτόνα (αλφαβητικά) που κυκλοφορούν σήμερα στην Ελλάδα είναι τα εξής (www.lib.teiher.gr):

- benomyl
- Βορδιγάλιος πολτός. (Bordeaux mixture, bouillie bordelaise)
- bupirimate
- bitertanol
- captan
- carbendazim
- carboxin
- chinomethionate (ή quinomethionate)
- chlorothalonil
- copper oxychloride. (οξυγλωριούχος χαλκός)
- copper sulphate. (θειικός χαλκός)
- copper oxide. (cuprous oxide, οξείδιο του χαλκού)
- dichlofluanid.
- dicyclidine
- dinocap
- dithianon
- dodine
- fenarimol
- fentin acetate
- folpet
- fosetyl
- 8-hydroxyquinoline sulphate
- imazalil
- iprodione
- kasugamycin
- mancozeb
- maneb
- metalaxyl

- metiram
- oxycarboxin
- οξυκινολεινικός χαλκός. (copper β -hydroxyquinolate, copper oxine)
- procymidone
- propamocarb (hydrochloride)
- propineb
- streptomycin sulphate
- sulphur
- thiophanate methyl
- thiram
- triadimefon
- tridemorph
- τριβασικός θειικός χαλκός
- triforine
- vinclozolin
- ziram

Τα μυκητοκτόνα καθώς και τα τοξικά προϊόντα της αποικοδομησής τους, που σε αρκετές περιπτώσεις είναι τοξικότερα, μετακινούνται κατά μήκος των τροφικών αλυσίδων οπότε δημιουργείται η οικολογική μεγέθυνση της συγκεντρωσής τους (εικόνα 5) (Τ. Αλπιάνης, 1997). Μέσω της τροφικής αλυσίδας περνάνε στις τροφές με αποτέλεσμα υπολείμματα μυκητοκτόνων να ανιχνευτούν στα τρόφιμα ανθρώπινης κατανάλωσης (Mullin CA et al, 2010, G.T Brooks and T.R. Roberts, 1999). Μερικά από αυτά είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία όπως το vinclozolin, του οποίου απαγορεύτηκε η χρήση (Hrelia., 1996).

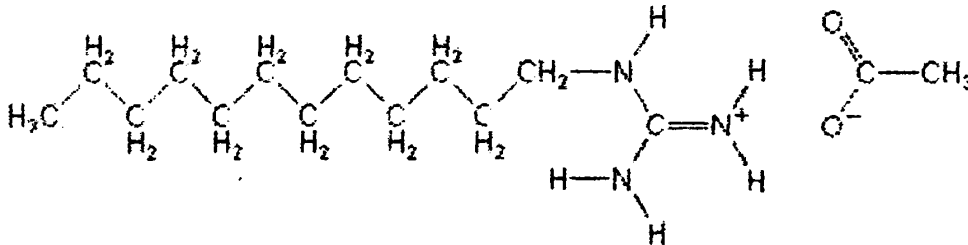


Εικόνα 5: Μεταφορά μυκητοκτόνων στην τροφική αλυσίδα

2.6. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟΥ

DODINE (extoxnet):

Zelam
Dodine₄₀₀



Εντομοκτόνο γενικής χρήσης. Ταξινομείται σαν τοξικότητα τάξης I- υψηλή τοξικότητα. Στα προϊόντα που το περιέχουν αναγράφεται το σήμα DANGER (κίνδυνος) εξαιτίας της ιδιότητάς του να προκαλέσει ερεθισμό ματιών.

Φυσικοχημικές ιδιότητες:

- ◆ Εμφάνιση: χρωματιστό ή λευκό, ελαφρά κρυσταλλικό υγρό
- ◆ Χημική ονομασία: 1-dodecylguanidinium acetate
- ◆ Χημική κατηγορία: substituted acetate
- ◆ CAS αριθμός: 2439-10-3
- ◆ Μοριακό βάρος: 287.44
- ◆ Διαλυτότητα στο νερό: 630 mg/L στους 25 °C
- ◆ Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες: διαλυτό στην μεθανόλη και αιθανόλη, i.s στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες
- ◆ Σημείο τήξης: 136 °C
- ◆ Τάση ατμών: 1300 mPa στους 20 °C

Κοινές ονομασίες: Άλλο κοινό όνομα είναι: dodine acetate. Συναντιέται επίσης και με τα ονόματα: AC 5223, Apadodine, Carpene, Curitan, Cyprex, Efuzin, Melprex, Sulgen, Syllit, Tebulan, Vandodine, and Venturol.

Τρόπος δράσης: Δρα αλλάζοντας το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, προκαλώντας απώλεια των συστατικών των κυττάρων. Είναι διαθέσιμο σαν υγρό ή σαν powder.

Τοξικολογικές επιδράσεις:

- ☒ **Υψηλή τοξικότητα:** Λόγω του ότι μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό ματιών, θεωρείται σαν προϊόν υψηλής τοξικότητας. Υψηλά τοξικό εάν καταποθεί ή εισπνευθεί. Σε δοκιμές σε ανθρώπους δεν προκάλεσε αλλεργικές αντιδράσεις δέρματος. Παρόλα αυτά, είναι ερεθιστικό ματιών και δέρματος.
- ☒ **Χρόνια τοξικότητα:** Χρόνια έκθεση ποντικών προκάλεσε μείωση αύξησης ύψους και στα δύο φύλλα και μειωμένη κατανάλωση τροφής στα αρσενικά. Σκυλιά που κατανάλωσαν Dodine για 12 μήνες παρουσίασαν αλλαγές του θυρεοειδούς και θυρεοειδικής λειτουργίας
- ☒ **Αναπαραγωγικές επιδράσεις:** Το Dodine δεν μπορεί να προκαλέσει αναπαραγωγικές επιδράσεις στους ανθρώπους εάν εκτεθούν στα επιτρεπόμενα επίπεδα έκθεσης.
- ☒ **Τερατογενείς επιδράσεις:** Δεν υπάρχουν στοιχεία για τερατογενείς επιδράσεις.
- ☒ **Μεταλλαξιγόνες επιδράσεις:** Το Dodine δεν φαίνεται να είναι μεταλλαξιγόνο.
- ☒ **Καρκινογενείς επιδράσεις:** Δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες.
- ☒ **Τοξικότητα στα όργανα:** Μακροπρόθεσμες μελέτες σε ζώα έδειξαν επηρεασμό του θυρεοειδούς.
- ☒ **Υπολειμματικότητα στον άνθρωπο και στα ζώα:** Δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες.

Οικολογικές επιδράσεις:

- > **Επιδράσεις στα πουλιά:** Η μέση LD₅₀ του Dodine για τις πάπιες είναι 1142 mg/kg, υποθέτοντας ότι το συστατικό είναι μόνο χαμηλά τοξικό για τα πουλιά.
- > **Επιδράσεις σε υδρόβιους οργανισμούς:** Υψηλή τοξικότητα στα ψάρια. Η 48 ώρες LC₅₀ του dodine στο harlequin ψάρι είναι 0.53 mg/L.
- > **Επιδράσεις σε άλλους οργανισμούς:** Το Dodine δεν είναι τοξικό στις σφήκες. Το LD₅₀ στις μέλισσες είναι μεγαλύτερο από 11 mg/μέλισσα.

Τύχη στο περιβάλλον:

- ~ **Υπολλευματικότητα στο έδαφος και υπόγειο νερό:** Το Dodine έχει χαμηλή παραμονή στο έδαφος. Ο χρόνος ημιζωής του στο έδαφος είναι περίπου 20 μέρες. Διαλυτό στο νερό αλλά «δένει» σφιχτά στο έδαφος και έτσι είναι δύσκολο να μολύνει το υπόγειο νερό.
- ~ **Υπολειμματικότητα στο νερό:** Δεν υπάρχουν δεδομένα.
- ~ **Υπολειμματικότητα στα λαχανικά:** Δεν υπάρχουν δεδομένα.

Επιτρεπόμενα επίπεδα:

- ADI:** 0.01 mg/kg/ημέρα
- MCL:** Μη διαθέσιμο
- RfD:** 0.004 mg/kg/ημέρα
- PEL:** Μη διαθέσιμο
- HA:** Μη διαθέσιμο
- TLV:** Μη διαθέσιμο

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΥΤΗΣ

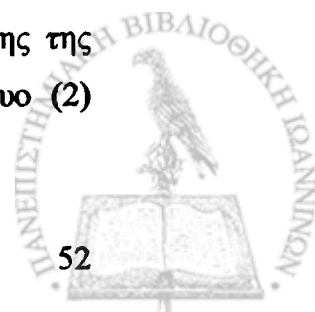
Η ρύπανση του εδάφους, των ιζημάτων, και των υδάτινων πόρων από τα παρασιτοκτόνα έχει γίνει ένα όλο και περισσότερο σημαντικό ζήτημα. Η εκτενής χρήση τους στην καταπολέμηση των διαφόρων εχθρών των φυτών έχει σαν αποτέλεσμα την πιθανή μεταφορά τους ύστερα από μια σειρά διεργασιών στην ανίχνευση τους στα υδάτινα περιβάλλοντα και στα τρόφιμα ανθρώπινης κατανάλωσης (Τ. Αλμπάνης, 1997, Ε. Μαλάτου-Μπομπίνη, 1997).

Η δηλητηρίαση του εδάφους από τα φυτοφάρμακα έχει προχωρήσει τόσο πολύ ώστε ακόμα και αν σταματήσει σήμερα η χρήση τους, η επαναφορά του εδάφους στην κανονική του κατάσταση εκτός από χρόνο, απαιτεί τεράστια ποσά και κρατική υποστήριξη για ένα τέτοιο πρόγραμμα. Γι' αυτό εκτιμάται ότι όσο η σημερινή κατάσταση της αλόγιστης χρήσης των φυτοφαρμάκων παρατείνεται, τόσο αυξάνονται οι κίνδυνοι προς την κατεύθυνση της ρύπανσης του εδάφους χωρίς επιστροφή (Τ. Αλμπάνης, 1997). Δεδομένου ότι τα μυκητοκτόνα εμφανίζονται σχεδόν μόνιμα σε ρυπασμένες περιοχές και τρόφιμα ανθρώπινης κατανάλωσης, μια αλληλεπίδραση με μικροοργανισμούς φαίνεται πολύ πιθανή. Ως εκ τούτου επί σειρά ετών πλήθος ερευνητικών ομάδων στρέφονται στη μελέτη της επίδρασης των παρασιτοκτόνων σε διάφορους μικροοργανισμούς σε εδάφη (Javoreková S et al, 2010, Zhang C et al, 2010, Spyrou IM et al, 2009, Ibekwe AM et al, 2001) σε νερά (Dorigo U et al, 2009, Pesce S et al, 2009, Koutsotoli AD et al, 2005), σε φυτοπλακτόν (Lew S et al, 2010, Pesce S et al, 2008) και άλγη (Pesce S et al, 2009, Pesce S et al, 2008) καθώς και στη δυνατότητα αυτών να τα μεταβολίζουν (Cáceres T et al, 2010, Koutsotoli AD et al, 2005, MacRae IC., 1989).

Εντούτοις, καμία έρευνα δεν επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης των μυκητοκτόνων στις ιδιότητες των προβιοτικών των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Η παρούσα πειραματική εργασία καλείται να απαντήσει κατά ένα μέρος στο ερώτημα: *Τι γίνεται όταν ο ρύπος (επιλεγμένο μυκητοκτόνο) συνυπάρχει με τους λακτοβάκιλλους στα γαλακτοκομικά προϊόντα (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*).*

Κατ' αυτόν τον τρόπο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης ενός (1) επιλεγμένου σύγχρονου μυκητοκτόνου (Dodine) σε δυο (2) λακτοβάκιλλους του γάλακτος (*L. plantarum*, *L. paracasei*).



Το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο είναι προστατευτικό και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολυάριθμων ασθενειών στα σπυροφόρα, ακρόδρυα, λαχανικά και καλλωπιστικά, όπως π.χ. φουζάριο στα γαρύφαλλα, οΐδια στα κρεμμύδια κ.α. Είναι φυτοτοξικό στη ροδακινιά, δαμασκηλιά και αμπέλι. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να είναι φυτοτοξικό σε μηλιές Golden Delicious. Επίσης είναι ελαφρά φυτοτοξικό για λαχανικά και ανθοκομικά (www.lib.teiher.gr). Από το 1975 έχει απαγορευτεί η χρήση του σε καλλιέργειες με εδάδιμο το υπόγειο τμήμα εκτός από τις πατάτες (Τ. Αλμπάνης, 1997).

Είναι γνωστό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ότι σύμφωνα με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου στα πόσιμα νερά και τρόφιμα είναι 0.1 μg/L ενώ για το σύνολο των ενώσεων αυτών 0.5 μg/L.

Έτσι οι συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο (0.1 μg/L) και 10× (1.0 μg/L), 100× (10.0 μg/L) και 1000× (100.0 μg/L).

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου στην ανάπτυξη των *L. plantarum*, *L. paracasei*, τη μορφολογία τους, την ζύμωσή τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Επιλογή των προβιοτικών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων:

- Στέλεχος *Lactobacillus plantarum*,
- Στέλεχος *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* τα οποία απομονώθηκαν 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 άλμης παραδοσιακά παρασκευασμένο από αίγειο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου
- ↳ Τυρί «φέτα» παραδοσιακά παρασκευασμένο από πρόβειο γάλα προερχόμενο από ορεινές περιοχές της Ηπείρου.

3.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα

- ↳ Mann Rogosa and Sharpe (MRS) Agar(Oxoid)
- ↳ MRS broth
- ↳ Litmus milk medium (Fluka Biochemica)
- ↳ Triple Soya Broth (Oxoid)
- ↳ Trypticate Soy Broth (Oxoid) εμπλουτισμένο με Yeast Extract (TSYE)
- ↳ Brain heart infusion Broth

3.1.3. Χημικά αντιδραστήρια

- ↳ API 50 CHL Medium (API-BioMerieux, France)
- ↳ Υγρό ομογενοποίησης του δείγματος. Χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ομογενοποίησης το απεσταγμένο- αποστειρωμένο νερό.
- ↳ Methylene blue (0,1%) (Sigma)

3.1.4. Λοιπά υλικά

- ☞ Τρυβλία Petri χωρητικότητας 20ml μιας χρήσης
- ☞ Σιφόνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα για μικροβιολογική χρήση και χωρητικότητα από 1 ml έως 11 ml
- ☞ Ποτήρια ζέσης
- ☞ Φιάλες αραίωσης με βιδωτό πώμα βαθμολογημένες για όγκο 100ml
- ☞ Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10ml
- ☞ Πώματα από υδροφόρο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες
- ☞ Σωλήνες durham
- ☞ Φασματοφωτόμετρο
- ☞ Ζυγός ακριβείας με ευαισθησία 0,1 gr
- ☞ Ηλεκτρικός ομογενοποιητής τύπου Stomacher IYL (929/470/CE 2004)
- ☞ Επωαστικός θάλαμος
- ☞ Αυτόκαυστο
- ☞ Κυκλομίκτης

Χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία σε θερμοκρασία 2-4°C και καταψύκτες σε θερμοκρασία - 20 °C για την διατήρηση των διαφόρων αντιδραστηρίων, δειγμάτων, μικροοργανισμών, επιτραπέζια χρονόμετρα για την μέτρηση και πιστή τήρηση του χρόνου καθώς και συσκευή δημιουργίας απεσταγμένου- απιονισμένου νερού.

