

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Εκτίμηση μικροβιολογικών κινδύνων-καθορισμός μικροβιολογικών κριτηρίων

- Προκειμένου να εκτιμηθεί η καταλληλότητα ή επικινδυνότητα των τροφίμων καθώς και η αποτελεσματικότητα των μεθόδων επεξεργασίας των τροφίμων χρησιμοποιούνται εκτός των άλλων και μικροβιολογικά κριτήρια.
- Ο αριθμός και ο τύπος των μικροοργανισμών αποτελεί ένα από τα συνηθισμένα κριτήρια. Επειδή είναι τεχνικά δύσκολο ως αδύνατο η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα τροφίμων χρησιμοποιούνται κάποιοι μικροοργανισμοί-δείκτες. Η παρουσία αυτών των δεικτών θα πρέπει να είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παρουσία παθογόνων ή τοξινών στα τρόφιμα και με την συνολική ποιότητα των τροφίμων

Ανάγκη καθορισμού μικροβιολογικών κριτηρίων

- Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιβάλλουν τον καθορισμό μικροβιολογικών κριτηρίων είναι: 1) η ένδειξη κινδύνου για την δημόσια υγεία που βασίζεται σε επιδημιολογικά δεδομένα 2) Η φύση της φυσιολογικής χλωρίδας των τροφίμων και η ικανότητα τους να υποστηρίξουν την μικροβιολογική ανάπτυξη 3) Η πιθανότητα μόλυνσης και μικροβιακής ανάπτυξης κατά την διάρκεια της παρασκευής, αποθήκευσης και διανομής των τροφίμων 4) Η κατηγορία των καταναλωτών που μπορεί να βρεθεί σε κίνδυνο 5) Η αξιοπιστία των μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των μικροοργανισμών και των τοξινών τους στα τρόφιμα 6) Το κόστος και τα οφέλη που προκύπτουν από την εφαρμογή συγκεκριμένων κριτηρίων

Μικροοργανισμοί-δείκτες

- Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών δεικτών παρέχει γρήγορες και αξιόπιστες πληροφορίες για πιθανά προβλήματα κατά την παρασκευή και επεξεργασία των τροφίμων, μόλυνσης τους κατά την διανομή και αποθήκευση και την γενικότερη ποιότητα τους.
- Προτείνεται ότι οι ιδανικοί μικροοργανισμοί δείκτες θα πρέπει: 1) να βρίσκονται πάντα στα τρόφιμα των οποίων η ποιότητα θέλουμε να εκτιμηθεί 2) Η αύξηση και ο αριθμός τους να έχει άμεση αρνητική συσχέτιση με την ποιότητα 3) Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση τους να είναι εύκολη και διακριτή από άλλους μικροοργανισμούς 4) Η ανάπτυξη τους να μην παρεμποδίζεται από άλλους μικροοργανισμούς της τροφικής χλωρίδας

Μικροοργανισμοί-δείκτες (συνέχεια)

- Κάποιοι μικροοργανισμοί-δείκτες που σχετίζονται με συγκεκριμένα τρόφιμα είναι: *Lactococcus lactis* στο γάλα, *Leuconostoc mesenteroides* στην ζάχαρη, *Pseudomonas putrefaciens* στο βούτυρο, *Pectinatus cerevisiiphilus* στην μπύρα.
- Σε κάποιες περιπτώσεις η παρουσία διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών έχει επίπτωση στην ποιότητα των τροφίμων. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιο πρακτικό να γίνει ποσοτικοποίηση ομάδων μικροοργανισμών και όχι μεμονωμένων ειδών. Αυτό γίνεται με τον προσδιορισμό της τιμής CFU με ότι μειονεκτήματα έχει, την άμεση μικροσκοπική μέτρηση των μικροοργανισμών η οποία όμως δεν είναι πρακτική για όλα τα τρόφιμα και άλλες μεθόδους.

Βακτηριακά μεταβολικά προϊόντα ως μικροβιολογικά κριτήρια

- Πολλές φορές ως μικροβιολογικό κριτήριο επιλέγεται όχι η ταυτοποίηση μικροοργανισμών αλλά η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολικών τους προϊόντων.
- Παραδείγματα μεταβολικών προϊόντων που αποτελούν δείκτη αποσύνθεσης των τροφίμων είναι η καθαβερίνη και η πούτρεσκίνη πχ στο κρέας
- Το γαλακτικό οξύ στα κονσερβοποιημένα λαχανικά, η τριμεθυλαμίνη στα ψάρια, η ισταμίνη στον κονσερβοποιημένο τόνο, πτηνικά λιπαρά οξέα στο βούτυρο κ.α.

Δείκτες παθογόνων μικροοργανισμών και τοξινών τους στα τρόφιμα

- Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα ομαδοποιούνται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητας: 1) Μεγάλη επικινδυνότητα (*Clostridium botulinum*, *Shigella dysenteriae*) 2) Μέτριας επικινδυνότητας αλλά εκτεταμένης εξάπλωσης (*Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes*) 3) Μέτριας επικινδυνότητας περιορισμένης εξάπλωσης (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*).
- Η παρουσία παθογόνων αναλόγως και με τα επίπεδα τους είναι ενδεικτική της επικινδυνότητας των τροφίμων. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ανίχνευση παθογόνων δεν σημαίνει κατά ανάγκη και επικινδυνότητα πχ στα φρέσκα λαχανικά έχει παρατηρηθεί ανίχνευση *Clostridium botulinum* αλλά επιδημιολογικά δεδομένα δεν συνδέουν την παρουσία του παθογόνου αυτού με κίνδυνο για τον καταναλωτή.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Δείκτες παθογόνων μικροοργανισμών και τοξινών τους στα τρόφιμα (συνέχεια)

- Η φύση των τροφίμων μπορεί να είναι τέτοια (πχ οξύτητα) ώστε να περιορίζει την ανάπτυξη κάποιων παθογόνων έστω και αν έχουν μολύνει το τρόφιμο, ενώ για κάποια άλλα παθογόνα αυτό δεν ισχύει.
- Η εκτίμηση της επικινδυνότητας μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να γίνει με την βοήθεια μεταβολικών προϊόντων και τοξινών και όχι με απευθείας ταυτοποίηση των παθογόνων. Έτσι για παράδειγμα στο τυρί μπορεί να ανιχνευτεί σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη ενδεικτική μόλυνσης, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνάει το 1 μg/100 g ή αφλατοξίνη στα φιστίκια που δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 15 μg/kg.

Κλασική ανάλυση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα

- Κάποια συνηθισμένα προβλήματα στην κλασική μικροβιακή ανάλυση των τροφίμων για την ανίχνευση παθογόνων είναι τα παρακάτω: ετερογένεια της σύστασης των τροφίμων (διάφορα συστατικά, η συγκέντρωση των οποίων ποικίλει ακόμα και σε μικρή απόσταση), ανομοιογενής κατανομή των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, διαφορές στην μορφή και ρευστότητα των τροφίμων, παρουσία άλλων μικροοργανισμών (φυσική χλωρίδα)
- Η παρουσία της φυσιολογικής χλωρίδας και της διαφοροποιημένης σύστασης των τροφίμων δημιουργεί ακόμη μεγαλύτερα προβλήματα όταν το παθογόνο προς ανίχνευση είναι «τραυματισμένο» όπως δεν μπορεί να ανταγωνιστεί τα υπόλοιπα βακτήρια και να αναπτυχθεί.
- Μία λύση στο πρόβλημα αυτό είναι ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας ώστε επιλεκτικά να ενισχυθεί η ανάπτυξη του προς ανίχνευση παθογόνου. Προεμπλουτισμός είναι η διαδικασία που επιτρέπει στα τραυματισμένα παθογόνα βακτήρια να επιδιορθωθούν σε μη επιλεκτικά θρεπτικά μέσα.

