



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ ASPERGILLUS FLAVUS
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

**GROWTH INHIBITION OF ASPERGILLUS FLAVUS USING
PROTECTIVE CULTURES**

ΠΑΝΟΥ ΔΑΝΑΗ ΑΜ: 2819060

ΣΤΟΥΓΙΑΝΝΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ ΑΜ: 2819107

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΙΑΒΑΣΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2024

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στην Καρδίτσα, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024, στα πλαίσια των απαιτήσεων της απόκτησης πτυχίου.

Φοιτήτριες

Πάνου Δανάη ΑΜ: 2819060

Στουγιάννου Γεωργία ΑΜ: 2819107

Πρόλογος

Στόχος, της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη και η εύρεση της ανασταλτικής δράσης που μπορεί να προκαλέσουν οι προστατευτικές καλλιέργειες διάφορων μικροοργανισμών βακτηρίων και ζυμών, στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus flavus* και της αφλατοξίνης που παράγει *in vitro* σε τρυβλία αλλά και *in vivo* σε φρέσκες φράουλες.

Η πειραματική αυτή εργασία αποτελείται από δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό μέρος.

Στο θεωρητικό μέρος, αναφέρονται γενικές πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά όλων των μικροοργανισμών, μυκήτων, βακτηρίων και ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, αναλύεται η μορφολογία τους και περιγράφεται η επίδραση που έχουν στα τρόφιμα και πως αυτό επηρεάζει την τροφική αλυσίδα και παράλληλα την οικονομία. Σημειώνονται ακόμα και σχετικές μελέτες για την βιοσυντήρηση τροφίμων με τη χρήση κατάλληλων προστατευτικών μικροοργανισμών.

Στο πειραματικό μέρος, επισημαίνονται τα όργανα, τα υλικά και τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις, περιγράφονται αναλυτικά οι δοκιμές εύρεσης του κατάλληλου προστατευτικού μικροοργανισμού, οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και τέλος, γίνεται παρουσίαση των διαγραμμάτων και συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μας κύριο Ιωάννη Γιαβάση, για την ανάθεση αυτής της τόσο ενδιαφέρουσας και παράλληλα απαιτητικής εργασίας, καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη, βοήθειά και εμπιστοσύνη που μας έδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Επίσης, θα θέλαμε να εκφράσουμε τη βαθύτερη μας ευγνωμοσύνη προς την κυρία Μιτσάγγα Χρυσάνθη, της οποίας η βοήθεια και η καθοδήγηση ήταν πολύτιμες για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μας εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστούμε από καρδιάς τους συμφοιτητές-φίλους και καθηγητές μας, για την απίστευτη συνεργασία που είχαμε και την ανεκτίμητη βοήθεια που μας προσέφεραν όχι μόνο κατά τη διάρκεια των σπουδών μας, αλλά και κατά την εξέλιξη των πειραμάτων της εργασίας αυτής.

Τέλος, δεν μπορούμε παρά να είμαστε ευγνώμονες για την οικογένειά μας και να την ευχαριστήσουμε για όλη την υπομονή και τη στήριξη που μας προσέφερε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μας.

Περίληψη

Στην παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία, ερευνήθηκε και μελετήθηκε η ανασταλτική δράση προστατευτικών καλλιεργειών βακτηρίων και ζυμών, έναντι της ανάπτυξης ενός μύκητα στόχου που προσβάλλει τρόφιμα καθώς και της αφλατοξίνης που παράγει, η οποία είναι ιδιαίτερα τοξική τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα. Τα είδη των προστατευτικών μικροοργανισμών, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την πειραματική διαδικασία, είναι τα βακτήρια, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες, ενώ ο μύκητας στόχος είναι ο *Aspergillus flavus*. Πιο συγκεκριμένα, οι προστατευτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές δοκιμές, είναι από τα βακτήρια, το *Propionibacterium freudenreichii*, από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ο *Lactobacillus rhamnosus*, ο *Lactobacillus plantarum* και ο *Pediococcus acidilactici* καθώς και από τις ζύμες ο *Debaryomyces hansenii* και ο *Saccharomyces cerevisiae* (άρτου και οίνου). Ο κάθε μικροοργανισμός αφού καλλιεργήθηκε από την αρχή, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε και προέκυψαν τρία αντιμικροβιακά διαλύματα, ένα υπερκείμενο διάλυμα, ένα διάλυμα ζωντανών κυττάρων και ένα διάλυμα νεκρών κυττάρων.