3.1.5. Επιλογή του μυκητοκτόνου

Χρησιμοποιήθηκε το μυκητοκτόνο Dodine ως αντιπροσωπευτικό της χημικής ομάδας στην οποία ανήκει και χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

3.1.6. Επιλογή των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου

Οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο σύμφωνα με τη νομοθεσία των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (0.1 µg/L) και 10×, 100× και 1000×. Δηλαδή διαλύματα των:

- 0.1 µg/L
- 1.0 µg/L
- 10.0 µg/L

□ 100.0 µg/L

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. «Καθαρισμός» των λακτοβακίλλων

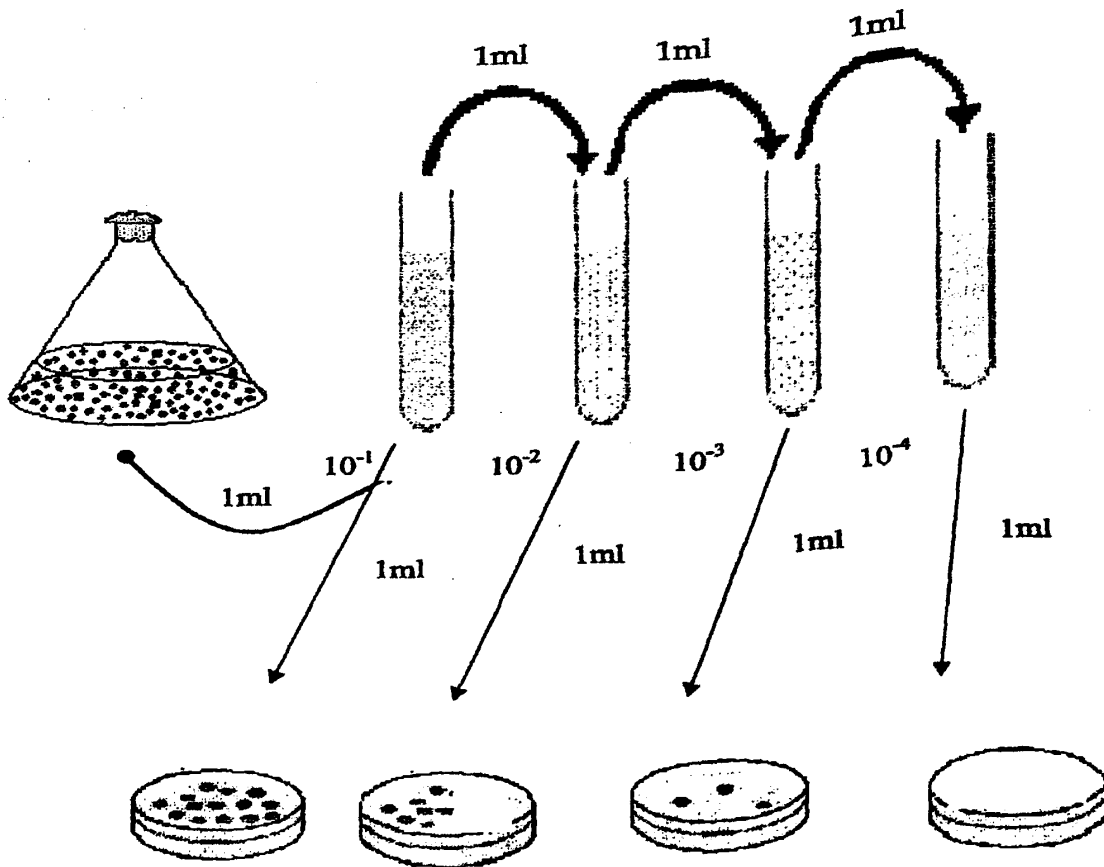
Για το «καθάρισμα» των λακτοβακίλλων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάπτυξης σε MRS agar δηλ. μεταφορά λακτοβακίλλων από τρυβλίο σε τρυβλίο και ανάπτυξη στους 37°C μέχρι να πετύχουμε καθαρότητα αποικίας 90%. Η επιβεβαίωση της καθαρότητας έγινε με την χρήση συστημάτων API 50 CHL Medium σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας API-BioMerieux, Vitek Inc. France). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τις δικλίδες της βάσης δεδομένων του συστήματος (Minitab version 12.0). Οι καθαρές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν την επομένη για το πειραματικό μέρος ενώ μέρος της διατηρήθηκε στο ψυγείο σε τρυβλία και στην κατάψυξη σε ζωμό Brain heart infusion Broth σε θερμοκρασία -20°C για μελλοντική τους χρήση.

4.2. «Σταντάρισμα» των λακτοβακίλλων

Το σταντάρισμα των λακτοβακίλλων έγινε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Μετά την επώαση συγκεκριμένου αριθμού λακτοβακίλλων και την ομογενοποίηση τους έγιναν οι δεκαδικές αραιώσεις (1:100, 1:1000 κ.λ.π.) με μεταφορά 1 ml σε γυάλινους σωλήνες που περιείχαν 9 ml MRS broth και τα αντίστοιχά τους τρυβλία. Πραγματοποιήθηκαν έτσι αραιώσεις μέχρι την 10⁻⁹ (εικόνα 6). Η μεταφορά της ποσότητας του δείγματος από τον ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον άλλο έγινε με το κατάλληλο ογκομετρικό σιφώνιο, με κατάλληλους χειρισμούς ώστε να μην έρθει σε επαφή με το αραιωτικό υγρό του δοκιμαστικού σωλήνα στο οποίο μεταφέρθηκε το υλικό του. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αμέσως μετά την μεταφορά του δείγματος από τον προηγούμενο ανακινήθηκε σε κυκλομίκτη. Όλες οι αραιώσεις παρασκευάστηκαν εντός χρόνου 15 min από τη στιγμή της ομογενοποίησης του δείγματος και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C.

Μετά από αρκετές δοκιμές έγινε το σταντάρισμα των λακτοβακίλλων στις 6-7 αποικίες για 24 ώρες στους 37°C σε MRS agar .





Εικόνα 6: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

4.3. Ετοιμασία των αραιώσεων του μυκητοκτόνου

Προετοιμάστηκαν stock διαλύματα των 100 $\mu\text{g/L}$ του επιλεγμένου μυκητοκτόνου με διάλυση αυτού σε αποστειρωμένο (αποστείρωση στα 15lb psi-121°C για 15 min) απεσταγμένο νερό.

Τα stock διαλύματα φυλάσσονταν στο σκοτάδι ενώ νέα διαλύματα ετοιμάζονταν όπου χρειάζονταν.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρασκευάστηκαν ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις των stock διαλυμάτων σε αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να δώσουν τις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 $\mu\text{g/L}$ και τοποθετήθηκαν σε φιάλες.

4.4. Βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη

1 ml σταθερής καλλιέργειας (όπως περιγράφηκε προηγουμένως) που αποτελούνταν από 10^8 cfu ml⁻¹ προστέθηκαν σε φιάλες που η κάθε μία περιείχε 99 ml διαλύματος μυκητοκτόνου.

Σαν control χρησιμοποιήθηκαν φιάλες που περιείχαν 99 ml αποστειρωμένου – απεσταγμένου νερού και 1 ml σταθερής καλλιέργειας των 10^8 cfu ml⁻¹.

Όλες οι φιάλες αναμείχθηκαν ζοηρά και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-22 °C).

Η ανάπτυξη προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (JenWay 6405 UV/Vis. Spectrophotometer)

Αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών (ώρα 0) και κατόπιν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μελετήθηκε η βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη του *L. paracasei* (0-24h.) (8 μέρες) και του *L. plantarum* (0-24h.) (7 μέρες) παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων του επιλεγμένου μυκητοκτόνου.

4.5. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων λακτοβακίλλων

Για το βακτηριακό χαρακτηρισμό (control και βακτηρίων παρουσία του διαλύματος μυκητοκτόνου) χρησιμοποιήθηκαν υλικά και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές εξετάσεις ρουτίνας σε δείγματα νερού και τροφίμων.

Μετά από κάθε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας λαμβάνονταν δείγματα από το διάλυμα του μυκητοκτόνου, τοποθετούνταν στο εκλεκτικό υλικό και επωάζονταν στους 37 °C για 24-48 h έτσι ώστε να μελετηθεί η μορφολογία των παραγόμενων αποικιών (μακροσκοπική εμφάνιση συμπεριλαμβανομένου του σχήματος του χρώματος και της υφής). Οι παραγόμενες αποικίες συγκρίνονταν με αυτές του control.

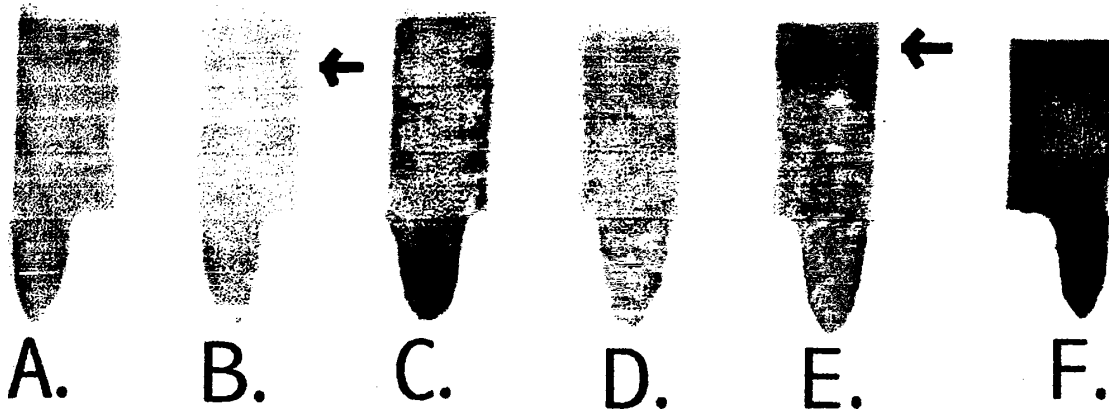
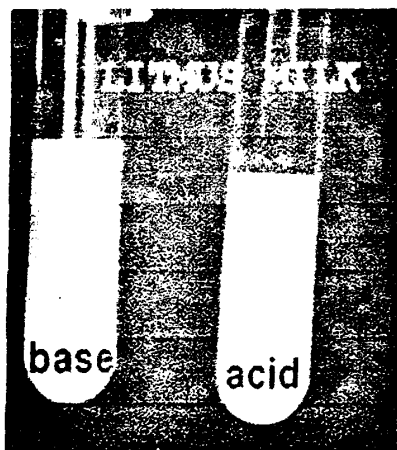
Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και για τους 2 λακτοβακίλλους ήταν το:

- MRS agar

4.6. Προσδιορισμός παραγωγής οξέως και πρόκλησης ζύμωσης

Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 50ml, που περιείχαν ως υπόστρωμα 10ml Litmus milk medium (Fluka Biochemica), το οποίο περιείχε Methylene Blue (0,1%), με ανεστραμμένο Durham σωλήνα, ενοφθαλμίστηκαν με ενεργοποιημένη καλλιέργεια των εξεταζόμενων στελεχών και επωάστηκαν στους 37°C για μία εβδομάδα. Καθημερινά μετρούνταν οι παρακάτω αντιδράσεις:

- ⊕ Παραγωγή οξέος με σχηματισμό κόκκινου χρώματος του υποστρώματος
- ⊕ Αναγωγή του δείκτη με αποχρωματισμό του υποστρώματος
- ⊕ Όξινη πήξη, από την παρουσία συμπαγούς ροζ πηγματος το οποίο δεν συστέλλεται και διαλύεται στα αλκάλια
- ⊕ «θυελλώδης ζύμωση» με την δημιουργία όξινης πηξης, το σχηματισμό πηγματος και την παραγωγή αερίου (εικόνα 7)



- A. Acid/Reduction/Curd
- B. Reduction/Curd (arrow denotes gas pocket)
- C. Μη εμβολιασμένο control

- D. Οξεία αντίδραση
- E. Πρωτεόλυση της καζεΐνης
- F. Αλκαλική αντίδραση

Εικόνα 7 : Τα είδη της ζύμωσης.

4.7. Στατιστική επεξεργασία

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές διαλύματος μυκητοκτόνου. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του επιλεγμένου μυκητοκτόνου στους λακτοβακίλλους πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων τιμών OD για κάθε χρονική στιγμή και για κάθε συγκέντρωση με τις αντίστοιχες μέσες τιμές OD του control. Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το EXCEL. Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο $P \leq 0,05$. Όλες οι πειραματικές μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Σημείωση: Πριν την εκτέλεση του τελικού πειράματος έγινε μια δοκιμαστική εκτέλεση όλου του πειράματος χρησιμοποιώντας μόνο το control προκειμένου να βρεθούν και να βελτιωθούν τυχόν ελλείψεις, παραλείψεις και σφάλματα.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Πίνακες ανάπτυξης λακτοβακίλλων

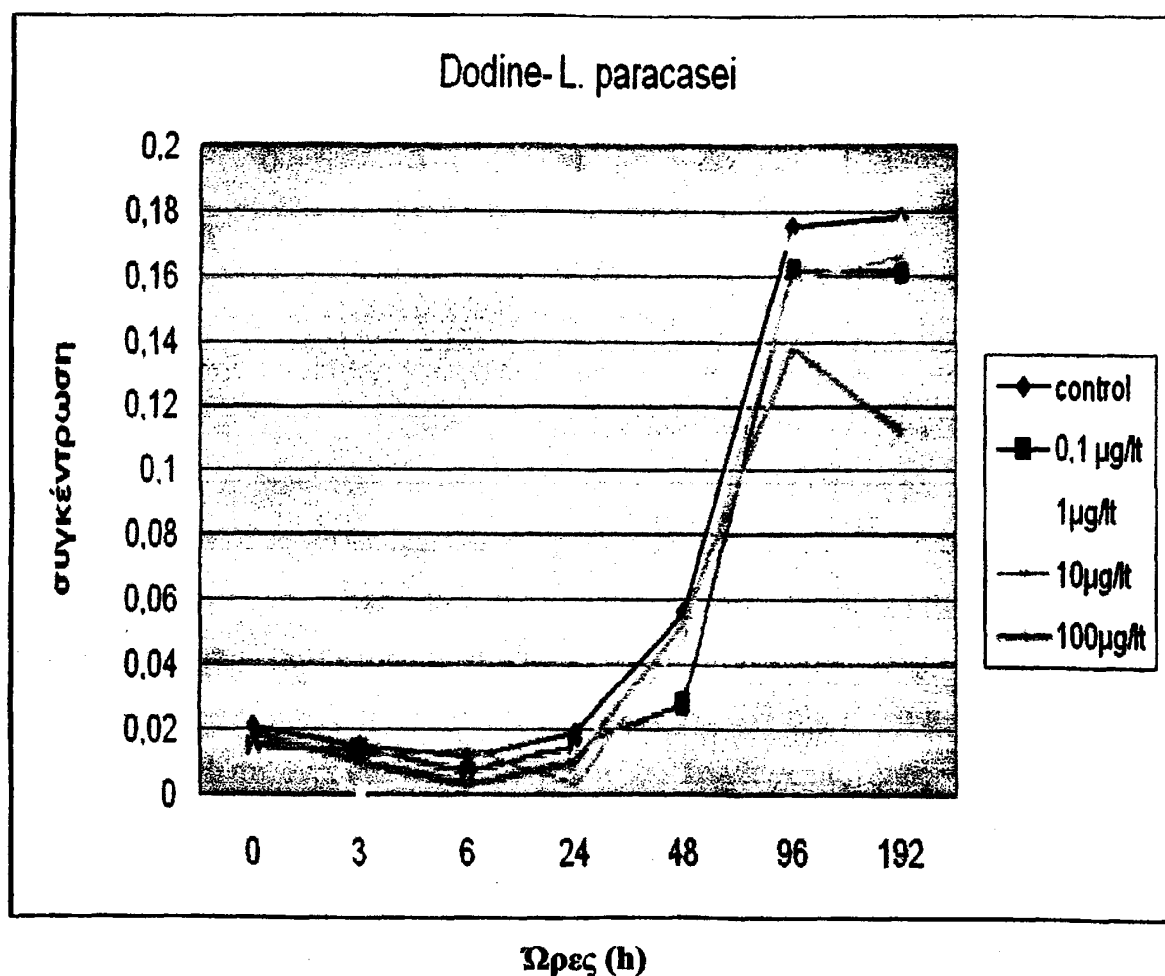
L. paracasei (M.O.) – Dodine

	<i>Control</i>	<i>0,1</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>100</i>
<i>0(h)</i>	0,021	0,015	0,013	0,018	0,019
<i>3</i>	0,015	0,014	0,002	0,012	0,010
<i>6</i>	0,012	0,007	0,004	0,014	0,003
<i>24</i>	0,019	0,015	0,013	0,003	0,010
<i>48</i>	0,056	0,028	0,052	0,048	0,053
<i>96</i>	0,175	0,162	0,171	0,159	0,138
<i>192</i>	0,178	0,161	0,177	0,166	0,112