Κλασική ανάλυση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα (συνέχεια)

- Οι συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων που χρησιμοποιούν θρεπτικά υποστρώματα θα πρέπει πάντοτε να συνοδεύονται από βιοχημικές δοκιμασίες που επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα τους.
- Οι συμβατικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ως ρουτίνα αλλά είναι χρονοβόρες άρα δεν είναι η καλύτερη δυνατή λύση όταν η γρήγορη ανίχνευση του παθογόνου είναι αναγκαία.
- Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας βοήθησε στην ανάπτυξη νέων γρηγορότερων και πιο ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης των παθογόνων κάποιες από τις οποίες θα εξετάσουμε εν συντομία.

Μέθοδοι «γρήγορης» ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων στα τρόφιμα

- Ο ορισμός της «γρήγορης» ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων στα τρόφιμα είναι υποκειμενικός. Συνήθως οποιαδήποτε τροποποίηση υπάρχουσας μεθόδου επιφέρει μικρότερη του χρόνου ανίχνευσης των παθογόνων ή η χρησιμοποίηση μιας καινούριας μεθόδου μικρότερης χρονικής διάρκειας σε σχέση με τις υπάρχουσες θεωρείται «γρήγορη».
- Οι όροι ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλές φορές χρησιμοποιούνται ως συνώνυμοι. Ταυτοποίηση είναι η απομόνωση καθαρής καλλιέργειας ενός παθογόνου από τρόφιμα και ο καθορισμός του είδους του. Από την άλλη μεριά ως ανίχνευση ορίζεται η εύρεση της παρουσίας ενός παθογόνου χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωση του από τα τρόφιμα.

Βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης παθογόνων

- Τα βακτήρια που απομονώνονται από τα τρόφιμα θα πρέπει να ταυτοποιηθούν από τις βιοχημικές τους ιδιότητες που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα βακτηριακά είδη ή γένη. Η δημιουργία ενός «βιοχημικού προφίλ» είναι μια επίπονη, χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί μια σειρά ενζυμικών μετρήσεων και χρήσης πολλών διαφορετικών θρεπτικών μέσων.
- Η σμίκρυνση των δοκιμών αυτών οδήγησε σε σημαντική μείωση του χρόνου ταυτοποίησης και εξοικονόμησης αντιδραστηρίων. Υπάρχουν στο εμπόριο διαφορετικά «kit» τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την βιοχημική ταυτοποίηση βακτηρίων
- Τα περισσότερα από αυτά περιέχουν τουλάχιστον 20-30 διαφορετικά θρεπτικά μέσα και ενζυμικά υποστρώματα επιλεγμένα έτσι ώστε να ταυτοποιούν συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων ή βακτηριακά είδη.



ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης παθογόνων (συνέχεια)

- Τα περισσότερα από αυτά τα «κιτ» δίνουν αποτελέσματα μετά από 18-24 ώρες επώασης. Η ακρίβεια ταυτοποίησης των «κιτ» είναι της τάξεως του 90-99% η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή των κλασικών μεθόδων. Τα περισσότερα από αυτά είναι σχεδιασμένα για την ταυτοποίηση εντεροβακτηρίων, αλλά υπάρχουν διαθέσιμα και άλλα που ταυτοποιούν *Campylobacter*, *Listeria*, αναερόβια βακτήρια, Gram-θετικά βακτήρια κτλ.
- Υπάρχουν κάποια αυτοματοποιημένα συστήματα (πχ το Vitek από την εταιρεία bioMerieux) τα οποία τα οποία ελέγχουν συνεχώς τις αλλαγές των βιοχημικών αντιδράσεων, δημιουργούν αυτόματα το βιοχημικό προφίλ και το συγκρίνουν με την βάση δεδομένων που υπάρχει ενσωματωμένη στο σύστημα και βγάζουν το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης. Ένα άλλο αυτοματοποιημένο σύστημα (το M15 από την εταιρεία Microbial-ID) χρησιμοποιεί αέρια χρωματογραφία για να δημιουργήσει το προφίλ των λιπαρών οξέων των βακτηρίων και το συγκρίνει με την βάση δεδομένων προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση.

Μέτρηση ολικού βακτηριακού φόρτου βασισμένη στο βακτηριακό ATP

- Βιοφωτομετρικές μέθοδοι που ανιχνεύουν το βακτηριακό ATP είναι κοινή πρακτική στην μικροβιακή ανάλυση τροφίμων. Τα κύρια συστατικά αυτών των μεθόδων είναι το ένζυμο λουσιφεράση, το υπόστρωμα λουσιφερίνη, και ιόντα μαγνησίου. Με την βοήθεια ATP η λουσιφερίνη οξειδώνεται από το ένζυμο λουσιφεράση με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός.
- Το ATP των βακτηρίων που περιέχεται στο προς ανάλυση δείγμα, ενεργοποιεί την οξείδωση της λουσιφερίνης από την λουσιφεράση και το φως που παράγεται είναι σε αναλογία με τον αριθμό βακτηρίων που περιέχονται στο δείγμα και μπορεί να μετρηθεί. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ γρήγορη (10 λεπτά) και ευαίσθητη καθώς μπορεί να ανιχνεύσει 10^4 CFU/ml

Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα

- Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων μπορούν να ανιχνευτούν και με μεθόδους βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα και πιο συγκεκριμένα του DNA. Η ανίχνευση γονιδίων των παθογόνων γίνεται με τον υβριδισμό DNA-DNA (Southern blot). Επισημασμένα ολιγονουκλεοτίδια (probes) υβριδίζονται με το DNA του παθογόνου και ο υβριδισμός ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία ή χρωματομετρικά.
- Το γεγονός ότι τα βακτηριακά γονίδια που κωδικοποιούν rRNA βρίσκονται σε πολλά αντίτυπα και είναι χαρακτηριστικά του κάθε είδους επιτρέπει την μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί εμπλουτισμό καλλιέργειας.

Η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

- Η αρχή πάνω στην οποία στηρίζεται η μέθοδος δεν είναι τίποτα άλλο από την in vitro αντιγραφή του DNA. Τα βασικά συστατικά της είναι: οι εκκινήτες (primers), τα 4 νουκλεοτίδια του DNA, η DNA πολυμεράση, και το DNA-στόχος αντίγραφο του οποίου θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.
- Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολλών διαφορετικών παθογόνων αλλά η απευθείας εφαρμογή της στα τρόφιμα παρουσιάζει κάποιες δυσκολίες εξαιτίας της παρουσίας αναστολέων. Για παράδειγμα τρόφιμα τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη μπορεί να περιέχουν ένζυμα (πχ πρωτεάσες) που αναστέλλουν την PCR για αυτό τον λόγο τις περισσότερες φορές χρειάζεται εμπλουτισμός των παθογόνων πριν την PCR.