Για την κάλυψη των θρεπτικών αναγκών του κάθε μικροοργανισμού παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία ήταν το Potato Dextrose Agar (PDA), το Propionibacter Isolation Agar Base και το De Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS). Όλες οι πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες για την αποφυγή επιμολύνσεων των δειγμάτων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν in vitro, ήταν η μέτρηση ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα (well diffusion assay), η μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση (cross streak) και η μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus*. Στην πειραματική πορεία που πραγματοποιήθηκε in vivo, χρησιμοποιήθηκε μόνο η προστατευτική ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, από την οποία δημιουργήθηκε ένα υπερκείμενο διάλυμα με φυγοκέντριση και ένα διάλυμα χωρίς φυγοκέντριση. Σε αυτά τα διαλύματα εμβαπτίστηκαν οι φρέσκες φράουλες, οι οποίες έπειτα αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη και εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση της ζύμης.

Κατά την ολοκλήρωση των πειραματικών δοκιμών, διαπιστώθηκε ότι την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι του μύκητα στόχου *A. flavus*, είχε το αντιμικροβιακό διάλυμα

των ζωντανών κυττάρων του *S. cerevisiae*, τόσο του άρτου όσο και του οίνου, με τη μέθοδο μέτρησης ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus*. Συνεπώς, με βάση αυτά τα αποτελέσματα, επιλέχτηκε ως ο καταλληλότερος μικροοργανισμός για την πραγματοποίηση του in vino πειράματος με τις φρέσκες φράουλες.

Abstract

In this undergraduate thesis, the inhibitory effect of protective cultures of bacteria and yeasts against the growth of a target fungus that infects food and the aflatoxin it produces, which is highly toxic to both humans and animals, was investigated and studied. The species of protective micro-organisms used in this experimental procedure are bacteria, lactic acid bacteria and yeasts, while the target fungus is *Aspergillus flavus*. More specifically, the protective microorganisms used in the experimental tests are from the bacteria, *Propionibacterium freudenreichii*, from the lactic acid bacteria, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* and from the yeasts, *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* (bread and wine). Each microorganism after being cultured from the beginning was then centrifuged and three antimicrobial solutions were obtained, a supernatant solution, a live cell solution and a dead cell solution.

To meet the nutritional requirements of each microorganism, the respective nutrient substrates were prepared which were Potato Dextrose Agar (PDA), Propionibacter Isolation agar Base and De Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS). All experimental procedures were conducted under aseptic conditions to avoid contamination of the samples. The methods used in vitro were the well diffusion assay (well diffusion assay), the cross-streak assay and the mycelial spreading zone (diameter) measurement of *A. flavus* mycelium. In the experimental course conducted in vivo, only the protective yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used, from which a supernatant solution with centrifugation and a solution without centrifugation were generated. Fresh strawberries were immersed in these solutions, which were then stored under refrigeration and the antimicrobial activity of the yeast was evaluated.