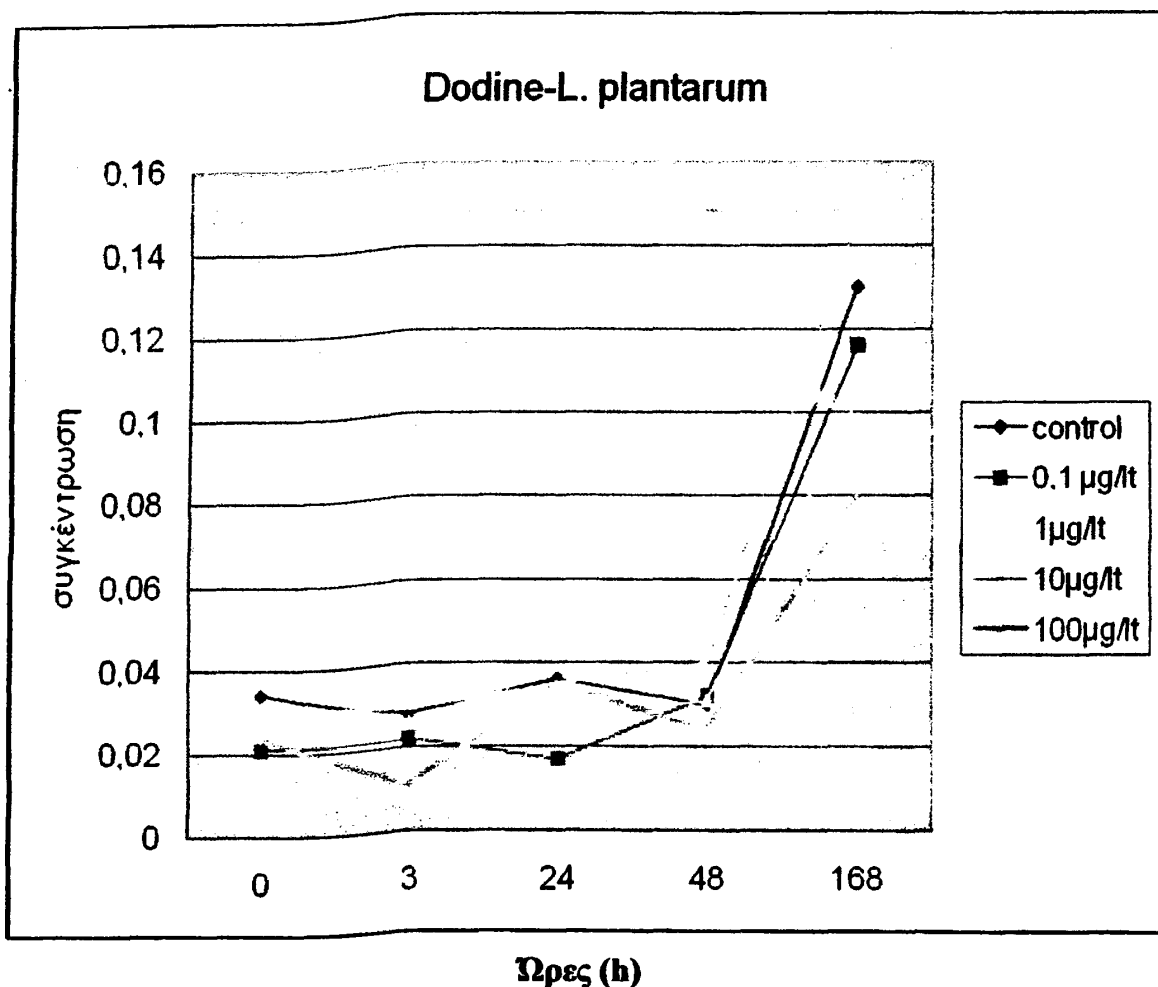
L. plantarum (M.O.) – Dodine

	Control	0,1	1	10	100
0(h)	0,034	0,021	0,031	0,032	0,024
3	0,028	0,022	0,026	0,029	0,011
24	0,036	0,017	0,027	0,035	0,035
48	0,030	0,032	0,031	0,040	0,024
168	0,130	0,116	0,103	0,147	0,080

Οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο λακτοβακίλλων παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα (σχήμα 1, σχήμα 2):



Σχήμα 1: Ανάπτυξη *L. paracasei* παρουσία Dodine



Σχήμα 2: Ανάπτυξη *L. plantarum* παρουσία Dodine

Από την καμπύλη ανάπτυξης του *L. paracasei* παρουσία του Dodine παρατηρούμε τις πρώτες 3 ώρες μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση της ανάπτυξης του *L. paracasei* σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με το control, εκτός της 0,1 µg/l, όπου παρατηρείται μια ελάχιστη αύξηση του OD, με αποτέλεσμα την 3^η ώρα να παίρνει την ίδια τιμή με αυτή του control. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στην συγκέντρωση 1 µg/l.

Από την 3^η μέχρι την 6^η ώρα η ανάπτυξη του OD της 10 µg/l ξεπερνάει αυτήν του control ενώ αυξάνει και η συγκέντρωση του 1 µg/l χωρίς όμως να ξεπερνάει την συγκέντρωση του control. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$).

Από την 6^η μέχρι την 24^η ώρα έχουμε μια αύξηση όλων των συγκεντρώσεων χωρίς όμως να ξεπερνάνε την αύξηση του control εκτός της συγκέντρωσης 10 µg/l όπου παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$).

Από την 24^η μέχρι την 48^η ώρα παρατηρείται αύξηση της ανάπτυξης όλων των συγκεντρώσεων με την πιο μικρή ανάπτυξη να παρατηρείται στην συγκέντρωση

0,1 µg/lit. Αυτή η αύξηση παρατηρείται μέχρι την 96^η ώρα ακόμη και στην συγκέντρωση 0,1 µg/lit με μια διαφορά στην ανάπτυξη της συγκέντρωσης 100 σε σχέση με τις άλλες συγκεντρώσεις ($p < 0.05$).

Τέλος, μέχρι την 192^η ώρα παρατηρείται μια ελαφριά αύξηση της ανάπτυξης του control και των συγκεντρώσεων 1 και 10µg/lit, μια ελάχιστη μείωση στην ανάπτυξη της συγκέντρωσης 0,1 µg/lit και μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση στην συγκέντρωση 100µg/lit. Η αύξηση της ανάπτυξης όλων των συγκεντρώσεων σε καμία μέτρηση δεν ξεπέρασε αυτήν του control εκτός από την συγκέντρωση 10µg/lit την 6^η ώρα.

Από την καμπύλη ανάπτυξης του *L. plantarum* παρουσία του Dodine παρατηρούμε τις τρεις πρώτες ώρες μια μείωση στην ανάπτυξη των συγκεντρώσεων του control, της 1 µg/lit και μια ακόμη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης 100µg/lit. Εν αντιθέσει παρατηρούμε μια ελάχιστη αύξηση του OD της 0,1 και μια αύξηση της συγκέντρωσης 10 που ξεπερνάει αυτήν του control ($p < 0.05$).

Από την 3^η μέχρι την 24^η ώρα παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) αύξηση της συγκέντρωσης 100 όπου το OD παίρνει την ίδια τιμή με το control. Παρατηρείται επίσης αύξηση του OD της 10 ενώ μείωση παρατηρείται στις συγκεντρώσεις 1 και 0,1.

Από την 24^η μέχρι την 48^η ώρα έχουμε μια πτώση της ανάπτυξης του control. Αυτή η πτώση παρατηρείται και στην συγκέντρωση 100. Αξιοσημείωτη είναι η στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) ανάπτυξη της συγκέντρωσης 10 όπου ξεπερνάει αυτήν του control και κορυφώνεται την 168^η ώρα με την μέγιστη ανάπτυξη της και των συγκεντρώσεων 1 και 0,1 όπου το OD παίρνει την ίδια τιμή με αυτό του control.

Την 168^η ώρα η 10µg/lit βρίσκεται στην μέγιστη ανάπτυξη της ενώ αύξηση παρατηρείται σε όλες τις συγκεντρώσεις με μικρότερη ανάπτυξη αυτήν του 100µg/lit ($p < 0.05$).

5.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Η μορφολογία των αποικιών του *L. paracasei* αρχικά ήταν τυπικές και είχαν χρώμα κίτρινο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία του *L. paracasei* του control δεν παρουσίασε καμία αλλαγή.

Εντούτοις, παρουσιάστηκαν αλλαγές στη μορφολογία του *L. paracasei* που απομονώθηκε από τα διαλύματα dodine. Οι αποικίες του *L. paracasei* που



εμφανίζονταν ήταν μικρότερες σε μέγεθος και πιο αχνές στο χρώμα σε όλες τις συγκεντρώσεις στις πρώτες 3 και 6 ώρες μέτρησης. Στις 24 ώρες οι διαφορές είναι μηδαμινές, καμία αλλαγή στο χρώμα ή στο μέγεθος σε σχέση με το control. Στις 48 ώρες στις συγκέντρωσεις 10 και 100 παρατηρούνται μερικές αποικίες μεγαλύτερες και με πιο έντονο κίτρινο χρώμα σε σχέση με τις αποικίες του control ενώ στην συγκέντρωση 0,1 και 1 δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος αλλά μερικές αποικίες μεγαλύτερες σε μέγεθος σε σχέση με αυτές του control.. Στις 96 και 192 ώρες επιμένει ο σχηματισμός μεγαλύτερων και πιο έντονα κίτρινων αποικιών στις συγκεντρώσεις 10 και 100 και η «δειλή» εμφάνιση τέτοιων αποικιών και στις συγκεντρώσεις 0,1 και 1. Τα ίδια αποτελέσματα βρέθηκαν και στις συγκεντρώσεις του *L. plantarum*. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή χρώματος π.χ. από κίτρινο σε κόκκινο σε καμία συγκέντρωση.

5.3. ΖΥΜΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ *L. PARACASEI*

Η μέτρηση της διαδικασίας της ζύμωσης έγινε σε υπόστρωμα Litmus milk medium όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Σε όλες τις συγκεντρώσεις το αρχικό broth είχε χρώμα μοβ όπως το πρότυπο της εικόνας 4 (C). Αφού έγινε ο εμβολιασμός έγινε καθημερινή καταγραφή της διαδικασίας της ζύμωσης, έχοντας σαν πρότυπο τη εικόνα 4, για μία εβδομάδα ως εξής:

- Την πρώτη ημέρα μετά τον εμβολιασμό σε όλες τις συγκεντρώσεις διατηρήθηκε το μοβ χρώμα. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή χρώματος και κανένας σχηματισμός ιζήματος.
- Την δεύτερη μέρα των παρατηρήσεων το μοβ χρώμα παρέμεινε σε όλες τις συγκεντρώσεις. Δεν καταγράφηκε ακόμη κανένας σχηματισμός ιζήματος ή αλλαγή χρώματος.
- Την τρίτη μέρα άρχισε η αλλαγή χρώματος από μοβ σε μπλε σκούρο στην συγκέντρωση 100 σύμφωνα με τα πρότυπα της εικόνας 7 (base) και σύμφωνα με το control του πειράματος δηλ. η δημιουργία βασικής αντίδρασης. Στις άλλες συγκεντρώσεις το μοβ χρώμα διατηρήθηκε.

- Την τέταρτη ημέρα αρχίζει ο σχηματισμός ιζήματος στην συγκέντρωση 100. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε! Στις άλλες συγκεντρώσεις έχουμε αλλαγή χρώματος από μοβ σε μπλε σκούρο.
- Την πέμπτη μέρα το ίζημα παραμένει στην 100 συγκέντρωση. Στις άλλες συγκεντρώσεις άρχισε ο «δειλός» σχηματισμός ιζήματος ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή χρώματος.
- Την έκτη μέρα είχαμε δημιουργία ιζήματος σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.
- Την έβδομη μέρα έχουμε ολοκλήρωση ζύμωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Για μια βδομάδα δεν παρατηρήθηκε καμία παραγωγή αερίου σε καμία συγκέντρωση. Η αντίδραση ήταν βασική σε όλες τις συγκεντρώσεις. Επίσης το ίζημα που σχηματίστηκε ήταν σύμφωνα με το πρότυπο της εικόνας 7 (curd) και δεν κάλυπτε τα δύο τρίτα της επιφάνειας του σωλήνα (acid curd) σε καμία συγκέντρωση. Δημιουργία αντιδράσεων A., B., D., E., και F. σύμφωνα με τα πρότυπα της εικόνας 4 δεν παρατηρήθηκαν σε καμία συγκέντρωση. Δεν παρατηρήθηκε επίσης παραγωγή οξέως, ούτε όξινη πήξη, ούτε «θυελλώδης» ζύμωση, δηλ καμία μεταβολή στα χαρακτηριστικά της ζύμωσης.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μικροβιολογία είναι μια επιστήμη που καλύπτει ένα μεγάλο φάσμα οργανισμών τόσο σε μορφολογία όσο και σε μέγεθος. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού στο φυσικό περιβάλλον και για την διατροφή, αναπαραγωγή και ανάπτυξή τους χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά από πολλές πηγές (Μ Παπαπετροπούλου, 2001, Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, 2000).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν προβιοτικούς μικροοργανισμούς έχουν να κάνουν με μετα-αναλύσεις και τυχαιοποιημένες έρευνες για τα οφέλη τους σε διάφορες ασθένειες (Sang LX et al, 2010, de Moreno de Leblanc A and Perdigon G., 2010, Shen J et al, 2009, Zigra PI et al, 2007, Sazawal S et al, 2006, Agerholm-Larsen L et al, 2000). Σε πειραματικό επίπεδο οι έρευνες επικεντρώθηκαν περισσότερο στην

αντιμικροβιακό ρόλο μερικών στελεχών προβιοτικών και των προϊόντων τους (Marianelli C et al, 2010, Malago JJ et al, 2010, Zhu Y et al, 2010, Βάσσος Δ., διδακτορική διατριβή) και στην μελέτη τους σαν starters στην αλκοολική (Capozzi V., et al, 2010, Yoo KS et al, 2010, Rodríguez ME et al, 2010, Ciani M, et al, 2010, Giraffa G et al, 2001) και γαλακτική ζύμωση (Minervini F et al, 2009, Giraffa G et al, 2001).

Η κατανόηση της συμπεριφοράς των λακτοβάκιλλων στους χημικούς ρύπους μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για εκείνους που ασχολούνται με τα προϊόντα ζύμωσης γάλακτος καθώς προκύπτουν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση από φυτοφάρμακα στην ανάπτυξή τους και στην ιδιότητα της ζύμωσης.

Μέχρι στιγμής δεν έγινε καμία έρευνα όσον αφορά τις επιδράσεις των φυτοφαρμάκων σε προβιοτικούς μικροοργανισμούς των γαλακτοκομικών για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε ή να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα όσον αφορά τις αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη ή την «πρόωρη» ζύμωση που προέκυψε στην 100 συγκέντρωση. Παρόμοιες μελέτες που έγιναν σε δείκτες μόλυνσης υδάτων τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι η καταμέτρηση των μικροβιακών δεικτών μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να επηρεαστεί δραματικά από την παρουσία κάποιου στρεσογόνου παράγοντα είτε αναστέλλοντας είτε παρατείνοντας την ανάπτυξη τους (Balague C et al, 2010, Koutsotoli AD et al, 2005, Yurovskaya EM, 1975). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υπολογισμοί βάσει της καταμέτρησης τους να μας δίνουν λανθασμένες εκτιμήσεις.

Σε επίπεδο φυτοφαρμάκων και προβιοτικών όλες οι μελέτες που έγιναν αφορούν την αλκοολική ζύμωση στο κρασί. Συγκεκριμένα μία έρευνα μελετάει την πορεία επτά μυκητοκτόνων και τριών εντομοκτόνων κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του κρασιού (Ruediger GA et al, 2005). Μία άλλη μελέτη ερευνά την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων στην ATP δραστηριότητα του *Oenococcus oeni* όπου αποδεικνύει ότι το φυτοφάρμακο copper hydroxide μειώνει την συγκεκριμένη δραστηριότητα (Careté R et al, 2002).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μας έδωσαν πληροφορίες για την επίδραση ενός επιλεγμένου σύγχρονου μυκητοκτόνου του Dodine σε δύο λακτοβάκιλλους τους *L. plantarum* και *L. paracasei* και συγκεκριμένα στην ανάπτυξη τους, τη μορφολογία τους και την ζυμωτική ικανότητα.

Οι *L. plantarum* και *L. paracasei* επιλέχθηκαν ως οι αντιπροσωπευτικότεροι λακτοβάκιλλοι με αντιμικροβιακή δράση που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά



προϊόντα. Αποτελούν φυσική χλωρίδα πολλών προϊόντων ζύμωσης γάλακτος και χρησιμοποιούνται από εργαστήρια βιομηχανιών γάλακτος για «πήξη» γιαουρτιού και τυριού.

Οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου σύμφωνα με την νομοθεσία χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης δηλαδή το 0.1 µg/L το δεκαπλάσιο δηλαδή 1.0 µg/L, το εκατονταπλάσιο δηλαδή 10.0 µg/L και χίλιες φορές το 0.1 µg/L δηλαδή 100.0 µg/L.

6.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Αρκετές έρευνες έγιναν πάνω στην μελέτη της επίδρασης της έκθεσης των οργανισμών στα παρασιτοκτόνα, ιδιαίτερα στους ανώτερους οργανισμούς της τροφικής αλυσίδας (Nieradko-Iwanicka B and Borzecki A., 2010, Preuss TG et al, 2010, Huang QY et al, 2010, Jones DK et al, 2010, Jin M et al, 2010, Ferrari A, et al, 2010, Qualls WA et al, 2010, Olszyk D et al, 2010, Carpenter D and Boutin C, 2010, Ates U et al, 2009, Beketov MA and Liess M., 2008, Huang J et al, 1998). Όσον όμως αφορά σε χαμηλότερους οργανισμούς της τροφικής αλυσίδας οι έρευνες είναι περιορισμένες (Debenest T et al, 2010, Bernal MH et al, 2009). Ιδιαίτερα στα βακτήρια οι μελέτες είναι ελάχιστες.

Μία μελέτη επίδρασης φυτοφαρμάκου στην ανάπτυξη μικροοργανισμών έγινε από την ερευνητική ομάδα του Cus. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση του rygimethanil στην ανάπτυξη των μαγιών *Hanseniaspora uvarum* και *Saccharomyces cerevisiae* του κρασιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο είχε επιδράσεις και συγκεκριμένα μείωσε την ανάπτυξη των μαγιών (Cus F and Raspor P., 2008). Μία άλλη έρευνα μελέτησε την επίδραση 5 μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη σακχαρομυκήτων και μη σακχαρομυκήτων του κρασιού όπου έδειξε ότι όλα τα μυκητοκτόνα είχαν πάλι αρνητικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη των μαγιών (Calhelha RC et al, 2006).