Σχηματική αναπαράσταση της PCR



Χρήση φάγων για την ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα

- Η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των φάγων με τους ξενιστές τους επιτρέπει την χρησιμοποίησή τους για την ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα. Μέθοδοι που βασίζονται στον βιοφωτισμό εφαρμόζονται με την βοήθεια τροποποιημένων φάγων που φέρουν το οπερόνιο lux το οποίο κωδικοποιεί βακτηριακή λουσιφεράση. Όσο ο τροποποιημένος φάγος βρίσκεται εκτός του ξενιστή το οπερόνιο δεν εκφράζεται και δεν παράγεται φως αλλά όταν ο φάγος μολύνει τον ξενιστή αρχίζει η έκφραση του οπερόνιου και παράγεται φως το οποίο μπορεί να μετρηθεί και με την βοήθεια μιας καμπύλης αναφοράς να δώσει ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα για το είδος και τον αριθμό των παθογόνων.
- Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και ευαίσθητη. Μπορούν μέσα σε 100 λεπτά να ανιχνευθούν 10^2 - 10^3 κύτταρα *E. coli* σε δείγμα γάλακτος χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό καλλιέργειας. Παρόμοια αποτελέσματα δίνει και για την *Salmonella*.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα που βασίζονται στα αντισώματα

- Η μέθοδος ενζυμοσύνδετης ανοσοαπορρόφησης (ELISA) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων με την χρήση αντισωμάτων. Υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο αρκετά kit που χρησιμοποιούν την sandwich ELISA για την ανίχνευση παθογόνων.
- Σε ένα πλαστικό πιάτο το οποίο είναι καλυμμένο με αντισώματα τοποθετείται το δείγμα αντιγόνου (βακτήριο ή τοξίνη) όπου και δεσμεύεται από το αντίσωμα. Στην συνέχεια προστίθεται ποσότητα του ίδιου αντισώματος και τέλος ένα σύμπλοκο αντισώματος- ενζύμου (αλκαλική φωσφατάση, περοξειδάση από ραπανάκι) το οποίο συνδέεται με το πρώτο αντίσωμα. Η περίσσεια αντισωμάτων ξεπλένεται και στην συνέχεια προστίθεται υποστρώμα το οποίο μετατρέπεται από το ένζυμο του συμπλόκου σε προϊόν που ανιχνεύεται χρωματομετρικά.
- Η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει 10^4 - 10^5 CFU/ml για αυτό κάποιες φορές χρειάζεται εμπλουτισμός. Αυτοματοποιημένη η μέθοδος είναι γρήγορη και χρειάζεται 45 λεπτά.

Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου sandwich ELISA



Ανοσοσομαγνητικός διαχωρισμός

- Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με μαγνητικά σωματίδια. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται δέσμευση των παθογόνων και εμπλουτισμός του δείγματος που στην συνέχεια μπορεί να αναλυθεί με άλλες μεθόδους πχ PCR.
- Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι πιο γρήγορη από την κλασική μέθοδο εμπλουτισμού που χρησιμοποιεί επιλεκτικά θρεπτικά μέσα και αντιβιοτικά. Επιπλέον η μέθοδος αυτή είναι ηπιότερη και δεν προκαλεί στρες ή τραυματισμό των βακτηρίων.
- Η μέθοδος χρησιμοποιείται με επιτυχία για τον εμπλουτισμό *Listeria*, *Salmonella* και *E.coli* O157:H7

Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)

- Η μέθοδος αυτή άρχισε να χρησιμοποιείται πρόσφατα για την ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα και κερδίζει συνεχώς έδαφος.
- Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της sandwich ELISA με την διαφορά ότι το αντίσωμα που αντιδρά με το αντιγόνο αντί να σχηματίζει σύμπλοκο με κάποιο ένζυμο, σχηματίζει σύμπλοκο με σωματίδια χρωματιστού latex.
- Το δείγμα τοποθετείται σε ένα πλαστικό stick μιας χρήσης και εάν περιέχει το αντιγόνο αντιδρά με το αντίσωμα με το latex με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ίζηματος το οποίο λόγω των χρωματιστών σωματιδίων φαίνεται με το μάτι. Σε ένα δεύτερο θάλαμο του stick υπάρχει αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντίσωμα με τα σωματίδια latex και σχηματίζει και αυτό ίζημα. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά γρήγορη (10-15 λεπτά) αλλά απαιτεί εμπλουτισμό του δείγματος.
- Ιστοσελίδα που περιγράφει το http://neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/Page_55.pdf

Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

- Η βασική αρχή πάνω στην οποία στηρίζονται οι μικροσυστοιχίες DNA είναι ο υβριδισμός DNA- DNA. Η τεχνολογία αυτή δανείστηκε την φωτολιθογραφία από την κατασκευή μικροπεξεργαστών ηλεκτρονικών υπολογιστών για την «εκτύπωση» DNA ολιγονουκλεοτιδίων σε γυαλί ή πλαστική μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο ολιγονουκλεοτιδία τα οποία αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού μπορούν να τοποθετηθούν σε συστοιχίες πάνω σε ένα DNA chip. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για μελέτες γονιδιακής έκφρασης (transcriptomics) σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος.
- Τα ολιγονουκλεοτιδία που αποτελούν την μικροσυστοιχία συνθέτονται είτε in situ, είτε με PCR και στην συνέχεια τοποθετούνται πάνω στο DNA chip. Επίσημο DNA του δείγματος που εξετάζεται υβριδίζεται με τα ολιγονουκλεοτιδία της μικροσυστοιχίας.



Μικροσυστοιχίες DNA (συνέχεια)

- Στο εμπόριο είναι διαθέσιμες μικροσυστοιχίες DNA για διάφορους μικροοργανισμούς (*Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) με πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αυτές που διαθέτει η εταιρεία Affymetrix.
- Στην ανάλυση τροφίμων στόχος είναι η δημιουργία μικροσυστοιχιών που να επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση όχι μόνον πολλών παθογόνων αλλά και να παρέχουν πληροφορίες για τη μολυσματική ικανότητα των παθογόνων
- DNA micro array methodology-Flash animation: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html>

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Μικροβιακές ασθένειες που μεταδίδονται με τα τρόφιμα

- Οι μικροβιακές ασθένειες που μεταδίδονται με τα τρόφιμα χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: αυτές που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν προσχηματισμένες τοξίνες. Στις περιπτώσεις αυτές ο παθογόνος μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στον ξενιστή (πολλές φορές μάλιστα δεν είναι καν ζωντανός όταν καταναλώνεται το τρόφιμο που τον περιέχει) αλλά η ασθένεια προκαλείται από την δράση της τοξίνης και μόνο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: η εξωτοξίνη της αλλαντίασης (*Clostridium botulinum*) και η υπεραντιγονική τοξίνη του *Staphylococcus aureus*.
- Στην δεύτερη κατηγορία ο παθογόνος μικροοργανισμός μολύνει τον ξενιστή αναπτύσσεται σε αυτόν και προκαλεί την ασθένεια. Οι περισσότερες ασθένειες των τροφίμων ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.. Τυπικό παράδειγμα είναι η σαλμονέλλωση.

Τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο

- Συχνά τροφική δηλητηρίαση προκαλείται από τον *Staphylococcus aureus*. Το βακτήριο αυτό βρίσκεται συχνά στο δέρμα και το αναπνευστικό σύστημα χωρίς να προκαλεί τις περισσότερες φορές ασθένεια αλλά όταν βρεθεί και αναπτυχθεί στα τρόφιμα παράγει εντεροτοξίνες που είναι αρκετά ανθεκτικές στην θερμική επεξεργασία με αποτέλεσμα να προκαλούν γαστρεντερίτιδα που χαρακτηρίζεται από ναυτία, διάρροια, και εμετό.
- Τα τρόφιμα που εμπλέκονται τις περισσότερες φορές σε τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο είναι: πουλερικά, σαλάτες που περιέχουν αυγά, σάλτσες κ.α.. Τα τρόφιμα αυτά όταν διατηρούνται στο ψυγείο είναι ασφαλή. Στην περίπτωση που μολυνθούν από κάποιο φορέα του σταφυλόκοκκου σε θερμοκρασία δωματίου και παραμένουν σε αυτήν για κάποιες ώρες τότε δημιουργείται πρόβλημα.

Παθογένεια τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκο

- Ο *Staphylococcus aureus* παράγει 7 διαφορετικές εντεροτοξίνες: A, B, C1, C2, C3, D και E. Η εντεροτοξίνη A είναι αυτή που σχετίζεται πιο συχνά με τροφική δηλητηρίαση και ανήκει στην κατηγορία των υπεραντιγονικών τοξινών. Οι τοξίνες αυτές ενεργοποιούν μεγάλους αριθμούς Τ λεμφοκυττάρων που με την σειρά τους απελευθερώνουν κυτοκίνες με αποτέλεσμα γενικευμένη εντερική φλεγμονή που οδηγεί σε γαστρεντερίτιδα.
- Η εντεροτοξίνη A κωδικοποιείται από το χρωμοσωμικό γονίδιο entA, αλλά οι εντεροτοξίνες τύπου B και C μπορούν να κωδικοποιούνται από πλασμίδια ή φάγους σε λυσιογόνια.