Στον τομέα των προβιοτικών του γάλακτος μία μελέτη ερευνά την σχέση του Chlorinated Hydrocarbon εντομοκτόνου και των προβιοτικών *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, και *Lactobacillus casei* όπου

έδειξε ότι δεν υπήρξε ένδειξη απορρόφησης ή χημικής αντίδρασης των προβιοτικών με το συγκεκριμένο εντομοκτόνο (Sun C. Kim and L.G. Harmon, 1970).

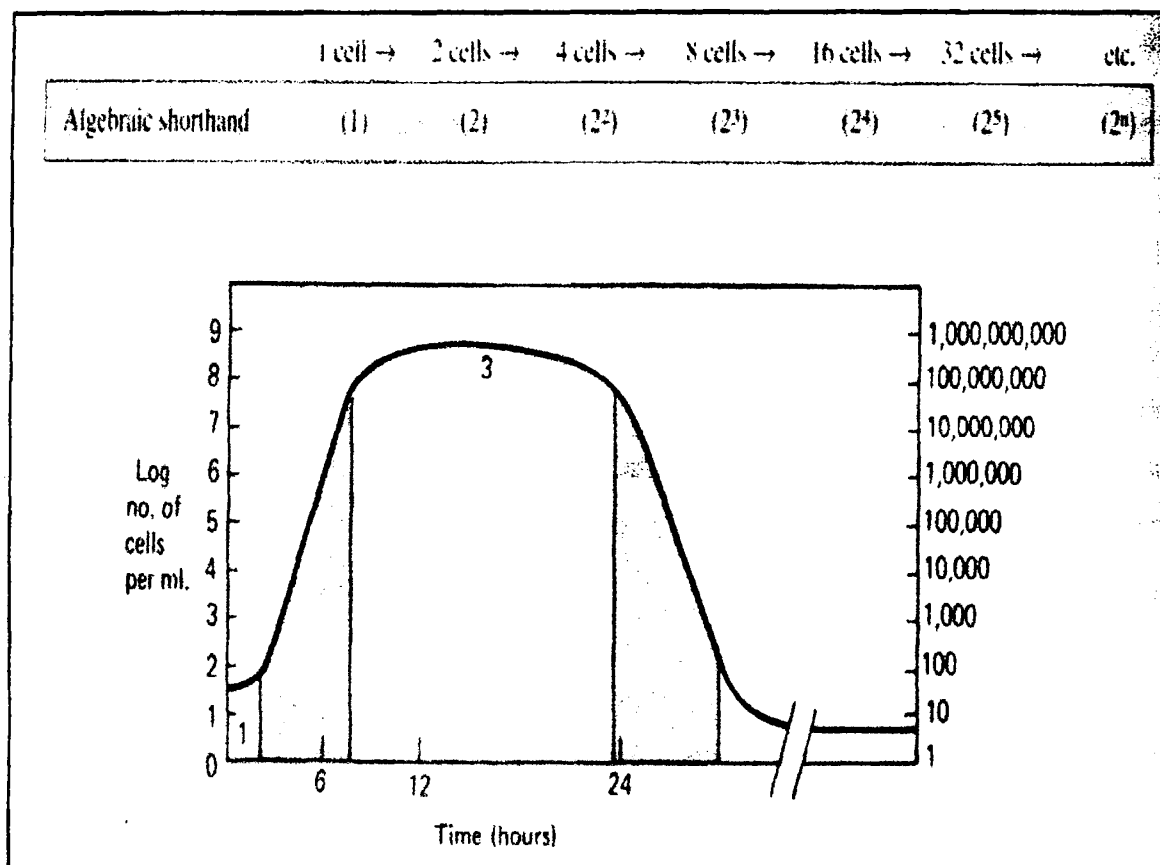
Μία ξαφνική έκθεση μικροοργανισμών σε παρασιτοκτόνα μπορεί να έχει αξιοσημείωτη επίδραση.

Γενικά η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακολουθεί μια καμπύλη την λεγόμενη καμπύλη ανάπτυξης που απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα) (σχήμα 3):

(<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/microsites>

<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/index.html>

<http://cw.prenhall.com/bookbind/pubbooks/brock/>)



Σχήμα 3: Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η μορφή της παραπάνω καμπύλης έχει τέσσερις διακριτές περιοχές:

➤ Φάση προσαρμογής (*Lag phase*)

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Αν και τα κύτταρα στην φάση αυτή δεν

διαίρονται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, τα κύτταρα συνθέτουν νέα συστατικά. Το στάδιο αυτό πριν την έναρξη της διαδικασίας διαίρεσης των κυττάρων είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή στην διαφορετική σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η ανάγκη ανάπτυξης ενζύμων για τον μεταβολισμό των θρεπτικών κλπ. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από την «κατάσταση» στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, την φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου, τον όγκο του εμβολίου κλπ. Η φάση προσαρμογής είναι εκτενής όταν το εμβόλιο που χρησιμοποιείται είναι παλιό (γερασμένο), ή όταν το θρεπτικό μέσο αποτελείται από καθαρά χημικές ενώσεις. Αντίθετα, όταν το εμβόλιο προέρχεται από καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας είναι όμοια με αυτή του εμβολίου τότε η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη σε διάρκεια.

➤ *Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase)*

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή χωρίς να παρατηρείται απότομη βηματική αύξηση.

➤ *Φάση στασιμότητας (Stationary phase)*

Μετά το πέρας της εκθετικής φάσης η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη ανάπτυξης γίνεται οριζόντια. Στην φάση στασιμότητας ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Η φάση στασιμότητας παρατηρείται στην βακτηριακή ανάπτυξη όταν ο πληθυσμός των κυττάρων είναι περίπου 10^9 ανά mL ενώ στα πρωτόζωα και στα φύκη η τιμή αυτή φθάνει περίπου 10^6 ανά mL.

Ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στην φάση στασιμότητας για διάφορους λόγους. Ένας προφανής λόγος είναι η έλλειψη των θρεπτικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού θρεπτικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης διότι το οξυγόνο έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν επαρκεί για να διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Η



ανάπτυξη των κυττάρων δύναται επίσης να σταματήσει λόγω της συσσώρευσης «τοξικών» μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης.

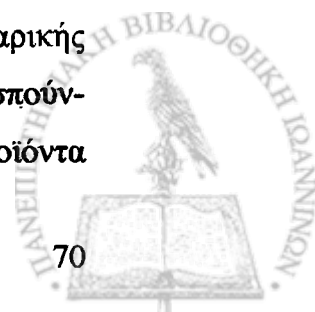
Για παράδειγμα οι λακτοβάκιλλοι μπορεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα να μειωθεί το pH του διαλύματος και να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη.

☛ Φάση θανάτου (Death phase)

Η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των «τοξικών» συστατικών στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων όπως και η ανάπτυξη είναι συνήθως λογαριθμική δηλαδή σταθερό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται κάθε ώρα. Αυτή η σχέση ισχύει ακόμη και όταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός εξαιτίας της μη λύσης των νεκρών κυττάρων.

Συγκρίνοντας τις καμπύλες ανάπτυξης των *L. paracasei* και *L. plantarum* παρουσία του Dodine με την παραπάνω καμπύλη βλέπουμε ότι η ανάπτυξη παρουσία φυτοφαρμάκου ακολουθεί το πρότυπο της παραπάνω καμπύλης στα αρχικά στάδια της, δηλ. μέχρι το στάδιο της φάσης στασιμότητας, τόσο στο control όσο και στις διάφορες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι γενικά η παρουσία του μυκητοκτόνου δεν σταματά την ανάπτυξη του *L. paracasei* και του *L. plantarum* αλλά την περιορίζει ελάχιστα σε σχέση με το control και η ανάπτυξή τους συνεχίζεται και παρουσία του φυτοφαρμάκου. Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων και του control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των 2 μελετών στις ζύμες του κρασιού που έδειξαν ότι η παρουσία φυτοφαρμάκων περιορίζει την ανάπτυξή τους όχι όμως και με τα αποτελέσματα στα προβιοτικά του γάλακτος όπου δεν παρουσιάζεται καμία επίδραση. Βέβαια οι συγκεκριμένες μελέτες εξετάζουν άλλους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιούν άλλα φυτοφάρμακα και όχι το Dodine.

Άλλες μελέτες απέδειξαν ότι φυτοφάρμακα μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών και σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα παθογόνων (Ng PJ et al, 2005). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί με μία αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διασπούν-αποικοδομούν φυτοφάρμακα με σκοπό να χρησιμοποιήσουν αυτά ή τα προϊόντα



διάσπασης αυτών ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (Hang M et al, 2001, Karaeva N., 1988). Φαίνεται πως το ίδιο συμβαίνει και με τους λακτοβάκιλλους και ίσως και με άλλα προβιοτικά όπως π.χ. στρεπτόκοκκοι ή bifidoβακτήρια.

Μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε και στην ικανότητα των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων να διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο με επακόλουθο την κατόπιν προσαρμογή του μικροοργανισμού στο φυτοφάρμακο (Breazeale FW et al, 1972)

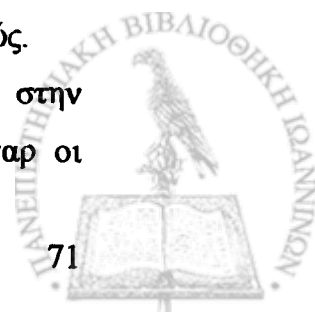
Έτσι μία πιθανή εξήγηση για την ανάπτυξη που εμφανίζουν οι *L. paracasei*, *L. plantarum* παρουσία του επιλεγμένου μυκητοκτόνου θα ήταν η ικανότητα του μυκητοκτόνου να διεισδύει στο βακτηριακό κύτταρο καθώς και η ικανότητα του τελευταίου να αναπτύσσει μηχανισμούς με σκοπό την διάσπαση και χρησιμοποίηση του ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών.

6.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Μια αρκετά σημαντική παρατήρηση επίσης αφορούσε την αλλαγή στην μορφολογία των αποικιών των συγκεντρώσεων σε σχέση με το control στο εκλεκτικό υλικό. Οι αλλαγές αυτές είχαν να κάνουν τόσο με το σχήμα όσο και με το χρώμα των αποικιών.

Μελέτες απέδειξαν ότι σε πολλές περιπτώσεις κατά την απομόνωση μικροοργανισμών από το περιβάλλον παρατηρείται εμφάνιση άτυπων αποικιών, δηλαδή αποικιών με διαφορετικά χαρακτηριστικά, στα εκλεκτικά υλικά (π.χ. χρώμα, σχήμα) (Α. Κουτσοτόλη, Διδακτορική Διατριβή, 2007, Koutsotoli et al, 2006, Rompre A et al, 2002). Μία άλλη έρευνα του Rychert και Stephenson στις ΗΠΑ, έδειξε ότι κατά την απομόνωση κολοβακτηριδίων κοπρανόδους προέλευσης από υδάτινα περιβάλλοντα, με τη μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης και τη χρησιμοποίηση mFC άγαρ, παρατηρήθηκαν άτυπες αποικίες *E. coli* σε ποσοστό μάλιστα μεγαλύτερο του 80% (Rychert RC and Stephenson GR, 1981). Όσον αφορά τα προβιοτικά δεν έγινε καμία μελέτη που να εξετάζει τις αλλαγές στην μορφολογία τους παρουσία φυτοφαρμάκων. Πιθανότατα τα συμπεράσματα στην αλλαγή της μορφολογίας να είναι ίδια με εκείνα των ερευνητών σε άλλους μικροοργανισμούς.

Στη δική μας περίπτωση οι λακτοβάκιλλοι παρουσίασαν αλλαγές στην μορφολογία τους και λίγο στο χρώμα τους. Χρησιμοποιώντας το MRS άγαρ οι

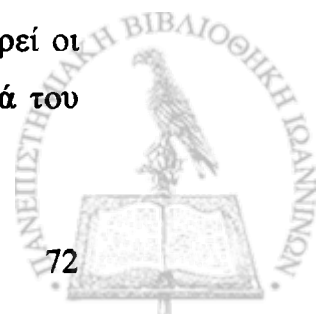


αποικίες εμφανίζονταν πιο μεγάλες και πιο κίτρινες σε σχέση με το control. Πιθανή χρησιμοποίηση τεστ API για ταυτοποίηση των συγκεκριμένων στελεχών με την χρωματική αλλαγή ίσως να οδηγούσε σε πιθανή μετατόπιση του είδους του λακτοβακίλλου όπως έγινε και στην περίπτωση της έρευνας της κ. Κουτσοτόλη (Κουτσοτόλη Α., Διδακτορική διατριβή, 2007) που η ταυτοποίηση των στελεχών με διαφορετικό χρώμα και μέγεθος έδειξε αλλαγή του βιοχημικού προφίλ και την μετατόπιση της *E.coli* και του *E. faecalis* σε άλλα είδη σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα και συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν όπου έχουν δείξει μορφολογικές αλλαγές σε αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από διαλύματα φυτοφαρμάκων (Jilani S. and Altaf Khan, 2004). Δεν παύουν όμως να αποτελούν έκπληξη εφόσον το υλικό που χρησιμοποιήθηκε θεωρείται εκλεκτικό για την καλλιέργεια των λακτοβακίλλων και χρησιμοποιείται σε εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές αναλύσεις ρουτίνας για την απομόνωση και καλλιέργεια προβιοτικών.

Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ουσίες που σταματούν την ανάπτυξη και δράση των μυκήτων στα φυτά. Βλέπουμε όμως ότι δεν περιορίζουν την δράση όλων των μικροβίων πάρα μόνο των μυκήτων καθώς στην προκειμένη περίπτωση η παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου δεν εμπόδισε την εμφάνιση των λακτοβακίλλων στο στερεό μέσον ακόμη και στην υψηλότερη συγκέντρωση. Εν αντιθέση «ευνόησε» την εμφάνισή τους καθώς το μέγεθος των αποικιών στις συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου ήταν μεγαλύτερο από αυτό του control.

Γνωρίζουμε ότι οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν σε ένα στερεό υπόστρωμα χρειάζονται τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά. Η ανάπτυξη των λακτοβακίλλων γίνεται με ενοφθαλμισμό του στερεού υποστρώματος με λακτοβάκιλλο και τοποθέτησή του σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες. Την επομένη έχουμε ανάπτυξη αποικιών στο τρυβλίο. Στην παρούσα εργασία η ανάπτυξη των λακτοβακίλλων σε όλες τις συγκεντρώσεις έγινε κανονικά την επομένη. Δεν παρατηρήθηκε καθυστέρηση εμφάνισης ή καθόλου εμφάνιση σε καμία συγκέντρωση. Προφανώς οι λακτοβάκιλλοι να χρησιμοποίησαν κάποια ουσία του μυκητοκτόνου ως θρεπτικό συστατικό σε συνδυασμό με τα συστατικά του MRS και να αναπτύχθηκαν στο στερεό υπόστρωμα. Μία άλλη εξήγηση είναι ότι μπορεί οι ουσίες του μυκητοκτόνου να μην επηρέασαν καθόλου τα θρεπτικά συστατικά του MRS και έτσι να αναπτύχθηκαν οι λακτοβάκιλλοι.



Το γεγονός ότι οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία μυκητοκτόνων σημαίνει ότι στα γαλακτοκομικά προϊόντα η ανάπτυξή τους δεν περιορίζεται ακόμη και αν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου. Ίσως αυτό να συμβαίνει και με την παρουσία άλλων φυτοφαρμάκων. Προτείνεται μια παραπέρα έρευνα σε αυτόν τον τομέα σε περισσότερους λακτοβάκιλλους και με περισσότερα φυτοφάρμακα για να έχουμε μια πιο σαφή εικόνα της κατάστασης. Μπορεί η πορεία της έρευνας να δείξει ότι υπάρχουν κάποια φυτοφάρμακα που όντως να επηρεάζουν την ανάπτυξη κάποιων προβιοτικών.

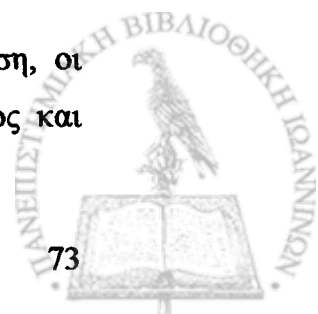
Πρέπει να γίνει επίσης περαιτέρω έρευνα με τεστ API προκειμένου να βγάλουμε συμπεράσματα για το αν έγινε βιοχημική αλλαγή στους λακτοβάκιλλους ή όχι. Το πιο έντονο κίτρινο χρώμα που εμφανίστηκε σε μερικές συγκεντρώσεις ίσως σημαίνει μια βιοχημική αλλαγή των λακτοβακίλλων όπως έγινε και στην έρευνα της κ. Κουτσοτόλη. Βιοχημική αλλαγή σημαίνει πιθανή «μετάλλαξη» του είδους και άλλη ταυτοποίηση στο τεστ API. Αποτυχία στην προσμέτρηση των άτυπων αποικιών με τεστ API θα είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά λάθη στην εκτίμηση των ειδών των λακτοβακίλλων που υπάρχουν σε ένα γαλακτοκομικό προϊόν.

6.3. ΖΥΜΩΣΗ

Η ζύμωση θεωρείται από τις πιο χρήσιμες ιδιότητες των λακτοβάκιλλων καθώς μέσω αυτής παράγονται τα προϊόντα ζύμωσης γάλακτος. Ζύμωση εννοείται η διαδικασία παραγωγής ενέργειας κατά τη μετατροπή μιας ή περισσότερων οργανικών ενώσεων, όπως είναι οι υδρογονάνθρακες, σε ένα οξύ ή μια αλκοόλη. Ειδικότερα, ο όρος ζύμωση αναφέρεται στη χρήση μιας ειδικής κατηγορίας μυκήτων (τους λεγόμενους "ζυμομύκητες") για τη μετατροπή ενός σακχάρου (είδος υδρογονάνθρακα) σε αλκοόλη ή στη χρήση βακτηρίων για την παραγωγή γαλακτικού οξέως σε ορισμένα τρόφιμα. Έτσι, η δημιουργία άρτου και αλκοολούχων ποτών όπως το κρασί και η μπίρα, γίνεται με ζύμωση.

Κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, η ζύμωση πραγματοποιείται αυθόρμητα σε διάφορες τροφές. Πρόκειται για μια διαδικασία που εδώ και χιλιάδες χρόνια οι άνθρωποι εκμεταλλεύτηκαν, ευνοώντας την πραγματοποίησή της (wikipedia).

Ο μηχανισμός είναι πολύπλοκος. Όσον αφορά την γαλακτική ζύμωση, οι λακτοβάκιλλοι χρησιμοποιούν την λακτόζη και άλλα σάκχαρα του γάλακτος και



μέσω μιας σειράς αντιδράσεων τα μετατρέπουν σε γαλακτικό οξύ και έτσι παράγουν το τελικό προϊόν της γαλακτικής ζύμωσης. Η όλη διαδικασία προκαλείται από ειδικές ύλες, που λέγονται ένζυμα ή φυράματα και παράγονται από τους ίδιους τους λακτοβάκιλλους. Τα ένζυμα επίσης υπάρχουν σε ορισμένους αδένες του σώματος των ζώων. Κάθε ένζυμο έχει την ικανότητα να διασπά μόνο μια οργανική ουσία. Έτσι υπάρχουν πολλά είδη ζυμώσεων, που το όνομά τους προέρχεται είτε από το προϊόν που σχηματίζεται είτε από το μικροοργανισμό που προκαλεί τη ζύμωση (live-pectia).

Οι σπουδαιότερες ζυμώσεις είναι (live-pectia):

- Η αλκοολική ή οινοπνευματική ζύμωση:** Η αλκοολική ζύμωση προκαλείται από το ένζυμο ζυμάση, που περιέχεται στο ζυμομύκητα ή σακχαρομύκητα. Σύμφωνα μ' αυτή, τα απλά σάκχαρα που περιέχονται στις σταφίδες, στα σύκα, στις πατάτες, στο ζαχαροκάλαμο, στα δημητριακά και το ξύλο, διασπώνται σε αιθυλική αλκοόλη (κοινώς οινόπνευμα) και διοξείδιο του άνθρακα. Ειδικά αν χρησιμοποιηθούν σταφύλια, με την αλκοολική ζύμωση θα πάρουμε κρασί.
- Ζύμωση του άρτου:** Με αυτή το άμυλο των δημητριακών μετατρέπεται σε απλούστερα ζάχαρα.
- Γαλακτική ζύμωση:** Με αυτή τα ζάχαρα του γάλακτος μετατρέπονται σε γαλακτικό οξύ. Σ' αυτό οφείλεται το ότι το γάλα χαλάει πολύ γρήγορα
- Οξική ζύμωση:** Έτσι ονομάζεται η οξείδωση του οινοπνεύματος, που περιέχεται στα αλκοολούχα ποτά και κυρίως στο κρασί, σε οξικό οξύ, από το οξυγόνο του αέρα με τη βοήθεια του ενζύμου αλκοολοξειδάση, που εκκρίνεται από τους οξοποιητικούς μύκητες. Έτσι το κρασί μετατρέπεται σε ξίδι. (live-pectia.)

Τα αποτελέσματα της μελέτης της πορείας της ζύμωσης του επιλεγμένου λακτοβάκιλλου παρουσία μυκητοκτόνου έχουν ιδιαίτερη σημασία διότι, όπως έχει αναφερθεί, η ζύμωση παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην παραγωγή προϊόντων γαλακτικής ζύμωσης με αποτέλεσμα οποιαδήποτε αλλαγή στον «κύκλο» της να έχει

σαν συνέπεια αλλαγή στην πορεία της ζύμωσης και στην ποιότητα των τελικών προϊόντων της.

Μέχρι τώρα δεν έχουν γίνει άλλες μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση των φυτοφαρμάκων στην γαλακτική ζύμωση για να μπορέσουμε να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα. Έγιναν όμως μελέτες στην επίδραση των φυτοφαρμάκων στους μικροοργανισμούς που παράγουν την αλκοολική ζύμωση.

Συγκεκριμένα, ο Cabras και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση έξι μυκητοκτόνων στην ζυμωτική ικανότητα 2 μαγιάων (*Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckeraapiculata*) και 2 οξυγαλακτικών (*Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum*) του κρασιού όπου απέδειξαν ότι τα μυκητοκτόνα δεν επηρέασαν την αλκοολική ζύμωση, αντίθετα η παρουσία τους έκανε την μαγιά *K. Apiculata* να παράγει περισσότερο αλκοόλ! (Cabras P et al, 1999). Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μυκητοκτόνο σε συγκέντρωση 0,1μg/lit για την μέτρηση της παραγωγής αλκοόλ όπου έδειξε ότι η συγκεκριμένη συγκέντρωση δεν επηρέασε την ποσότητα του παραγόμενου αλκοόλ (Cabras P et al, 2003). Επίσης ο ίδιος ερευνητής μελέτησε την επίδραση του φυτοφαρμάκου fenhexamid στην αλκοολική ζύμωση της *Saccharomyces cerevisiae* όπου έδειξε ότι η παρουσία του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου δεν επηρέασε την παραγωγή αλκοόλ (Cabras P et al, 2004).

Τα αποτελέσματα τους έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Στην δική μας περίπτωση η μελέτη της πορείας της ζύμωσης έδειξε ότι το μυκητοκτόνο δεν επιβράδυνε καθόλου τον «κύκλο» της πορείας της ζύμωσης. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε κανονικά και μάλιστα στην 100 συγκέντρωση η πορεία της ζύμωσης ολοκληρώθηκε σε 4 ημέρες.

Γνωρίζουμε ότι για να ολοκληρωθεί μια ζύμωση πρέπει να υπάρχουν όλες οι προϋποθέσεις δηλ. κατάλληλη θερμοκρασία, κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και τα κατάλληλα ένζυμα τα οποία παράγει ο ίδιος ο λακτοβάκιλλος. Το γεγονός ότι η ζύμωση ολοκληρώθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις δείχνει ότι η πορεία της δεν επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου. Προφανώς στην συγκέντρωση 100 ο λακτοβάκιλλος να χρησιμοποιήσει κάποιο συστατικό του μυκητοκτόνου σε συνδυασμό με το θρεπτικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα να παράγει περισσότερα ένζυμα και να επιταχυνθεί η πορεία της ζύμωσης. Το γεγονός ότι και στις άλλες συγκεντρώσεις δεν επηρεάστηκε η πορεία της ζύμωσης οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο λακτοβάκιλλος «απορρόφησε» το μυκητοκτόνο και το χρησιμοποίησε για την ζύμωση ή ότι κανένα από τα συστατικά



του μυκητοκτόνου δεν έδρασε περιοριστικά στις αντιδράσεις ή ακόμη και τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης. Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και με άλλους λακτοβάκιλλους ή άλλα εντομοκτόνα. Μπορεί να υπάρχουν φυτοφάρμακα που όντως να περιορίζουν την πορεία της ζύμωσης με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ολοκλήρωσης ή να επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης με αποτέλεσμα να παράγονται τελικά προϊόντα χαμηλής ποιότητας. Προτείνεται μια παραπέρα έρευνα σε περισσότερους λακτοβάκιλλους και περισσότερα εντομοκτόνα ούτως ώστε να πάρουμε ένα συνολικό και ολοκληρωμένο συμπέρασμα.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι γενικά η παρουσία του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου στα διαλύματα των λακτοβακίλλων δεν παρουσίασε τις σημαντικές αλλαγές που παρουσιάστηκαν σε άλλες μελέτες φυτοφαρμάκων σε άλλους μικροοργανισμούς. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα αποδεικνύουν μια πληθώρα ωφελειών των προϊόντων ζύμωσης στην ανθρώπινη υγεία. Όμως και οι μέχρι τώρα μελέτες δείχνουν λίγο ή πολύ ότι όπου υπάρχουν φυτοφάρμακα υπάρχει και μια υποβάθμιση των οργανισμών που ζουν σε αυτό το περιβάλλον των φυτοφαρμάκων.

Το γεγονός ότι παρουσιάστηκαν αυξομειώσεις στην ανάπτυξη και επιτάχυνση ζυμώσεως στην 100 συγκέντρωση είναι ένα θέμα που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Επίσης η έρευνα πρέπει να επεκταθεί και σε άλλες ιδιότητες των λακτοβακίλλων, όπως στις επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στις βακτηρισίνες ή στην αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν πολλά προβιοτικά ή ακόμη στην αντοχή τους στα αντιβιοτικά. Εάν αποδειχθεί ότι τα φυτοφάρμακα περιορίζουν ή αναχαιτούν την αντιμικροβιακή δράση των προβιοτικών τότε μιλάμε για υποβάθμιση της ποιότητας και της αξίας των γαλακτοκομικών προϊόντων. Επίσης, εάν μελλοντικές έρευνες αποδείξουν την πιθανή υποβάθμιση των βακτηριοσινών από φυτοφάρμακα, τότε δεν θα υπάρχουν οι ωφέλειες και οι χρήσεις των βακτηριοσινών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Ένα πεδίο που χρειάζεται επίσης περαιτέρω έρευνα είναι και η περίπτωση όπου σε ένα περιβάλλον συνυπάρχουν περισσότεροι του ενός λακτοβάκιλλοι με περισσότερα του ενός φυτοφάρμακα. Επίσης, ο συνδυασμός φυτοφαρμάκων με λιπάσματα καθώς στις περισσότερες αγροτικές δραστηριότητες χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Χρήσιμες στη βιβλιογραφία θα μπορούσαν να φανούν και οι μελέτες



που συγκρίνουν τις επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στα προβιοτικά σε ένα μη ολιγοτροφικό περιβάλλον έναντι ενός ολιγοτροφικού περιβάλλοντος.

8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης ενός επιλεγμένου σύγχρονου μυκητοκτόνου, του Dodine, σε δύο λακτοβάκιλλους τους *L. paracasei* και *L. plantarum*. Το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο χρησιμοποιείται ευρέως στην Ελλάδα. Οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο σύμφωνα με τη νομοθεσία των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (0.1 µg/L) και 10x, 100x και 1000x. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μυκητοκτόνο επέφερε αλλαγές στην ανάπτυξη τόσο στον *L. paracasei* όσο και στον *L. plantarum*. Συγκεκριμένα, είχαμε αυξομειώσεις στην ανάπτυξη σε σχέση με το control και μάλιστα πολλές φορές στατιστικά σημαντικές. Επίσης, αλλαγές παρατηρήθηκαν στη μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά όσο και στην ζύμωση του *L. paracasei* σε σχέση πάντα με το control.

9. SUMMARY

The current study was undertaken to investigate the effects of one fungicide, Dodine, on two lactobacillus (*L. paracasei* and *L. plantarum*). This fungicide is widely used in Greece. European council legislation restricts the occurrence of individual pesticides in drinking water to 0.1 µg/L. Therefore the final exposures that were chosen were 0.1 µg/L, 10x, 100x and 1000x the maximum concentration permitted in drinking water and in foods. Generally, population levels of both strains were sometimes significantly higher or lower ($p \leq 0.05$) from the control. In addition, differentiations in the colonies' morphology in both strains and in lactic acid fermentation in *L. paracasei* strain were denoted.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Αλεξάνδρα Κουτσοτόλη**, ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΥΔΑΤΩΝ, ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, Ιωάννινα 2006.
2. **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ, ΤΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ, ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΩΝ**, Θεματική στρατηγική για την αειφόρο χρήση των φυτοφαρμάκων, Περιοδικό αγρότυπος,
3. **Αριστέα Βελεγράκη**, «Οι μύκητες στην ζωή μας», Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.
4. **Abdel-Mohsein H, Yamamoto N, Ottawa K, Tada C, Nakai Y.**, Isolation of bacteriocin-like substances producing bacteria from finished cattle-manure compost and activity evaluation against some food-borne pathogenic and spoilage bacteria., *J Gen Appl Microbiol.* 2010 Apr; 56(2):151-61.
5. **Abee T, Krockel L, Hill C.**, Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning., *Int J Food Microbiol.* 1995 Dec;28(2):169-85.
6. **Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A.**, The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies., *Eur J Clin Nutr.* 2000 Nov;54(11):856-60.
7. **Alegría A, Delgado S, Roces C, López B, Mayo B.**, Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk., *Int J Food Microbiol.* 2010 Jul 27. [Epub ahead of print].
8. **Allende A, Martínez B, Selma V, Gil MI, Suárez JE, Rodríguez A.**, Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their



- effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce., *Food Microbiol.* 2007 Oct-Dec; 24(7-8):759-66. Epub 2007 Mar 6.
9. **Ateş U, Uyanikgil Y, Baka M, Ozdaş E, Biçer S, Ergen G.**, Subacute effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on rat liver tissue: histochemical and immunohistochemical study., *Anal Quant Cytol Histol.* 2009 Oct;31(5):354-62.
10. **Alves VF, De Martinis EC, Destro MT, Vogel BF, Gram L.**, Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim., *J Food Prot.* 2005 Oct;68(10):2068-77.
11. **Andriulli A, Neri M, Loguercio C, Terreni N, Merla A, Cardarella MP, Federico A, Chilovi F, Milandri GL, De Bona M, Cavenati S, Gullini S, Abbiati R, Garbagna N, Cerutti R, Grossi E**, Clinical trial on the efficacy of a new symbiotic formulation, Flortec, in patients with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized study., *J Clin Gastroenterol.* 2008 Sep;42 Suppl 3 Pt 2:S218-23.
12. **Annual Record of Science and Industry**, Pasteur Process for Making Unalterable Beer, Monday, 15 March 2010, Taken from the Annual Record of Science and Industry for 1874.
13. **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.
14. **Βάσσος Δημήτριος**, «Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των θερμόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα της Ηπείρου», Ιωάννινα 2009, Διδακτορική Διατριβή.
15. **Balague C, Sturtz N, Duffard R, Evangelista de Duffard AM.** Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *E. coli* growth, chemical composition, and cellular envelope. *Environ Toxicol.* 2001;16:43-53.

16. **Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M.**, Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis., *Nutr Cancer*. 2010 Apr; 62(3):371-8.
17. **Bansal T, Garg S.**, Probiotics: from functional foods to pharmaceutical products., *Curr Pharm Biotechnol*. 2008 Aug;9(4):267-87.
18. **Barefoot SF, Nettles CG.**, Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures., *J Dairy Sci*. 1993 Aug;76(8):2366-79.
19. **Beighton D, Gilbert SC, Clark D, Mantzourani M, Al-Haboubi M, Ali F, Ransome E, Hodson N, Fenlon M, Zoitopoulos L, Gallagher J.**, Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva., *Appl Environ Microbiol*. 2008 Oct;74(20):6457-60. Epub 2008 Aug 22.
20. **Beketov MA, Liess M.**, Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods., *Environ Toxicol Chem*. 2008 Feb;27(2):461-70.
21. **Benno Y., F. He, M. Hosoda, H. Hashimoto, T. Kojima, K. Yamazaki, H. iino, H. Mykkaenen and S. Salminen** (1996) Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutr. Today*. 31, 9S-11S.
22. **Bergey' s manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY**, Ninth Edition,
23. **Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G.**, Toxicity of formulated glyphosate (glyphos) and cosmo-flux to larval and juvenile colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity., *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(15-16):966-73.
24. **Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G.**, Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line., *Nutr Cancer*. 1997;28(1):93-9.