Διάγνωση, θεραπεία και πρόληψη

- Ανοσολογικές μέθοδοι, συνήθως ELISA, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση εντεροτοξίνης A ή εξωνουκλεάσης του σταφυλόκοκκου. Η μέθοδος αυτή είναι διαγνωστική και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βακτηριακής μόλυνσης. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει προσδιορισμός της τιμής CFU/ml με την βοήθεια επιλεκτικού θρεπτικού μέσου μεγάλης αλατότητας (7.5 % χλωριούχο νάτριο ή χλωριούχο λίθιο).
- Η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο διαρκεί περίπου 48 ώρες. Σε κάποιες σοβαρές περιπτώσεις πρέπει να προληφθεί η αφυδάτωση. Χρήση αντιβιοτικών είναι άχρηστη γιατί η δηλητηρίαση προκαλείται από προσχηματισμένη τοξίνη και όχι από βακτηριακή ανάπτυξη.
- Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην παρασκευή και κυρίως συντήρηση τροφίμων που μπορούν να μολυνθούν από σταφυλόκοκκο. Η συντήρηση στο ψυγείο και η γρηγορότερη δυνατή κατανάλωση των τροφίμων, είναι ο καλύτερος τρόπος πρόληψης.

Τροφική δηλητηρίαση από *Clostridium perfringens*

- Το βακτήριο αυτό είναι αναερόβιο Gram-θετικό, σχηματίζει ενδοσπόρια, και βρίσκεται συχνά στο έδαφος. Επίσης σε μικρούς αριθμούς βρίσκεται και στο έντερο πολλών ζώων . Η τροφική δηλητηρίαση από το βακτήριο αυτό είναι από τις πιο συχνές στον δυτικό κόσμο.
- Η δηλητηρίαση προκύπτει μετά από κατάποση μεγάλης δόσης του βακτηρίου (μεγαλύτερης από 10^8 βακτήρια) σε μη καλά μαγειρεμένα πουλερικά, κρέας και ψάρια. Ενδοσπόρια του βακτηρίου που περιέχονται στην μη καλά μαγειρεμένη τροφή εκβλαστάνουν σε ανοξικές συνθήκες όταν η τροφή παραμείνει για λίγες ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την κατανάλωση τα βακτήρια στο έντερο αρχίζουν να ποριώνονται και παράγουν εντεροτοξίνη με αποτέλεσμα διάρροια και κοιλιακούς πόνους. Πυρετός και εμετός συνήθως δεν παρατηρούνται. Η έναρξη της δηλητηρίασης παρατηρείται 7-15 ώρες μετά την κατανάλωση τροφής και σταματάει συνήθως μετά από 24 ώρες.

Διάγνωση, θεραπεία, πρόληψη

- Η διάγνωση της τροφικής δηλητηρίασης από *Clostridium perfringens* γίνεται με απομόνωση του βακτηρίου από τα κόπρανα ή ακόμη πιο αξιόπιστα με την ανίχνευση της εντεροτοξίνης του με ELISA.
- Η δηλητηρίαση διαρκεί 24 ώρες και τις περισσότερες φορές δεν απαιτείται θεραπευτική αγωγή αν και υπάρχουν διαθέσιμα αντιδότες για την εντεροτοξίνη.
- Η καλύτερη πρόληψη είναι η αποφυγή μόλυνσης του φαγητού κατά την παρασκευή του και κυρίως το σωστό μαγείρεμα του.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Αλλαντίαση

- Η αλλαντίαση είναι σοβαρή τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από το βακτήριο *Clostridium botulinum* και οδηγεί στο θάνατο. Το βακτήριο βρίσκεται στο έδαφος ή στο νερό και τα ενδοσπόρια του μπορούν να μολύνουν τρόφιμα.. Τα ενδοσπόρια καταστρέφονται μετά την σωστή θερμική επεξεργασία των τροφίμων αλλά αν αυτό δεν γίνει μπορούν να εκβλαστήσουν και αρχίσουν να παράγουν νευροτοξίνη.
- Η τοξίνη αυτή επηρεάζει το αυτόνομο νευρικό σύστημα που ελέγχει την αναπνοή και τον καρδιακό ρυθμό. Η τοξίνη καταστρέφεται με θέρμανση στους 80 βαθμούς για 10 λεπτά, οπότε καλά μαγειρεμένα τρόφιμα ακόμα και εάν την περιέχουν δεν είναι επικίνδυνα..
- Οι περισσότερες περιπτώσεις αλλαντίαςης προκύπτουν από την κατανάλωση τροφίμων που καταναλώνονται ωμά μετά την επεξεργασία τους όπως κονσερβοποιημένα κρέατα και λαχανικά, καπνιστά ψάρια, αλλαντικά.. Η αλλαντίαση δεν είναι ιδιαίτερα συνηθισμένη αλλά έχει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (25%) λόγω αναπνευστικής ή καρδιακής ανεπάρκειας

Διάγνωση, θεραπεία και πρόληψη

- Διάγνωση της αλλαντίαςης γίνεται με ανίχνευση της τοξίνης στο ορό του ασθενούς ή στα τρόφιμα με ανοσολογικές μεθόδους. Τα κλινικά της συμπτώματα ξεκινούν 18-24 ώρες μετά την κατανάλωση της μολυσμένης τροφής.
- Η θεραπεία περιλαμβάνει χορήγηση αντιδότη και μηχανική υποστήριξη της αναπνοής.
- Η πρόληψη απαιτεί σωστή επεξεργασία των τροφίμων (πχ κονσερβοποίηση) ή βράσιμο για 20 λεπτά προκειμένου να καταστραφούν οι τοξίνες.

Σαλμονέλλωση

- Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* είναι Gram-αρνητικά προαιρετικά αερόβια τα οποία ανήκουν στα εντεροβακτήρια όπως το *E.coli*. Σχεδόν όλα τα είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο αλλά το πιο συνηθισμένο παθογόνο των τροφίμων είναι η *Salmonella typhimurium*.
- Τα πουλερικά, τα αυγά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και το κρέας είναι οι πιο συνηθισμένες πηγές σαλμονέλλωσης. Η σαλμονέλλα μπορεί επίσης να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο (μόλυνση μέσω κοπράνων). Οι περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης από *Salmonella* δεν αναφέρονται καν (σύμφωνα με τις στατιστικές μόνο το 4% των περιπτώσεων αναφέρονται)

Παθογένεια

- Η κατανάλωση τροφής που περιέχει 10^5 - 10^8 κύτταρα σαλμονέλας έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση των βακτηρίων στο λεπτό και παχύ έντερο και την έναρξη της μόλυνσης. Τα συμπτώματα ξεκινούν 8-48 ώρες μετά και περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, ρίγος, διάρροια και πυρετό που διαρκούν λίγες μέρες.
- Μετά την ανάρρωση ο ασθενής εξακολουθεί να αποβάλλει την σαλμονέλλα με τα κόπρανα για εβδομάδες. Κάποιοι ασθενείς παρότι είναι ασυμπτωματικοί παραμένουν μολυσματικοί για μήνες ή και χρόνια και είναι χρόνιοι φορείς της σαλμονέλας.

Διάγνωση, θεραπεία, πρόληψη

- Διάγνωση γίνεται από τα κλινικά συμπτώματα, την απομόνωση του βακτηρίου από τα κόπρανα και ανοσολογικές μεθόδους (πχ ανοσοκαθίζηση).
- Η θεραπεία είναι συμπτωματική και η χορήγηση αντιβιοτικών δεν μειώνει τον χρόνο του κύκλου της σαλμονέλλωσης.
- Μαγειρεμένα τρόφιμα τα οποία ζεσταίνονται στους 70 βαθμούς για τουλάχιστον 10 λεπτά θεωρούνται ασφαλή αν καταναλωθούν αμέσως. Κρούσματα σαλμονέλας είναι πολύ πιο συχνά το καλοκαίρι παρά τον χειμώνα.