25. **Bixquert Jiménez M.**, Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last?, *Rev Esp Enferm Dig.* 2009 Aug; 101(8):553-64.
26. **Blanco P, Orriols I, Losada A.**, Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations., *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010 Aug 31. [Epub ahead of print]
27. **Boneberger S, Rupec RA, Ruzicka T.**, Complementary therapy for atopic dermatitis and other allergic skin diseases: facts and controversies., *Clin Dermatol.* 2010 Jan-Feb;28(1):57-61.
28. **Borthakur A, Anbazhagan AN, Kumar A, Raheja G, Singh V, Ramaswamy K, Dudeja PK.**, The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF α -induced down-regulation of SMCT1 expression and function., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
29. **Botitsi Helen & Economou Anastasios & Tsipi Despina**, Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1685–1695.
30. **Breazeale FW, Camper ND.** Effect of selected herbicides on bacterial growth rates. *Appl Microbiol.* Feb 1972;23(2):431-432.
31. **Brenner DM, Chey WD**, *Bifidobacterium infantis* 35624: a novel probiotic for the treatment of irritable bowel syndrome., *Rev Gastroenterol Disord.* 2009 Winter;9(1):7-15.
32. **Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ, Moineau S.**, Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review., *J Dairy Sci.* 2003 Feb;86(2):407-23.
33. **Brooks G.T and Roberts T.R.**, *Pesticide Chemistry and Bioscience*, 1999. Published by the Royal Society of Chemistry.

34. **Caboni P, Cabras P.**, Pesticides' Influence on Wine Fermentation., *Adv Food Nutr Res.* 2010;59C:43-62. Epub 2010 Jun 24.
35. **Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Farris GA, Madau G, Emonti G.**, Pesticides in fermentative processes of wine., *J Agric Food Chem.* 1999 Sep;47(9):3854-7.
36. **Cabras P, Farris GA, Fiori MG, Pusino A.**, Interaction between fenhexamid and yeasts during the alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*., *J Agric Food Chem.* 2003 Aug 13;51(17):5012-5.
37. **Cabras P, Farris GA, Pinna MV, Pusino A.**, Behavior of a fenhexamid photoproduct during the alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*., *J Agric Food Chem.* 2004 Dec 29;52(26):8053-6.
38. **Cáceres T, Megharaj M, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R.**, Fenamiphos and related organophosphorus pesticides: environmental fate and toxicology., *Rev Environ Contam Toxicol.* 2010;205:117-62.
39. **Cailliez-Grimal C, Miguindou-Mabiala R, Lescine M, Revol-Junelles AM, Millière JB.**, Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses., *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Sep 1;250(1):163-9.
40. **Calhelha RC, Andrade JV, Ferreira IC, Estevinho LM.**, Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process., *Food Microbiol.* 2006 Jun;23(4):393-8. Epub 2005 Sep 30.
41. **Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, Montel MC.**, Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches, *Syst Appl Microbiol.* 2007 Nov;30(7):547-60. Epub 2007 Jul 2.

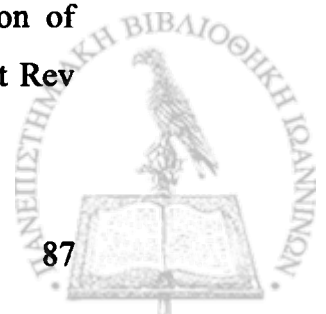
42. **Capozzi V, Russo P, Beneduce L, Weidmann S, Grieco F, Guzzo J, Spano G.** Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines., *Lett Appl Microbiol.* 2010 Mar;50(3):327-34.
43. **Carpenter D, Boutin C.** Sublethal effects of the herbicide glufosinate ammonium on crops and wild plants: short-term effects compared to vegetative recovery and plant reproduction., *Ecotoxicology.* 2010 Jul 16.
44. **Carreté R, Vidal MT, Bordons A, Constantí M.** Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*., *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Jun 4;211(2):155-9.
45. **Chen J, Li X, Yin B, Liu G, Wang K, Ping W.** [Statistical methods to optimize immobilization and bacteriocin production by *Lactobacillus paracasei* HD1.7], *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2009 May 4; 49(5):664-71.
46. **Chen RM, Wu JJ, Lee SC, Huang AH, Wu HM.** Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion., *J Dairy Sci.* 1999 Nov;82(11):2308-14.
47. **Chikindas ML, Montville TJ:** Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives, Blackie Glaskow and London, 1991: 215-234
48. **Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ.** Skin microflora and bacterial infections of the skin., *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001 Dec;6(3):170-4.
49. **Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P.** Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking., *FEMS Yeast Res.* 2010 Mar;10(2):123-33. Epub 2009 Sep 7.
50. **Collins MD, Ash C, Farrow JA, Wallbanks S, Williams AM.** 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov., *J Appl Bacteriol.* 1989 Oct;67(4):453-60.

- 51. Colombo E, Franzetti L, Frusca M, Scarpellini M.** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Artisanal Italian goat cheese., *J Food Prot.* 2010 Apr;73(4):657-62.
- 52. Colombo F, Borgo F, Fortina MG.** Genotypic characterization of non starter lactic acid bacteria involved in the ripening of artisanal Bitto PDO cheese., *J Basic Microbiol.* 2009 Dec; 49(6):521-30.
- 53. Czerucka D, Piche T, Rampal P.** Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii.*, *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Sep 15;26(6):767-78.
- 54. Cribby S, Taylor M, Reid G.** Vaginal microbiota and the use of probiotics., *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008;2008:256490. Epub 2009 Mar 29.
- 55. Cronin M, Morrissey D, Rajendran S, El Mashad SM, van Sinderen D, O'Sullivan GC, Tangney M.** Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. , *Mol Ther.* 2010 Jul;18(7):1397-407. Epub 2010 Apr 13.
- 56. Cus F, Raspor P.** The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts., *Lett Appl Microbiol.* 2008 Jul;47(1):54-9. Epub 2008 Jun 9.
- 57. Danis T., Sakkas V., Stratis I., Albanis T. A.** Pesticide Multiresidue Analysis in Fresh and Canned Peaches Using Solid Phase Extraction and Gas Chromatography Techniques, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2002) 69:674–681.
- 58. Dastager SG, Raziuddin S, Deepa CK, Tang SK, Li WJ, Pandey A.** *Micrococcus niistensis* sp. nov., isolated from forest soil, India., *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Apr 23. [Epub ahead of print].
- 59. Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E.** Effects of pesticides on freshwater diatoms., *Rev Environ Contam Toxicol.* 2010;203:87-103. Review.

- 60. De Moreno de Leblanc A, Perdigón G.**, The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation, *Proc Nutr Soc.* 2010 Aug;69(3):421-8. Epub 2010 Jun 16.
- 61. De Vrese M.**, Health benefits of probiotics and prebiotics in women, *Menopause Int.* 2009 Mar;15(1):35-40.
- 62. De Vrese M, Schrezenmeir J.**, Probiotics, prebiotics, and synbiotics., *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008;111:1-66.
- 63. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J.**, Probiotics--compensation for lactase insufficiency., *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):421S-429S.
- 64. De Vuyst L, Leroy F.**, Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications., *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007;13(4):194-9.
- 65. Del Piano M, Carmagnola S, Anderloni A, Andorno S, Ballarè M, Balzarini M, Montino F, Orsello M, Pagliarulo M, Sartori M, Tari R, Sforza F, Capurso L.**, The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double-blind, randomized, placebo-controlled study., *J Clin Gastroenterol.* 2010 Sep; 44 Suppl 1:S30-4.
- 66. Dicks LM, Dellaglio F, Collins MD.**, Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov., *Int J Syst Bacteriol.* 1995 Apr;45(2):395-7.
- 67. Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C, Nes IF.**, An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*., *Peptides.* 2009 Aug; 30(8):1562-74. Epub 2009 May 22.
- 68. Doi A, Nakajo K, Kamiya T, Ohkusu K.**, Splenic abscess caused by *Lactobacillus paracasei*. , *J Infect Chemother.* 2010 Jul 29. [Epub ahead of print].

69. **Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P.**, Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production., *Clin Exp Immunol.* 2010 May 7. [Epub ahead of print]
70. **Donohue DC.**, Safety of probiotics., *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006;15(4):563-9.
71. **Dorigo U, Berard A, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B.**, In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides., *Aquat Toxicol.* 2010 Jul 15;98(4):396-406. Epub 2010 Mar 27.
72. **Duez H, Pelletier C, Cools S, Aissi E, Cayuela C, Gavini F, Bouquelet S, Neut C, Mengaud J.**, A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces., *J Appl Microbiol.* 2000 Jun;88(6):1019-27
73. **Ελένη Μαλλάτου Μπομπίνη**, ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΤΥΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ LINDANE ΚΑΙ METHYL PARATHION ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΦΕΤΑ, διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα 1997, σελ. 5-8.
74. **Έφη Τσακαλίδου**, ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ-ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
75. **Elie Metchnikoff**, *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*, 1908.
76. **Eren M, Dinleyici EC, Vandenplas Y.**, Clinical efficacy comparison of *Saccharomyces boulardii* and yogurt fluid in acute non-bloody diarrhea in children: a randomized, controlled, open label study., *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Mar;82(3):488-91.
77. **EXTOXNET**: Extension Toxicology Network.

78. **Fai PB, Grant A.**, A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides., *Chemosphere*. 2009 Mar;74(9):1165-70. Epub 2009 Jan 12.
79. **Fang HW, Fang SB, Chiang Chiau JS, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Cheng ML, Lee HC.**, Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* on *Salmonella* lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells., *J Med Microbiol*. 2010 May;59(Pt 5):573-9. Epub 2010 Jan 28.
80. **Ferrari A, Lascano C, Pechen de D'Angelo AM, Venturino A.**, Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010 Aug 10. [Epub ahead of print]
81. **Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED.**, Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer., *World J Gastroenterol*. 2008 Nov 14;14(42):6453-7.
82. **Fuller R.** Probiotic foods. Current use and future developments. *Int Food Inq* 1993;3:23-6.
83. **Fuller R.** Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78.
84. **Fytianos K, Drimaropoulou G, Raikos N, Theodoridis G, Tsoukali H,** Headspace solid-phase microextraction for the gas chromatographic analysis of organophosphorus insecticides in vegetables, *J AOAC Int*. 2007 Nov-Dec;90(6):1677-81.
85. **Gaón D, Doweck Y, Gómez Zavaglia A, Ruiz Holgado A, Oliver G.**, [Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin], *Medicina (B Aires)*. 1995;55(3):237-42.
86. **Galvez A, Lopez RL, Abriouel H, Valdivia E, Omar NB.**, Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria., *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(2):125-52.



87. **Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N.**, Bacteriocin-based strategies for food biopreservation., *Int J Food Microbiol.* 2007 Nov 30;120(1-2):51-70. Epub 2007 Jun 12.
88. **Gao J, Bao HY, Xin MX, Liu YX, Li Q, Zhang YF.**, Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. W31., *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006 Mar;7(3):186-92.
89. **Geier MS, Butler RN, Howarth GS.**, Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer?, *Cancer Biol Ther.* 2006 Oct;5(10):1265-9. Epub 2006 Oct 19.
90. **Genome Project: *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703** project at Gifu University, Life Science Research Center, Japan/ NCBI, Bethesda,USA.
91. **Gill H, Prasad J.**, Probiotics, immunomodulation, and health benefits., *Adv Exp Med Biol.* 2008;606:423-54.
92. **Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y.**, Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology., *Res Microbiol.* 2010 Jul-Aug;161(6):480-7. Epub 2010 Mar 17.
93. **González L, Sacristán N, Arenas R, Fresno JM, Eugenia Tornadijo M.**, Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese., *Food Microbiol.* 2010 Aug;27(5):592-7. Epub 2010 Jan 25.
94. **Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS.**, Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases., *World J Gastroenterol.* 2010 Jan 28;16(4):403-10.
95. **Grönlund M.M, H. Arvilommi, P. Kero, O.P. Lehtonen and E. Isolauri (2000)** 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* 83, F186-F192.

96. Grossi E, Buresta R, Abbiati R, Cerutti R; Pro-DIA study group., Clinical trial on the efficacy of a new symbiotic formulation, Flortec, in patients with acute diarrhea: a multicenter, randomized study in primary care., *J Clin Gastroenterol.* 2010 Sep;44 Suppl 1:S35-41.

97. Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, Chen SL, Luo ZL., Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China., *Anaerobe.* 2008 Dec;14(6):313-7. Epub 2008 Jun 28.

98. Guarner F., Enteric flora in health and disease., *Digestion.* 2006;73 Suppl 1:5-12. Epub 2006 Feb 8.

99. Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L., Should yoghurt cultures be considered probiotic?, *Br J Nutr.* 2005 Jun;93(6):783-6.

100. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E., Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?, *Neonatology.* 2007;92(1):64-6. Epub 2007 Feb 23.

101. Gupta V, Garg R., Probiotics., *Indian J Med Microbiol.* 2009 Jul-Sep;27(3):202-9.

102. Guslandi M, Giollo P, Testoni PA, "A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis". *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15 (6): 697–8.

103. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA, "Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease". *Dig. Dis. Sci.* 2000; 45 (7): 1462–4.

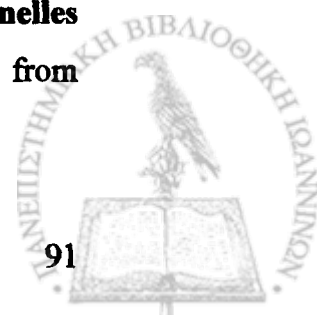
104. Haakensen M, Dobson CM, Hill JE, Ziola B., Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus.*, *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Mar;59(Pt 3):615-21.



- 105. Hamilton-Miller J.M.T.** (2001) A review of clinical trials of probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *Infect. Dis. Rev.* 3, 83-87.
- 106. Hang M, Zhongyun C, Yuhua Z, Meichi C.** Effects of trifluralin on soil microbial populations and the nitrogen fixation activities. *J Environ Sci Health B.* Sep 2001;36(5):569-579.
- 107. Hansen EB.,** Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future, *Int J Food Microbiol.* 2002 Sep 15;78(1-2):119-31.
- 108. Haukioja A.,** Probiotics and oral health., *Eur J Dent.* 2010 Jul;4(3):348-55.
- 109. He T, Priebe MG, Zhong Y, Huang C, Harmsen HJ, Raangs GC, Antoine JM, Welling GW, Vonk RJ.,** Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects., *J Appl Microbiol.* 2008 Feb;104(2):595-604. Epub 2007 Oct 9.
- 110. Heller KJ.,** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms., *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):374S-379S.
- 111. Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ.,** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial., *BMJ.* 2007 Jul 14;335(7610):80. Epub 2007 Jun 29.
- 112. Hinrichsen LL, Montel MC, Talon R.,** Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp. (168) isolated from Danish bacon curing brines., *Int J Food Microbiol.* 1994 May;22(2-3):115-26.
- 113. Hoenigl M, Grisold AJ, Valentin T, Leitner E, Zarfel G, Renner H, Krause R.,** Isolation of *Carnobacterium* sp. from a human blood culture., *J Med Microbiol.* 2010 Apr;59(Pt 4):493-5. Epub 2010 Jan 14.
- 114. Hong KS, Kang HW, Im JP, Ji GE, Kim SG, Jung HC, Song IS, Kim JS.,** Effect of probiotics on symptoms in korean adults with irritable bowel syndrome., *Gut Liver.* 2009 Jun;3(2):101-7. Epub 2009 Jun 30.



- 115. Hrelia et al:** The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis*, Volume 11 445-453, 1996.
- 116. Huang J, Zhang S, Ding M, Zhou A, Zhang J, Zhang J.,** Acute effects of carbofuran in workers of two pesticide plants., *Med Lav.* 1998;89 Suppl 2:S105-11.
- 117. Huang QY, Huang L, Huang HQ.,** Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in zebrafish (*Danio rerio*) brain., *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010 Sep 3. [Epub ahead of print]
- 118. Hütt P, Shchepetova J, Lõivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M.,** Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens., *J Appl Microbiol.* 2006 Jun;100(6):1324-32.
- 119. Hoveyda N, Heneghan C, Mahtani KR, Perera R, Roberts N, Glasziou P.,** A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome., *BMC Gastroenterol.* 2009 Feb 16;9:15.
- 120. Ibekwe AM, Papiernik SK, Gan J, Yates SR, Yang CH, Crowley DE.,** Impact of fumigants on soil microbial communities., *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jul;67(7):3245-57.
- 121. Isolauri E.** (2001) Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, S1142-S1146
- 122. Isolauri E.** (1999) Probiotics and gut inflammation. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 15, 534-537
- 123. Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A.,** Application of probiotics in food products--challenges and new approaches., *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Apr;21(2):175-81. Epub 2010 Apr 21.
- 124.⁽¹⁾Jasniewski J, Cailliez-Grimal C, Chevalot I, Millière JB, Revol-Junelles AM.,** Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from



Carnobacterium maltaromaticum CP5 on target bacteria and Caco-2 cells., *Food Chem Toxicol.* 2009 Jan 20. [Epub ahead of print]

125. ⁽²⁾ **Jasniewski J, Cailliez-Grimal C, Chevalot I, Millièrè JB, Revol-Junelles AM.**, Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 cells, *Food Chem Toxicol.* 2009 Apr;47(4):893-7.

126. **Javoreková S, Svrceková I, Maková J.**, Influence of benomyl and prometryn on the soil microbial activities and community structures in pasture grasslands of Slovakia., *J Environ Sci Health B.* 2010 Oct;45(7):702-9.

127. **Jilani S., Altaf Khan M.:** Isolation, Characterization and Growth Response of Pesticides Degrading Bacteria. *J Biol Sci.* 2004; 4: 15-20.

128. **Jin M, Zhang Y, Ye J, Huang C, Zhao M, Liu W.**, Dual enantioselective effect of the insecticide bifenthrin on locomotor behavior and development in embryonic-larval zebrafish., *Environ Toxicol Chem.* 2010 Jul;29(7):1561-7.

129. **Johnston BC, Supina AL, Vohra S.**, Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials., *CMAJ.* 2006 Aug 15;175(4):377-83.

130. **Jones DK, Hammond JI, Relyea RA.**, Roundup(R) and amphibians: The importance of concentration, application time, and stratification., *Environ Toxicol Chem.* 2010 Sep;29(9):2016-25.

131. **Jonganurakkun B, Wang Q, Xu SH, Tada Y, Minamida K, Yasokawa D, Sugi M, Hara H, Asano K.**, *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use., *J Biosci Bioeng.* 2008 Jul;106(1):69-73.

132. **Jordan KN, Cogan TM.**, Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol.* 1999 Aug; 29(2):136-40.



133. Jung SW, Kim WJ, Lee KG, Kim CW, Noh WS., Fermentation characteristics of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from sourdough and assessment of the isolates for industrial potential., *J Microbiol Biotechnol.* 2008 Jul;18(7):1266-73.
134. Kaila M., E. Isolauri, M. Saxelin, H. Arvilommi and T. Vesperi (1995) Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhea. *Arch. Dis. Childhood.* 72, 51-53.
135. Kale-Pradhan PB, Jassal HK, Wilhelm SM., Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis., *Pharmacotherapy.* 2010 Feb;30(2):119-26.
136. Karaeva N. [Effect of various herbicides on pathogenic microflora in outdoor reservoir water.] *Gig Sanit.* 1988;8:24-6 (in Russian).
137. Katz JA., Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea., *J Clin Gastroenterol.* 2006 Mar;40(3):249-55.
138. Kılıç GB, Karahan AG., Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Fecal Samples of Healthy Humans and Patients with Dyspepsia, and Determination of Their pH, Bile, and Antibiotic Tolerance Properties., *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2010 Jul 29;18(4):220-229. [Epub ahead of print].
139. Kim Y, Lee D, Kim D, Cho J, Yang J, Chung M, Kim K, Ha N., Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212., *Arch Pharm Res.* 2008 Apr;31(4):468-73. Epub 2008 May 1.
140. Klaenhammer T. R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria *Biochemie.* 1988,70: 337-354.
141. Kligler B, Cohrssen A., Probiotics., *Am Fam Physician.* 2008 Nov 1;78(9):1073-8.

142. **Ko JS, Yang HR, Chang JY, Seo JK.** Lactobacillus plantarum inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor-alpha., *World J Gastroenterol.* 2007 Apr 7; 13(13):1962-5.
143. **Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX,** Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor., *Lett Appl Microbiol.* 2006 Jun;42(6):595-9.
144. **Koninkx JF, Malago JJ.** The protective potency of probiotic bacteria and their microbial products against enteric infections-review., *Folia Microbiol (Praha).* 2008;53(3):189-94. Epub 2008 Jul 27.
145. **Konstantinou, Hela D., Lambropoulou D., Albanis T.,** Monitoring of Pesticides in the Environment, *Tadeo/Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples 7552_C012 Page Proof page 319 17.9.2007.*
146. **Koutsotoli AD, Dimou DS, Alamanos YP, Maipa VE,** Inductive effects of environmental concentration of atrazine on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*, *Folia Microbiol (Praha).* 2005;50(4):283-7.
147. **Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, Kumar P, Poddar D, Aggarwal PK, Henry CJ, Jain S, Yadav H.,** Cancer-preventing attributes of probiotics: an update., *Int J Food Sci Nutr.* 2010 Feb 26. [Epub ahead of print].
148. **Lambropoulou Dimitra A., Albanis Triantafyllos A.,** Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 195–228.
149. **Lambropoulou DA, Albanis TA.,** Headspace solid- phase microextracion in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries, *J Chromatogr A.* 2003 Apr 18;993(1-2):197-203.

150. Lambropoulou Dimitra A., and Albanis Triantafyllos A., Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Strawberry and Cherry Juices, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50
151. Latijnhouwers M, de Wit PJ, Govers F. *Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants.* *Trends in Microbiology* Volume 11 462-469.
152. Lee do K, Jang S, Kim MJ, Kim JH, Chung MJ, Kim KJ, Ha NJ., Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines., *BMC Cancer.* 2008 Oct 27;8:310.
153. Lee MC, Lin LH, Hung KL, Wu HY., Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children., *Acta Paediatr Taiwan.* 2001 Sep-Oct;42(5):301-5.
154. Lee Y.K., K. Nomoto, S. Salminen and S.L. Gorbach (1999) *Handbook of probiotics.* John Wiley & Sons, Inc., NY
155. Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995;6:241-5.
156. Lew S, Lew M, Szarek J, Babińska I., Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a lake threatened by a pesticide disposal site., *Environ Sci Pollut Res Int.* 2010 Aug 9.
157. Lionetti E, Indrio F, Pavone L, Borrelli G, Cavallo L, Francavilla R, Role of probiotics in pediatric patients with *Helicobacter pylori* infection: a comprehensive review of the literature., *Helicobacter.* 2010 Apr;15(2):79-87.
158. Ljungh A, Wadström T., Lactic acid bacteria as probiotics., *Curr Issues Intest Microbiol.* 2006 Sep;7(2):73-89.
159. Lodolo EJ, Kock JL, Axcell BC, Brooks M., The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing., *FEMS Yeast Res.* 2008 Nov;8(7):1018-36. Epub 2008 Sep 15.



160. **Lombardo L.**, New insights into *Lactobacillus* and functional intestinal disorders., *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2008 Sep;54(3):287-93.
161. **Lönnermark E, Friman V, Lappas G, Sandberg T, Berggren A, Adlerberth I.**, Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics., *J Clin Gastroenterol.* 2010 Feb; 44(2):106-12.
162. **Lonvaud-Funel A.**, Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine., *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999 Jul-Nov;76(1-4):317-31.
163. **López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A.**, Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro., *Int J Food Microbiol.* 2010 Mar 31;138(1-2):157-65. Epub 2010 Jan 4.
164. **Louis Pasteur** , Experiments and New Views on the Nature of Fermentations, Friday, 04 December 2009
165. **Louis Pasteur** , STUDIES OF FERMENTATION, Tuesday, 25 August 2009 taken from the: Paris, June 1, 1876.
166. **Low D, Ahlgren JA, Horne D, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR.**, Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention., *Appl Environ Microbiol.* 1998 Jun;64(6):2147-51.
167. **Lye HS, Rusul G, Liong MT.**, Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol., *J Dairy Sci.* 2010 Apr;93(4):1383-92.
168. **Lozo J, Jovicic B, Kojic M, Dalgalarrrondo M, Chobert JM, Haertlé T, Topisirovic L.**, Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese., *Curr Microbiol.* 2007 Sep;55(3):266-71. Epub 2007 Jul 25.
170. **Μανωλαράκης Μανώλης:** ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ειδικός Διατροφολόγος, Διαιτολόγος.

171. **Μπαλατσούρας Γ.:** Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις «Έμβρυο» Αθήνα, 2006: 194-230.
172. **MacDonald TT, Bell I,** Probiotics and the immune response to vaccines., Proc Nutr Soc. 2010 Aug;69(3):442-6. Epub 2010 Jun 14.
173. **Macquiddy El. Sr.,** A STUDY OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS AND LACTOBACILLUS BIFIDUS., Nebr State Med J. 1964 Jan;49:21-6.
174. **MacRae IC.,** Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds., Rev Environ Contam Toxicol. 1989;109:1-87.
175. **Macouzet M, Robert N, Lee BH.,** Genetic and functional aspects of linoleate isomerase in Lactobacillus acidophilus., Appl Microbiol Biotechnol. 2010 May 12. [Epub ahead of print].
176. **Markoglou AN, Bempelou ED, Liapis KS, Ziogas BN,** Determination of benzoylurea insecticide residues in tomatoes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array and atmospheric pressure chemical ionization –mass spectrometry detection, J AOAC Int. 2007 Sep-Oct;90(5):1395-401., 3359-3365 3359.
177. **Malago JJ, Nemeth E, Koninkx JF, Tooten PC, Fajdiga S, van Dijk JE.,** Microbial products from probiotic bacteria inhibit Salmonella enteritidis 857-induced IL-8 synthesis in Caco-2 cells., Folia Microbiol (Praha). 2010 Jul;55(4):401-8. Epub 2010 Aug 3.
178. **Mallatou H., Pappas C.P., Kondyli E., Albanis T.A.,** Pesticide residues in milk and cheeses from Greece, The Science of the Total Environment 196 (1997) 11 I- 117.
179. **Mallon PT, McKay D, Kirk SJ, Gardiner K.** Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007, Issue 4. Art. No.: CD005573. DOI: 10.1002/14651858.CD005573.pub2.

- 180. Marianelli C, Cifani N, Pasquali P.**, Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions., *Res Microbiol.* 2010 Jul 1. [Epub ahead of print].
- 181. Marteau P, Pochart P, Flourié B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, Rambaud JC.**, Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans., *Am J Clin Nutr.* 1990 Oct; 52(4):685-8.
- 182. Máthé I, Táncsics A, György E, Pohner Z, Vladár P, Székely AJ, Márialigeti K.**, Investigation of mineral water springs of Miercurea Ciuc (Csíkszereda) region (Romania) with cultivation-dependent microbiological methods., *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010 Jun;57(2):109-22.
- 183. Maukonen J, Mättö J, Suihko ML, Saarela M.**, Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota., *J Med Microbiol.* 2008 Dec; 57(Pt 12):1560-8.
- 184. McFarland LV.**, Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients., *World J Gastroenterol.* 2010 May 14;16(18):2202-22.
- 185. McFarland LV.**, Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease., *Am J Gastroenterol.* 2006 Apr;101(4):812-22.
- 186. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y.**, Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications.
- 187. Merenstein DJ, Smith KH, Scriven M, Roberts RF, Sanders ME, Petterson S.**, The study to investigate the potential benefits of probiotics in yogurt, a patient-oriented, double-blind, cluster-randomised, placebo-controlled, clinical trial., *Eur J Clin Nutr.* 2010 Mar 10. [Epub ahead of print].

- 188. Minervini F, Bilancia MT, Siragusa S, Gobetti M, Caponio F.** Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food., *Food Microbiol.* 2009 Sep;26(6):559-64. Epub 2009 Mar 27.
- 189. Minoru Shirota** (April 23, 1899 - March 10, 1982), *Wikipedia*.
- 190. Miller LG, Finegold SM.** Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*)., *J Bacteriol.* 1967 Jan;93(1):125-30.
- 191. Millette M, Dupont C, Shareck F, Ruiz MT, Archambault D, Lacroix M.** Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain., *J Appl Microbiol.* 2008 Jan;104(1):269-75. Epub 2007 Oct 9.
- 192. Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, Tamir D, Makarova K.** Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking., *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Aug;29(3):465-75.
- 193. Molin G.** Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v., *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):380S-385S.
- 194. Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM.** Surface microflora of four smear-ripened cheeses., *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):6489-500.
- 195. Mufandaedza J, Viljoen BC, Feresu SB, Gadaga TH.** Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains., *Int J Food Microbiol.* 2006 Apr 15;108(1):147-52. Epub 2006 Jan 4.
- 196. Müller DM, Carrasco MS, Tonarelli GG, Simonetta AC.** Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage., *J Appl Microbiol.* 2009 Jun;106(6):2031-40. Epub 2009 Mar 19.



- 197. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Vanengelsdorp D, Pettis JS.,** High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health., *PLoS One*. 2010 Mar 19;5(3):e9754.
- 198. Ng PJ, Fleet GH, Heard GM.** Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *Int J Food Microbiol*. May 25 2005;101(2):237-250.
- 199. Nieradko-Iwanicka B, Borzecki A.,** Influence of fenpropathrin on memory and movement in mice after transient incomplete cerebral ischemia., *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(17-18):1166-72.
- 200. Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panyim S.,** Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage., *Int J Food Microbiol*. 2003 Mar 15;81(2):137-45.
- 201. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F.,** Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*., *Immunology*. 2006 Jun;118(2):202-15.
- 202. Ohashi Y, Ushida K.,** Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action., *Anim Sci J*. 2009 Aug;80(4):361-71.
- 203. Ohland CL, Macnaughton WK.,** Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Mar 18. [Epub ahead of print].
- 204. O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, Fukuwatari T, Shibata K, Mawhinney T.,** Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk., *J Nutr*. 2009 Nov; 139(11):2044-8. Epub 2009 Sep 9.
- 205. Olasupo NA.,** Bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods, *Folia Microbiol (Praha)*. 1996; 41(2):130-6.
- 206. Oliveira RP, Florence AC, Silva RC, Perego P, Converti A, Gioielli LA, Oliveira MN.,** Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic

survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk., *Int J Food Microbiol.* 2009 Jan 15;128(3):467-72. Epub 2008 Oct 20.

207. **Olszyk D, Pflieger T, Lee EH, Plocher M.,** Potato (*Solanum tuberosum*) greenhouse tuber production as an assay for asexual reproduction effects from herbicides, *Environ Toxicol Chem.* 2010 Jan;29(1):111-21.

208. **Onraedt A, Soetaert W, Vandamme E.,** Industrial importance of the genus *Brevibacterium.*, *Biotechnol Lett.* 2005 Apr;27(8):527-33.

209. **Oudhuis GJ, Bergmans DC, Dormans T, Zwaveling JH, Kessels A, Prins MH, Stobberingh EE, Verbon A.,** Probiotics versus antibiotic decontamination of the digestive tract: infection and mortality., *Intensive Care Med.* 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]

210. **Ouwenhand A.C., S. Salminen, S. Toekkoe, P.J. Roberts, J. Ovaska and E. Salminen** (2002) Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 184-186.

211. **Ouwehand A.C., S. Toekkoe and S. Salminen** (2001) The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria *in vitro.* *J. Food Sci.* 66, 856-859.

212. **Ouwehand, R. Reniero, M. Saarela, S. Salminen, M. Saxelin, E. Schiffrin, F. Shanahan, E. Vaughan and A. von Wright** (1999) Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 393-399.

213. **Ouwenhand A.C., E. Isolauri, P.V. Kirjavainen and S. Salminen** (1999) Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects from different ages. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 61-64.

214. **Ouwenhand A.C and S. Salminen** (1998) The health effects of cultured milk products with viable and non viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 749-758.

215. **Oyetibo GO, Ilori MO, Adebusoye SA, Obayori OS, Amund OO.,** Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems., *Environ Monit Assess.* 2010 Sep;168(1-4):305-14. Epub 2009 Aug 18.

216. **Χρυσάνθη Παπαδοπούλου,** ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000.



217. Μ. ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ- Α. ΜΑΥΡΙΔΟΥ, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ, 2001

218. Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA., Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut., *Curr Issues Intest Microbiol.* 2003 Sep;4(2):71-5.

219. Pangsomboon K, Bansal S, Martin GP, Suntainalert P, Kaewnopparat S, Srichana T., Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32., *J Appl Microbiol.* 2009 Jun; 106(6):1928-40. Epub 2009 Feb 25.

220. Paolillo R, Romano Carratelli C, Sorrentino S, Mazzola N, Rizzo A., Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells., *Int Immunopharmacol.* 2009 Oct; 9(11):1265-71. Epub 2009 Jul 29.

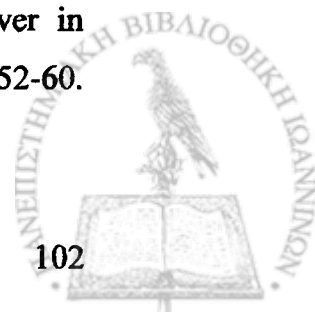
221. Peluso I, Fina D, Caruso R, Stolfi C, Caprioli F, Fantini MC, Caspani G, Grossi E, Di Iorio L, Paone FM, Pallone F, Monteleone G., *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation., *Infect Immun.* 2007 Apr;75(4):1730-7. Epub 2007 Jan 22.

222. Pereira DI, Gibson GR., Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans., *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2002;37(4):259-81.

223. Pereira CI, Neto DM, Capucho JC, Gião MS, Gomes AM, Malcata FX., How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants., *J Dairy Sci.* 2010 Apr;93(4):1335-44.

224. Pesce S, Batisson I, Bardot C, Fajon C, Portelli C, Montuelle B, Bohatier J., Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure., *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009 Oct;72(7):1905-12. Epub 2009 Jul 30.