Παθογόνα στελέχη της *Escherichia coli*

- Η *Escherichia coli* είναι μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου αλλά κάποια στελέχη της είναι παθογόνα και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές εντερικές διαταραχές και ουρολοιμώξεις. Τα παθογόνα αυτά στελέχη ονομάζονται εντεροαιμορραγικά (EHEC). Το στέλεχος που συχνότερα δημιουργεί προβλήματα είναι το *E. coli* O157:H7. Το στέλεχος αυτό μετά την κατάποση του μέσω τροφών ή νερού αναπτύσσεται στο λεπτό έντερο και παράγει μια εντεροτοξίνη που ονομάζεται βεροτοξίνη. Η τοξίνη αυτή προκαλεί αιμορραγική διάρροια και σε κάποιες περιπτώσεις νεφρική ανεπάρκεια.
- Η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης για το στέλεχος αυτό είναι το κρέας και ιδιαίτερα ο κιμάς αν και το νερό και φρέσκα λαχανικά μπορούν επίσης να αποτελέσουν μολυσματική πηγή ιδιαίτερα σε χώρες του τρίτου κόσμου.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Διάγνωση, θεραπεία, πρόληψη

- Διάγνωση γίνεται με απομόνωση του βακτηρίου από τα κόπρανα και ανοσολογική ταυτοποίηση του (ανοσοκαθίζηση). Ανοσολογικά μπορεί να γίνει και ανίχνευση της βεροτοξίνης.
- Η θεραπεία τις περισσότερες φορές είναι συμπτωματική αλλά σε βαριές περιπτώσεις χορηγούνται και αντιβιοτικά (η εκλογή του πιο αποτελεσματικού πρέπει να γίνεται με την βοήθεια αντιβιογράμματος)
- Η αποτελεσματικότερη μέθοδος πρόληψης είναι το πολύ καλό μαγείρεμα του κρέατος και η αποφυγή κατανάλωσης φρέσκων λαχανικών και νερού σε περιοχές όπου οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι οι καλύτερες. Σε κάποιες χώρες η ακτινοβόληση του κρέατος για την καταστροφή του παθογόνου είναι απαραίτητη πριν την διαχείριση του στην αγορά.

Παθογόνα του γένους Campylobacter

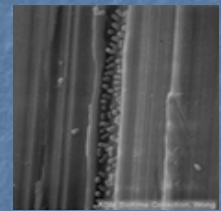
- Τα βακτήρια του γένους Campylobacter είναι Gram-αρνητικά , ραβδόμορφα τα οποία κινούνται με την βοήθεια μαστιγίων και προτιμούν τις μικροαερόφιλικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα είδη C. jejuni και C. coli προκαλούν σοβαρές γαστρεντερίτιδες σε εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Το είδος C. fetus έχει μεγάλη οικονομική σημασία στην κτηνοτροφία καθώς είναι η κυριότερη αιτία στειρότητας στα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή.
- Πηγή μόλυνσης του ανθρώπου είναι τα πουλερικά, το χοιρινό κρέας και τα θαλασσινά. Ειδικότερα το είδος C. jejuni αποτελεί μέρος της εντερικής χλωρίδας των πουλερικών. Αντίθετα σπάνια μεταφέρεται από το βοδινό κρέας. Κάποια περιστατικά μόλυνσης μικρών παιδιών μπορεί να οφείλονται σε επαφή με σκύλους

Παθογένεση, διάγνωση και θεραπεία

- Μετά την κατάποση τουλάχιστον 10^4 Campylobacter, τα βακτήρια αναπτύσσονται στο λεπτό έντερο και εισβάλλουν στον επιθηλιακό ιστό με αποτέλεσμα φλεγμονή. Τα συμπτώματα είναι υψηλός πυρετός (κοντά ή πάνω από 40) πονοκέφαλος, ναυτία διάρροια, έντονοι κοιλιακοί πόνοι. Η ασθένεια διαρκεί 1 εβδομάδα και η ανάρρωση είναι πλήρης
- Η διάγνωση γίνεται με ανοσολογικές μεθόδους, και ταυτοποίηση του βακτηρίου σε καλλιέργειες κοπράνων. Η θεραπεία είναι συμπτωματική (αντιπυρετικά, άφθονο νερό). Η χρήση της ερυθρομυκίνης δεν ελαττώνει την διάρροια αλλά μπορεί να μειώσει την αποβολή βακτηρίων στα κόπρανα.

Λιστερίωση

- Η *Listeria monocytogenes*, είναι Gram-θετικό, ψυχρο και αλατο-ανεκτικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που προκαλεί γαστρεντερική λοίμωξη την λιστερίωση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σηψαιμία και μηνιγγίτιδα.
- Βρίσκεται εκτεταμένα στο έδαφος και το νερό και σχεδόν όλα τα φρέσκα τρόφιμα είναι δυνατόν να μολυνθούν. Κυρίως μεταδίδεται από κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η διατήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες αυτών των τροφών εφόσον είναι μολυσμένες δεν βοηθά γιατί η λιστέρια είναι ψυχροανεκτική.



Παθογένεση, διάγνωση και θεραπεία

- Η *Listeria monocytogenes* είναι ενδοκυτταρικό παθογόνο που αναπτύσσεται μετά την κατάποση της τροφής στα φαγοκύτταρα. Ανάπτυξη του μέσα στα φαγοκύτταρα οδηγεί στην λύση τους και στην μόλυνση γειτονικών τους. Η ανοσοαπόκριση σε αυτό το παθογόνο είναι κυτταρομεσολαβητική και για αυτό ασθενείς του AIDS, και γενικότερα ασθενείς σε ανοσοκαταστολή έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην μόλυνση.
- Η έκθεση στο παθογόνο αυτό είναι μεγάλη αλλά σπάνια οδηγεί στην λιστερίωση. Στην περίπτωση όμως που αυτό συμβεί τότε η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει το 20%. Διάγνωση γίνεται με απομόνωση του βακτηρίου από το αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και με μοριακές μεθόδους όπως η PCR. Χορήγηση των αντιβιοτικών αμπικιλίνη και γενταμικίνη είναι αποτελεσματική

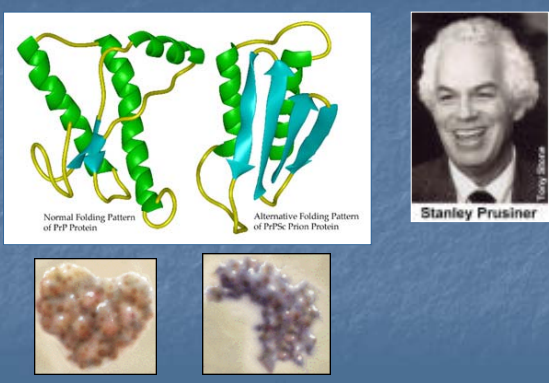
Μεταδιδόμενες σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες

- Οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες είναι νευροεκφυλιστικές νόσοι που προκαλούνται από prions, και οδηγούν στο θάνατο καθώς δεν υπάρχει καμιά θεραπεία.
- Οι εγκεφαλοπάθειες προσβάλλουν τόσο τον άνθρωπο (η *vCreutzfeldt-Jacob*, *kuju*) όσο και πολλά ζώα (*scrapie* στα αιγοπρόβατα , νόσος των τρελών αγελάδων).
- Τα prions είναι ένας τύπος μολυσματικού παράγοντα φτιαγμένος μόνο από πρωτεΐνη. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένα νουκλεϊκό οξύ να περιέχεται στα prions. Οι παράγοντες αυτοί είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί στις πρωτεάσες, την θέρμανση και την ακτινοβολία.. Έρευνα έδειξε ότι η πρωτεΐνη των prions βρίσκεται στους νευρώνες και άλλους κυτταρικούς τύπους υγιών ανθρώπων και ζώων (PrP^C) αλλά η δομή της είναι διαφορετική από αυτήν που βρίσκεται στα μολυσματικά prions (PrP^{Sc}) και είναι ευαίσθητη στις πρωτεάσες την θέρμανση κτλ. Τα prions όταν μολύνουν ένα καινούριο ξενιστή αλλάζουν την δομή της φυσιολογικής PrP^C σε PrP^{Sc}.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

PRIONS: ΠΡΟΤΕΙΝΙΚΟΙ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΕΝΧΥΣΤΕΣ



Normal Folding Pattern of PrP Protein

Alternative Folding Pattern of PrP^{Sc} Prion Protein

Stanley Prusiner

Μεταδιδόμενες σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (συνέχεια)

- Σε κάποιες περιπτώσεις η εγκεφαλοπάθεια μπορεί να θεωρηθεί γενετική ασθένεια καθώς βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γόνιδιο Prnp έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της φυσιολογικής PrP^C σε PrP^{Sc}.
- Στον άνθρωπο η κατανάλωση κρέατος μολυσμένων βοοειδών είναι η κύρια πηγή μόλυνσης. Η επιδημία της νόσου των τρελών αγελάδων κυρίως στο Ηνωμένο Βασίλειο είχε αρκετά θύματα και ακόμα κανείς δεν μπορεί να εκτιμήσει με βεβαιότητα τις μελλοντικές επιπτώσεις στον πληθυσμό.
- Ένα από τα ερωτήματα που δεν έχουν απαντηθεί είναι το πως τα prions φτάνουν στον εγκέφαλο. Κάποιες έρευνες έδειξαν ότι αυτό γίνεται πιθανά μέσω του λεμφικού ιστού του γαστρεντερικού συστήματος αλλά τον ακριβή μηχανισμό κανείς δεν τον γνωρίζει.
- Η μελέτη των prions έχει διευκολυνθεί από το γεγονός ότι prions υπάρχουν και στον σακχαρομύκητα.
- Πρόσφατα (Ιανουάριος 2007 PNAS) διατυπώθηκε η άποψη ότι οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες δεν προκαλούνται από prions αλλά από ιό που δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί και ότι τα prions είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης αυτής.

Χημικά συντηρητικά και φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες

- Οι μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων προστατεύουν τα τρόφιμα από τις βλαβερές επιδράσεις των μικροοργανισμών. Κάποιες μέθοδοι συντήρησης είναι η παστερίωση, η κονσερβοποίηση, η ξήρανση, η ακτινοβόληση, η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, η υψηλή πίεση.
- Η χρήση των χημικών συντηρητικών στα τρόφιμα στοχεύει στην μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης ή στην καταστροφή των παθογόνων. Διακρίνονται σε μικροβιοστατικά και μικροβιοκτόνα. Τα περισσότερα είναι μικροβιοστατικά. Για αυτό η χρήση τους δεν συντηρεί τα τρόφιμα για απεριόριστο χρόνο ούτε καθιστά τα τρόφιμα απολύτως ασφαλή. Τα χημικά συντηρητικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους συντήρησης.
- Κυτταρικοί στόχοι των συντηρητικών είναι διάφορα μεταβολικά ένζυμα, η πρωτεϊνοσύνθεση, η κυτταρική μεμβράνη, η παραγωγή ενέργειας κτλ. Τις περισσότερες φορές επιδρούν σε περισσότερους από έναν στόχο και ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους είναι δύσκολο να μελετηθεί.

Φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες ζωικής προέλευσης (Λυσοζύμη)

- Η λυσοζύμη περιέχεται στα αυγά, το γάλα, στο σάλιο, στα δάκρυα και σε άλλες εκκρίσεις των θηλαστικών, στα ψάρια και έντομα. Είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 14,6 kDa με αντιμικροβιακή δράση. Διασπά γλυκοζιτικούς δεσμούς ανάμεσα στην ακετυλογλουκοζαμίνη και το ακετυλομουραμικό οξύ που είναι τα κύρια συστατικά της πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων.
- Είναι πιο δραστική ενάντια στα Gram-θετικά βακτήρια λόγω της περισσότερης πεπτιδογλυκάνης που περιέχουν και επειδή δεν έχουν λιποπολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τους τοίχωμα που δρουν προστατευτικά στην περίπτωση των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η χρήση της μαζί με EDTA την καθιστά πιο αποτελεσματική ενάντια σε Gram-αρνητικά βακτήρια.
- Στην Ευρώπη χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριών και στην Ιαπωνία για την συντήρηση θαλασσιών και λαχανικών. Η λυσοζύμη παρασκευάζεται σε μεγάλες ποσότητες από το άσπρω των αυγών.

Φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες ζωικής προέλευσης (Λακτοφερίνη, τρανσφερίνη)

- Η λακτοφερίνη βρίσκεται σε αρκετά μεγάλες ποσότητες στο γάλα (ως τετραμερές με ιόντα ασβεστίου) και δεσμεύει σίδηρο. Μία άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύει σίδηρο είναι η τρανσφερίνη που βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες στο γάλα αλλά κυρίως βρίσκεται στο αίμα.
- Η λακτοφερίνη έχει αντιμικροβιακή δράση εναντίον σε βακτήρια του γένους Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Listeria, Klebsiella κ.α.
- Η δεσμευση σιδήρου από την λακτοφερίνη και την τρανσφερίνη δημιουργεί μη ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων ιδιαίτερα μέσα στο σώμα ενός ξενιστή. Τα βακτήρια προκειμένου να ανταπεξέλθουν στην έλλειψη σιδήρου παράγουν σιδηροφόρα.
- Εκτός από την έμμεση δράση η λακτοφερίνη επιδρά στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, προκαλώντας καταστροφή των λιποπολυσακχαρίτων.

Φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες φυτικής προέλευσης

- Μπαχαρικά όπως η κανέλα, το γαρύφαλλο και αρωματικά φυτά όπως η ρίγανη και το θυμάρι περιέχουν αντιμικροβιακές ενώσεις. Οι κυριότερες από τις φαινολικές αυτές ενώσεις είναι η ευγενόλη (κανέλα, γαρύφαλλο), η θυμόλη (θυμάρι) και η καρβακρόλη (ρίγανη). Τα αιθέρια έλαια των φυτών αυτών περιέχουν τις αντιμικροβιακές ουσίες.
- Χρήση των αιθέρων ελαίων έδειξε την δράση τους ενάντια σε πολλά βακτήρια και μύκητες. Η αποτελεσματικότητά της δράσης ποικίλλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και την χημική σύσταση της αντιμικροβιακής ουσίας. Βρέθηκε ότι το γαρύφαλλο και το θυμάρι έχουν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.
- Ο μηχανισμός δράσης των αιθέρων ελαίων δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς αλλά πιστεύεται ότι αλλάζουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και αναστέλλουν ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μικροοργανισμών.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες φυτικής προέλευσης (συνέχεια)

- Το κρεμμύδι και το σκόρδο είναι γνωστό ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση εμποδίζοντας την ανάπτυξη πολλών παθογόνων των τροφίμων (*Salmonella*, *Clostridium*, *Shigella*, *Staphylococcus*) και μυκήτων.
- Η δραστική ουσία ταυτοποιήθηκε και ονομάζεται αλισίνη (εστέρας που περιέχει σουλφουδριλική ομάδα). Η αντιμικροβιακή της δράση οφείλεται στην καταστροφή ενζύμων που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς όπως αλκαλική φωσφατάση, ουρεάση, αφυδρογονάσες κ.α.
- Ισοθειοκυανιούχες ενώσεις που περιέχονται στο μπρόκολο, στο ραπανάκι και στους σπόρους της μουστάρδας έχουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*. Η δράση τους είναι όμοια με αυτή της αλισίνης.

Βακτηριοσίνες-Γενικά χαρακτηριστικά

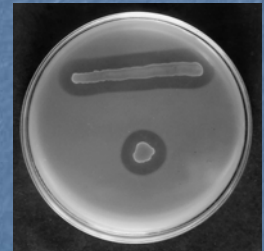
- Οι βακτηριοσίνες είναι μια ετερογενής ομάδα μικρών πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων που συντίθενται ριβοσωμικά από Gram-θετικά και αρνητικά βακτήρια και δρουν συνήθως ενάντια σε στενά συγγενικά είδη ή στελέχη του ίδιου είδους. Ο όρος βακτηριοσίνες είναι γενικός. Βακτηριοσίνες που παράγονται από την *E. coli* ονομάζονται κολισίνες, ή από *Pseudomonas* spp. πιουσίνας.
- Το ενδιαφέρον για την χρήση βακτηριοσινών στην βιομηχανία τροφίμων έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία 15 χρόνια, κυρίως για αυτές που παράγονται από διάφορα είδη λακτοβακίλλων.
- Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από λακτοβάκιλλους ταξινομούνται σε 4 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται βακτηριοσίνες που περιέχουν ασυνήθιστα αμινοξέα και κάποιες είναι κυκλικές. Οι κυκλικές βακτηριοσίνες ονομάζονται και λαντιβιοτικά. Η καλύτερα μελετημένη βακτηριοσίνη της ομάδας αυτής είναι η νισίνη A.

Βακτηριοσίνες-Γενικά χαρακτηριστικά (συνέχεια)

- Στην δεύτερη ομάδα βακτηριοσινών που παράγονται από λακτοβάκιλλους περιλαμβάνονται οι βακτηριοσίνες που είναι δραστικές ενάντια σε *Listeria monocytogenes* όπως η πεδιοσίνη. Οι βακτηριοσίνες της ομάδας αυτής είναι σχετικά μικρές και θερμοανθεκτικές.
- Οι βακτηριοσίνες που ανήκουν στην τρίτη και τέταρτη ομάδα διαφέρουν από τις υπόλοιπες. Είναι γενικά μεγαλύτερου μοριακού βάρους και δεν είναι τόσο ανθεκτικές στην θέρμανση όσο αυτές που ανήκουν στην πρώτη και δεύτερη ομάδα. Αυτές της τέταρτης ομάδας περιέχουν και λιπίδια ή σάκχαρα στην δομή τους.

Απομόνωση μικροοργανισμών που παράγουν βακτηριοσίνες

- Λακτοβάκιλλοι που παράγουν βακτηριοσίνες μπορούν να απομονωθούν σχετικά εύκολα. Η δράση της βακτηριοσίνης ανιχνεύεται από την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού-δεικτη
- Η αναστολή της ανάπτυξης δεν οφείλεται πάντοτε σε βακτηριοσίνη για αυτό θα πρέπει να γίνονται οι απαραίτητες δοκιμές για την εξακρίβωση της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας



Εφαρμογές βακτηριοσινών στα τρόφιμα

- Οι βακτηριοσίνες έχουν διακριτές εφαρμογές στα τρόφιμα. Μπορούν σε καθαρή μορφή να προστεθούν κατευθείαν στα τρόφιμα για να περιορίσουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων.
- Καλλιέργειες βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες μπορούν να προστεθούν στα τρόφιμα κατά την διάρκεια της παρασκευής τους (πχ αρχικές καλλιέργειες στην ζύμωση τροφίμων) για να αναστείλουν τόσο την ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών όσο και οργανισμών που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας και επηρεάζουν την ποιότητα του τροφίμου.

Προσθήκη νισίνης και πεδιοσίνης στα τρόφιμα

- Η νισίνη προστίθεται σε καθαρή μορφή στο γάλα, το τυρί, κονσερβοποιημένα τρόφιμα και παιδικές τροφές. Η δράση της έχει μελετηθεί κυρίως ενάντια στο *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*.
- Η θερμοκρασία είναι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την δράση της νισίνης. Διαπιστώθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματική σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ότι σε υψηλότερες και αχαιστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων σε τρόφιμα που διατηρούνται στην ψύξη.
- Η πεδιοσίνη προστίθεται σε τρόφιμα που περιέχουν κρέμα γάλακτος, τυρί, κρέας και σαλάτες. Η δράση της δεν είναι αποτελεσματική ενάντια σε μικροοργανισμούς που σποριάζονται αλλά είναι πιο δραστική από την νισίνη ενάντια σε βλαστικά κύτταρα της *Listeria monocytogenes*. Ενάντια στο συγκεκριμένο παθογόνο θεωρείται καταλληλότερη της νισίνης για την διατήρηση κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Προσθήκη στελεχών που παράγουν βακτηριοσίνες σε τρόφιμα που δεν παράγονται μέσω ζύμωσης

- Ο ενοφθαλμισμός βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες στα τρόφιμα είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος του ελέγχου της *Listeria monocytogenes*. Μελέτες έδειξαν ότι ενοφθαλμισμός του λακτοβάκιλλου *Pediococcus acidilactici* (παράγει πεδιοσίνη) σε λουκάνικα παρεμπόδισε αποτελεσματικά την ανάπτυξη λιστέριας. Ανάλογη αποτελεσματικότητα έχει και η προσθήκη του *Lactobacillus bavaricus* (παράγει μπαβαρισίνη).
- Συνηθίζεται μαζί με τον ενοφθαλμισμό των βακτηρίων να προστίθενται και υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια και ευνοούν την παραγωγή βακτηριοσινών. Η θερμοκρασία επίσης παίζει ρόλο. Διαπιστώθηκε ότι χαμηλές θερμοκρασίες ευνοούν την δραστηριότητα των παραγόμενων βακτηριοσινών
- Ο λακτοβάκιλλος *Carnobacterium piscicola* LK5 αναστέλλει την *Listeria monocytogenes* στους 5 βαθμούς ακόμα και σε αναλογία ενοφθαλμισμού 1 προς 100.

Προσθήκη στελεχών που παράγουν βακτηριοσίνες για τον έλεγχο ζύμωσης

- Τις περισσότερες φορές η ζύμωση των τροφίμων μπορεί να γίνει από μια ποικιλία μικροοργανισμών που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής του χλωρίδας, αυτό όμως έχει μειονεκτήματα.
- Η ζύμωση δεν ελέγχεται εύκολα σε αυτήν την περίπτωση και δεν γίνεται πάντα κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο εξαιτίας της παρουσίας διαφορετικών μικροοργανισμών ή λόγω διαφορετικού ρυθμού ανάπτυξης τους με αποτέλεσμα διαφορές στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος.
- Η λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι η προσθήκη στελεχών που παράγουν βακτηριοσίνες στην αρχή της ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο το είδος των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην ζύμωση μπορεί να καθορισθεί και να είναι το επιθυμητό.
- Για παράδειγμα λακτοβάκιλλος που παράγει νισίνη χρησιμοποιείται μαζί με ανθεκτικό στην νισίνη *Leuconostoc mesenteroides* στην αρχή της ζύμωσης για την παραγωγή λάχανου τουρσί εμποδίζοντας την ανάπτυξη *Lactobacillus plantarum*. Επίσης στην ζύμωση κρασιού η προσθήκη μικρής συγκέντρωσης νισίνης εμποδίζει την ανάπτυξη λακτοβάκιλλων χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη των μυκήτων που επιτελούν την ζύμωση

Μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών ενάντια σε βλαστικά κύτταρα

- Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τους λακτοβάκιλλους καταστρέφουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα την εκροή αμινοξέων, ιόντων, ATP.
- Οι περισσότερες βακτηριοσίνες περιέχουν υδρόφοβα και υδρόφιλα αμινοξέα που τους επιτρέπουν την είσοδο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με ορισμένο προσανατολισμό. Μετά την είσοδο τους στην μεμβράνη ολιγομερίζονται και με αυτό τον τρόπο σχηματίζουν πόρους στην μεμβράνη με αποτέλεσμα την καταστροφή της.
- Πριν την είσοδο τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και τον σχηματισμό πόρων οι βακτηριοσίνες συνδέονται με συγκεκριμένο υποδοχέα του βακτηρίου ή με άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως για παράδειγμα η νισίνη που συνδέεται με το πρόδρομο μόριο της πεπτιδογλυκάνης λιπίδιο II.

Ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες

- Η ανθεκτικότητα παθογόνων στις βακτηριοσίνες και ιδιαίτερα στην νισίνη που χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα, είναι ένα υπαρκτό πρόβλημα. Βακτηριακά κύτταρα ανθεκτικά στην νισίνη έχουν απομονωθεί από *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* σε συχνότητα 10^{-9} περίπου.
- Έχει προταθεί η ταυτόχρονη χρήση περισσότερων της μιας βακτηριοσίνης αλλά αυτό θα είναι αποτελεσματικό εφόσον η ανθεκτικότητα σε κάθε μια σφείλεται σε διαφορετικό μηχανισμό.
- Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις βακτηριοσίνες είναι παράλληλοι με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας που παρατηρείται στην *Listeria monocytogenes* είναι η διαφορετική σύσταση των λιπαρών οξέων που βρίσκονται στην μεμβράνη με αποτέλεσμα να μην είναι ευάλωτη στην νισίνη. Συνηθισμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι και η έκφραση πρωτεϊνών που καταστρέφουν τις βακτηριοσίνες.

Προβιοτικά και πρεβιοτικά-Ορισμοί

- Ο Ρώσος Metchnikoff ήταν ο πρώτος που πρότεινε ότι η φυσιολογική ισορροπημένη μικροβιακή χλωρίδα του έντερου δρα προστατευτικά εναντίον σε παθογόνους μικροοργανισμούς και γενικά βοηθά στην καλύτερη υγεία του ανθρώπου και των ζώων.
- Σε αντίθεση με το όρο αντιβιοτικό ο όρος προβιοτικό επινοήθηκε στην δεκαετία του 60 για να περιγράψει ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και ευνοούν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Σήμερα ο όρος είναι ελαφρά διαφοροποιημένος και χαρακτηρίζει παρασκευάσματα ζωντανών μικροβιολογικών κυττάρων τα οποία όταν καταναλωθούν είναι ωφέλιμα για την υγεία και προκαλούν ευεξία
- Πρεβιοτικά είναι συστατικά των τροφίμων τα οποία ευνοούν την επιλεκτική ανάπτυξη ή δραστηριότητα κάποιων ωφέλιμων βακτηρίων τα οποία αποτελούν μέρος της γαστρεντερικής χλωρίδας.

Καλλιέργειες προβιοτικών

- Οι πιο συνηθισμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που προστίθενται σε τρόφιμα ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Κάποιοι μη παθογόνοι εντερόκοκκοι, ζύμες και εντεροβακτήρια χρησιμοποιούνται επίσης ως προβιοτικά στον άνθρωπο και τα ζώα.
- Υπάρχει η τάση να περιοριστεί η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων και πουλερικών, ψαριών λόγω του κινδύνου εξάπλωσης της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αυτά. Υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα για τα οφέλη από την χρήση προβιοτικών στην εκτροφή ζώων. Η χρήση προβιοτικής καλλιέργειας που αποτελείται από 29 μη παθογόνων ειδών αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας των πουλερικών (εμπορικό όνομα Preempt) προστατεύει τους νεοσσούς από μόλυνση *Salmonella*, *Campylobacter* και *Listeria*
- Η χρήση προβιοτικής καλλιέργειας αποτελούμενη από 17 στελέχη *E.coli* και *Proteus mirabilis* που απομονώθηκαν από μσοχάρια με βάση την ανασταλτική τους επίδραση στην ανάπτυξη εντεροαιμορραγικής *E.coli* χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον περιορισμό μόλυνσης σε εκτρεφόμενα ζώα.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΟΛΟΓΙΑ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ (ΔΙΑΛΕΞΗ 2)

Οφέλη για την υγεία από την χρήση προβιοτικών στην άνθρωπο

- Έγιναν και γίνονται πολλές κλινικές μελέτες που επικεντρώνονται στα οφέλη για την υγεία από την χρήση προβιοτικών. Παρόλο που σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν ξεκάθαρα συμπεράσματα και σε κάποιες άλλες τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα κάποια από τα οφέλη που αποδίδονται στα προβιοτικά είναι ο ανταγωνισμός με παθογόνους μικροοργανισμούς και επίδραση στην μεταβολική και ενζυμική τους δραστηριότητα.
- Μείωση της δραστηριότητας προκαρκινικών ενζύμων και δέσμευση καρκινογόνων
- Ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (κυτταρομεσολαβητική και χυμική ανοσία) και αντιφλεγμονώδη δράση
- Αντι υπέρτασική δράση , μείωση των ουρολιμώξεων και της χοληστερόλης.

Κριτήρια για την επιλογή προβιοτικών καλλιεργειών

- Τα διάφορα προβιοτικά είδη ακόμη και στελέχη του ίδιου είδους έχουν διαφορετικές ιδιότητες που επηρεάζουν τόσο την επιβίωση τους στα τρόφιμα και μέσα στο ανθρώπινο σώμα αλλά και την αποτελεσματικότητά τους. Κάποια από κριτήρια για την επιλογή κατάλληλων προβιοτικών στελεχών είναι η ταξινομική ταυτοποίηση, προέλευση και ασφάλεια τους
- Η δυνατότητα καλλιέργειας και αποθήκευσης τους σε μεγάλες ποσότητες. Η γενετική τους σταθερότητα και η δυνατότητα γενετικής τους τροποποίησης
- Η ανθεκτικότητά τους μέσα στο γαστρεντερικό σύστημα, η ικανότητα ανάπτυξης ,διατήρησης τους και η ικανότητα να ανταγωνίζονται την ήδη υπάρχουσα μικροβιολογική χλωρίδα
- Τέλος θα πρέπει αποδεδειγμένα να προσφέρουν κάποιο όφελος για την υγεία (αντιφλεγμονώδη δράση, ανταγωνισμός με παθογόνα, ανοσοενίσχυση, κτλ)

Πρεβιοτικά

- Η χρήση πρεβιοτικών αποσκοπεί στην ενίσχυση της ανάπτυξης και δραστηριότητας των ωφέλιμων βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος και των προβιοτικών στελεχών. Συστατικά τροφίμων που μπορούν να χαρακτηριστούν πρεβιοτικά έχουν περιορισμένη υδρόλυση και απορρόφηση στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα και επιλεκτικά ενισχύουν την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στο παχύ έντερο.
- Τα πιο γνωστά πρεβιοτικά στα τρόφιμα είναι φρούκτο ολιγοσακχαρίτες φυτικής προέλευσης. Η ινουλίνη είναι από τα πιο διαδεδομένα πρεβιοτικά και είναι πολυμερές γλυκόζης-φρουκτόζης που ενισχύει κυρίως βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*.
- Έρευνα πάνω στα πρεβιοτικά και στην συνέργειά τους με τα προβιοτικά είναι έντονη και αποσκοπεί στην δημιουργία συμβιωτικών καλλιεργειών που περιέχουν συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη και τα κατάλληλότερα για αυτά πρεβιοτικά στην κατάλληλη δόση ώστε να ενισχύουν τα οφέλη και την δράση τους