225. Pesce S, Fajon C, Bardot C, Bonnemoy F, Portelli C, Bohatier J., Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs., *Aquat Toxicol.* 2008 Feb 18;86(3):352-60. Epub 2007 Nov 28.



226. **Petti S., G. Tarsitani and A. Simoneti D' Area** (2001) A randomized clinical trial of the effect of yogurt on the human salivary microflora. *Arch. Oral Biol.* 46, 705-712.
227. **Poznanski E, Cavazza A, Cappa F, Cocconcelli PS.**, Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park., *Int J Food Microbiol.* 2004 Apr 15; 92(2):141-51.
228. **Preuss TG, Hammers-Wirtz M, Ratte HT.**, The potential of individual based population models to extrapolate effects measured at standardized test conditions to relevant environmental conditions-an example for 3,4-dichloroaniline on *Daphnia magna*., *J Environ Monit.* 2010 Sep 10. [Epub ahead of print]
229. **Puertollano E, Puertollano MA, Cruz-Chamorro L, de Cienfuegos GA, Ruiz-Bravo A, de Pablo MA.**, Effects of concentrated supernatants recovered from *Lactobacillus plantarum* on *Escherichia coli* growth and on the viability of a human promyelocytic cell line., *J Appl Microbiol.* 2009 Apr; 106(4):1194-203. Epub 2009 Jan 30.
230. **Qualls WA, Xue RD, Zhong H.**, Impact of bifenthrin on honeybees and *Culex quinquefasciatus*., *J Am Mosq Control Assoc.* 2010 Jun;26(2):223-5.
231. **Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D.**, [Utilization of molecular techniques for the characterization of wine yeasts and the study of the wine-making process], *Microbiologia.* 1993 Feb;9 Spec No:76-82
232. **Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P.**, Incidence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF 221 isolated from Thai fermented foods., *J Food Prot.* 2008 Oct;71(10):2024-9.
233. **Rea MC, Görges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, Scherer S, Swings J, Cogan TM.**, Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese., *J Dairy Sci.* 2007 May;90(5):2200-10.

- 234. Redondo-Lopez V., R.L. Cook and J.D. Sobel.,** Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*, 1990, 12, 856-872.
- 235. Reid G., A.W. Bruce, N. Fraser, C. Heinemann, J. Owen and B. Henning** (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30, 49-52.
- 236. Reviriego C, Fernández L, Rodríguez JM.,** A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system., *J Food Prot.* 2007 Nov;70(11):2512-7.
- 237. Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC.,** Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma., *Int J Food Microbiol.* 2010 Mar 31;138(1-2):19-25. Epub 2010 Jan 7.
- 238. Rolfe RD,** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health., *J Nutr.* 2000 Feb;130(2S Suppl):396S-402S.
- 239. Rompre A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P.** Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods.* Mar 2002;49(1):31-54.
- 240. Rosburg V, Boylston T, White P.,** Viability of bifidobacteria strains in yogurt with added oat beta-glucan and corn starch during cold storage., *J Food Sci.* 2010 Jun;75(5):C439-44.
- 241. Ruediger GA, Pardon KH, Sas AN, Godden PW, Pollnitz AP.,** Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation., *J Agric Food Chem.* 2005 Apr 20;53(8):3023-6.

- 242. Rychert RC, Stephenson GR.** Atypical *Escherichia coli* in streams. *Appl Environ Microbiol.* May 1981;41(5):1276-1278.
- 243. Saggiaro A.,** Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome, *J Clin Gastroenterol.* 2004 Jul; 38(6 Suppl):S104-6.
- 244. Saikali J, Picard C, Freitas M, Holt P.,** Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer, *Nutr Cancer.* 2004; 49(1):14-24.
- 245. Saithong P, Panthavee W, Boonyaratanakornkit M, Sikkhamondhol C.,** Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented fish., *J Biosci Bioeng.* 2010 Jul 5.
- 246. M S Salama, W E Sandine and S J Giovannoni,** Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes., *Appl Environ Microbiol.* 1993 November; 59(11): 3941-3945
- 247. 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.
- 248. Salminen S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Lee (1999)** Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10, 107-110.
- 249. 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 4°C in vacuum packages. *Food Microbiol*, 2003, 20:661-669.
- 250. Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M.,** Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis, *World J Gastroenterol.* 2010 Apr 21;16(15):1908-15
- 251. Santamaría P, Garijo P, López R, Tenorio C, Rosa Gutiérrez A.,** Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the

cellar and the practice of inoculation., *Int J Food Microbiol.* 2005 Aug 15;103(1):49-56.

252. Sava IG, Heikens E, Huebner J., Pathogenesis and immunity in enterococcal infections., *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jun;16(6):533-40.

253. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE., Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials., *Lancet Infect Dis.* 2006 Jun;6(6):374-82.

254. Schirmer BC, Heir E, Langsrud S., Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products., *J Appl Microbiol.* 2009 Jun;106(6):2106-16. Epub 2009 Feb 27.

255. Schmidt RJ, Kung L Jr, The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations., *J Dairy Sci.* 2010 Apr;93(4):1616-1624.

256. Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM, Mills DA., The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 2;105(48):18964-9. Epub 2008 Nov 24.

257. Servin AL., Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens., *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Oct;28(4):405-40.

258. Servin AL, Coconnier MH., Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens., *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Oct;17(5):741-54.

259. Shen J, Ran HZ, Yin MH, Zhou TX, Xiao DS., Meta-analysis: the effect and adverse events of Lactobacilli versus placebo in maintenance therapy for Crohn disease., Shen J, Ran HZ, Yin MH, Zhou TX, Xiao DS.



260. **Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M,** Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms., *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e858-69.
261. **Shin MS, Han SK, Ryu JS, Kim KS, Lee WK.,** Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi., *J Appl Microbiol*. 2008 Aug;105(2):331-9. Epub 2008 Jun 6.
262. **Simrén M, Ohman L, Olsson J, Svensson U, Ohlson K, Posserud I, Strid H.,** Clinical trial: the effects of a fermented milk containing three probiotic bacteria in patients with irritable bowel syndrome - a randomized, double-blind, controlled study., *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 Jan 15;31(2):218-27. Epub 2009 Oct 26.
263. **Snelling AM.,** Effects of probiotics on the gastrointestinal tract., *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Oct;18(5):420-6.
264. **Sodini I, Lucas A, Oliveira MN, Remeuf F, Corrieu G.,** Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing., *J Dairy Sci*. 2002 Oct;85(10):2479-88.
265. **Spyrou IM, Karpouzas DG, Menkissoglu-Spiroudi U.,** Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community?, *Microb Ecol*. 2009 Nov;58(4):715-27. Epub 2009 May 14.
266. **Stamatova I, Meurman JH.,** Probiotics: health benefits in the mouth., *Am J Dent*. 2009 Dec;22(6):329-38.
267. **Startor R.B.:** Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, prebiotics. *Gastroenterology* 2004, 126: 1620-1633.
268. **Sun C. Kim, L.G. Harmon,** Relationship Between Some Chlorinated Hydrocarbon Insecticides and Lactic Culture Organisms in Milk, *Journal of Dairy Science*, Volume 53, Issue 2, February 1970, Pages 155-160

269. **Svensson U.:** Industrial perspectives in probiotics: A critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham U.K., 1999: 45-51.
270. **Szymański H, Armańska M, Kowalska-Duplaga K, Szajewska H.,** Bifidobacterium longum PL03, Lactobacillus rhamnosus KL53A, and Lactobacillus plantarum PL02 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized controlled pilot trial., *Digestion.* 2008; 78(1):13-7. Epub 2008 Aug 14.
271. **Τριαντάφυλλος Αλμπάνης,** «ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ, 1999.
- 272.. **Τριαντάφυλλος Α.Δ. Αλμπάνης,** ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ «ΧΡΗΣΗ, ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ», Ιωάννινα 1997, σελ.1-2.
273. **Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Ιωάννης Κωνσταντίνου και Δήμητρα Χελά,** ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ) ΣΤΑ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ, σημειώσεις στο ΔΠΜΣ «ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ».
274. **Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ.,** Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1.
275. **Teanpaisan R, Hintao J, Dahlén G.,** Oral Lactobacillus species in type 2 diabetic patients living in southern Thailand., *Anaerobe.* 2009 Aug;15(4):160-3.
276. **Temmerman R., G. Huys, B. Pot and J. Swings** (2001) Identification and antibiotic resistance of isolates from probiotic products. Abstracts of 101st ASM General Meeting C-289.
277. **Todorov SD, Dicks LM.,** Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza., *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2004 Aug;31(7):323-9. Epub 2004 Jul 14.

- 278. Tok E, Aslim B.**, Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic., *Microbiol Immunol.* 2010 May;54(5):257-64.
- 279. Trafalska E, Grzybowska K.**, [Probiotics--an alternative for antibiotics?], *Wiad Lek.* 2004;57(9-10):491-8.
- 280. Tuomola E.M., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri and S. Salminen (2000)** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, S393-S398.
- 281. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, Cagnasso P, Bizzarri B, de'Angelis GL, Shanahan F, van Sinderen D, Ventura M.**, Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract., *Appl Environ Microbiol.* 2009 Mar;75(6):1534-45. Epub 2009 Jan 23.
- 282. Turrone F, Marchesi JR, Foroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M.**, Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut., *ISME J.* 2009 Jun;3(6):745-51. Epub 2009 Mar 19
- 283. Turrone F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M.**, Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality., *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Jun;94(1):35-50. Epub 2008 Mar 13.
- 284. Uchida K, Akashi K, Motoshima H, Urashima T, Arai I, Saito T.**, Microbiota analysis of Caspian Sea yogurt, a ropy fermented milk circulated in Japan., *Anim Sci J.* 2009 Apr;80(2):187-92.
- 285. Van der Merwe IR, Bauer R, Britz TJ, Dicks LM.**, Characterization of thoenicin 447, a bacteriocin isolated from *Propionibacterium thoenii* strain 447., *Int J Food Microbiol.* 2004 Apr 15;92(2):153-60.
- 286. Vandenplas Y, Brunser O, Szajewska H.**, *Saccharomyces boulardii* in childhood., *Eur J Pediatr.* 2009 Mar;168(3):253-65. Epub 2008 Dec 19.

287. Vanhee LM, Goemé F, Nelis HJ, Coenye T., Quality control of fifteen probiotic products containing *Saccharomyces boulardii*., *J Appl Microbiol.* 2010 Jun 18. [Epub ahead of print]
288. Vassos D, Bezirtzoglou E, Voidarou C, Alexopoulos A, Maipa V., Survey of probiotic enterococci from traditional dairy products and their impact upon the infant intestinal microbiota., *J Gen Appl Microbiol.* 2009 Aug;55(4):311-5.
289. Vela AI, García N, Latre MV, Casamayor A, Sánchez-Porro C, Briones V, Ventosa A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF., *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine., *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Jun;57(Pt 6):1291-4.
290. Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R., Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria., *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2004 Oct;86(3):205-23.
291. Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, Cresci A., Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces., *Eur J Nutr.* 2009 Sep;48(6):355-63. Epub 2009 Apr 14.
292. Vesa T., P. Marteau and R. Korpela (2000) Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 165S-175S.
293. Vivatvakin B, Kowitdamrong E., Randomized control trial of live *Lactobacillus acidophilus* plus *Bifidobacterium infantis* in treatment of infantile acute watery diarrhea., *J Med Assoc Thai.* 2006 Sep;89 Suppl 3:S126-33.
294. Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME, Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review., *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Sep;34(3):197.e1-10. Epub 2009 Jan 28.
295. Vryzas Zisis, Tsaboula Ageliki, Papadopoulou-Mourkidou Euphemia, Determination ofalachlor, metolachlor, and their acidic metabolites in soils by microwave-assisted extraction (MAE) combined with solid phase extraction (SPE) coupled with GC-MS and HPLC-UV analysis, *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2529 – 2538

- 296. Wallbanks S, Martinez-Murcia AJ, Fryer JL, Phillips BA, Collins MD.,** 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov., *Int J Syst Bacteriol.* 1990 Jul;40(3):224-30.
- 297. Weichselbaum E.,** Potential benefits of probiotics - main findings of an in-depth review., *Br J Community Nurs.* 2010 Mar;15(3):110-4.
- 298. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, Kiely B, Shanahan F, Quigley EM.,** Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome., *Am J Gastroenterol.* 2006 Jul;101(7):1581-90.
- 299. Williams NT.,** Probiotics., *Am J Health Syst Pharm.* 2010 Mar 15;67(6):449-58.
- 300. Wullt M, Johansson Hagslätt ML, Odenholt I, Berggren A.,** *Lactobacillus plantarum* 299v enhances the concentrations of fecal short-chain fatty acids in patients with recurrent *clostridium difficile*-associated diarrhea., *Dig Dis Sci.* 2007 Sep;52(9):2082-6. Epub 2007 Apr 10.
- 301. Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K, Hiramatsu A, Iwatsuki K, Kokubo S, Hosono A.,** Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers., *J Dairy Sci.* 2003 Jul;86(7):2452-61.
- 302. Yan F, Polk DB,** Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases., *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 Mar;26(2):95-101.
- 303. Yoo KS, Kim JE, Seo EY, Kim YJ, Choi HY, Yoon HS, Kim MD, Han NS.,** Improvement in Sensory Characteristics of Campbell Early Wine by adding Dual Starters of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni.*, *J Microbiol Biotechnol.* 2010 Jul;20(7):1121-7.

304. **Yurovskaya EM.** Behaviour and indicator value of some microorganisms under conditions of soil contamination by pesticides. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1975;19:10-6.
305. **Zhang C, Xu J, Liu X, Dong F, Kong Z, Sheng Y, Zheng Y.,** Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils., *Chemosphere.* 2010 Jul 24.
306. **Zhong Y, Huang CY, He T, Harmsen HM.,** [Effect of probiotics and yogurt on colonic microflora in subjects with lactose intolerance], *Wei Sheng Yan Jiu.* 2006 Sep;35(5):587-91.
307. **Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y.,** Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro., *Acta Odontol Scand.* 2010 May 21. [Epub ahead of print]
308. **Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y.,** Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro., *Acta Odontol Scand.* 2010 Sep;68(5):261-8.
309. **Zigra PI, Maipa VE, Alamanos YP.,** Probiotics and remission of ulcerative colitis: a systematic review., *Neth J Med.* 2007 Dec;65(11):411-8.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

1. <http://www.agrotypos.gr>
2. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/
3. http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/pesticides/index_en.html
4. <http://www.minagric.gr>
5. <http://www.lib.teiher.gr>
6. <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/microsites>
7. <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/index.html>
8. <http://cw.prenhall.com/bookbind/pubbooks/brock/>
9. <http://www.live-pedia.com>



ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Κοινοτική οδηγία (2008) για υπολείμματα φυτοφαρμάκων.

Until 1 September 2008, the legislation for pesticide residues was a shared responsibility of the Commission and the Member States. Since 1976, more than 45.000 Community MRLs have been set for various commodities for 245 pesticides on cereals (Directive 86/362/EEC), foodstuff of animal origin (Directive 86/363/EEC), fruit and vegetables and other plant products (Directive 76/895/EEC and Directive 90/642/EEC). For the tens of thousands of pesticide/commodity combinations for which no Community MRLs existed, Member States could set MRLs at national level to facilitate trade and to protect the health of their consumers.

However, safety of consumers in one country does not necessarily mean that all consumers in the EU are protected, because food consumption patterns differ from one Member State to another. Nowadays food and feed circulate freely on the EU internal market, and therefore it is indispensable to assure that all EU consumers are equally protected from the exposure to unacceptable levels of pesticides in their food.

As from 1 September 2008, Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels (MRLs) of pesticides in products of plant and animal origin defines a **new fully harmonised** set of rules for pesticide residues. This Regulation simplifies the existing legislation by harmonising pesticide MRLs and making them directly applicable.

The Annexes to Reg. (EC) No 396/2005 specify the MRLs and the products to which they apply.

Annex I is the list of products to which the MRLs apply. Annex I has been established by Commission Regulation (EC) No 178/2006. It contains 315 products, including fruits, vegetables, spices, cereals, animal products.

Annex II is the list of EU definitive MRLs and it consolidates the existing EU legislation before 1 September 2008. It specifies MRLs for 245 pesticides.

Annex III is the list of the so-called EU temporary MRLs. It is the result of the harmonisation process as it lists pesticides for which, before 1 September 2008, MRLs were only set at national level. It specifies MRLs for 471 pesticides.

Annex IV is the list of pesticides (52) for which no MRLs are needed because of their low risk.

Annex V will contain the list of pesticides for which a default limit other than 0,01 mg/kg will apply. This Annex has not been published yet.

Annex VI will contain the list of conversion factors of MRLs for processed commodities. This Annex has not been published yet.

Annex VII contains a list of pesticides used as fumigants for which the Member States are allowed to apply special derogations before the products are placed on the market.



If a pesticide is not included in any of the above mentioned Annexes the default MRL of 0,01 mg/kg applies (Art 18(1b) of Reg. (EC) No 396/2005) (17).