At the completion of the experimental tests, it was found that the best inhibitory activity against the target fungus *A. flavus*, was the antimicrobial solution of live cells of *S. cerevisiae*, both bread and wine, by the method of measuring the zone (diameter) of spread of the mycelium of *A. flavus*. Therefore, based on these results, it was selected as the most suitable microorganism to conduct the in vivo experiment with fresh strawberries.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1.1. ΠΡΟΟΙΜΙΟ.....	10
1.2. ΜΥΚΗΤΕΣ.....	12
1.2.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	12
1.2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	13
1.2.3. ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	15
1.2.4. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	16
1.2.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	18
1.2.6. ΔΟΜΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	18
1.2.7. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	19
1.3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	21
1.3.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	21
1.3.2. ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.....	23
1.3.3. ΑΝΑΣΤΟΛΗ-ΜΕΙΩΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΟΞΥΤΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	29
1.4. ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>ASPERGILLUS</i>	34
1.4.1. <i>Aspergillus flavus</i>	36
1.4.2. <i>Aspergillus parasiticus</i>	38
1.4.3. <i>Aspergillus niger</i>	41
1.5. ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	43
1.5.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	43
1.5.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ, ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	46
1.5.3. <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	51
1.5.4. Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB).....	54
1.5.5. ΓΕΝΟΣ <i>LACTOBACILLUS</i>	57
1.5.6. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	58
1.5.7. <i>Lactobacillus plantarum</i>	59
1.5.8. <i>Pediococcus acidilactici</i>	61

1.6.	ZYMEΣ.....	63
1.6.1.	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	63
1.6.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
1.6.3.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	65
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	67
2.1.	ΣΤΟΧΟΙ & ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	67
2.1.1.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	67
2.1.2.	ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	69
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
3.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΖΩΝΗΣ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ <i>Aspergillus flavus</i>	87
3.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ In vivo ΔΟΚΙΜΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΦΡΕΣΚΕΣ ΦΡΑΟΥΛΕΣ.....	100
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	103
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προοίμιο

Η αλλοίωση των τροφίμων είναι ένα κρίσιμο ζήτημα που έχει εκτεταμένες επιπτώσεις, προκαλώντας σημαντική σπατάλη τροφίμων και οικονομικές απώλειες τόσο για τους παραγωγούς όσο και για τους καταναλωτές. Η μικροβιακή μόλυνση, ιδίως από μύκητες, ξεχωρίζει ως βασικός παράγοντας του προβλήματος αυτού, που εκδηλώνεται σε διάφορα στάδια της τροφικής αλυσίδας από τη συγκομιδή έως την επεξεργασία και την αποθήκευση των πρώτων υλών. Η ανάπτυξη μυκήτων δεν έχει ως αποτέλεσμα μόνο αισθητηριακές αλλαγές στα τρόφιμα όπως αλλοιωμένες γεύσεις, αποχρωματισμό, σήψη και δομική αποσύνθεση, αλλά εγκυμονεί επίσης κινδύνους για την υγεία μέσω της παραγωγής τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών, γνωστών ως μυκοτοξίνες. Μεταξύ των μυκήτων, το γένος *Aspergillus* είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτο για την ευρεία παρουσία του και τους κινδύνους που εγκυμονεί τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα (Παυλοπούλου, 2021). Διάφορα είδη αυτού του γένους δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα, ικανά να προκαλέσουν ασθένειες όπως η ασπεργίλλωση, οι αναπνευστικές αλλεργίες, η αφλατοξίκωση λόγω της παραγωγής αφλατοξινών στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων, τερατογόνων, μεταλλαξιογόνων, ανοσοτοξικών, νευροτοξικών, νεφροτοξικών και ηπατοτοξικών ιδιοτήτων που έχουν. Ο *A. flavus*, ένα κοινό είδος του γένους αυτού, παρουσιάζει μοναδικές προκλήσεις λόγω της ικανότητάς του να ευδοκιμεί σε διάφορα υποστρώματα υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες και της ικανότητάς του να παράγει πολυάριθμα σπόρια που παραμένουν βιώσιμα ακόμη και σε ακραίες συνθήκες. Η είσοδος μυκήτων στις καλλιέργειες όχι μόνο θέτει σε κίνδυνο τους μηχανισμούς αυτοάμυνας των καλλιεργειών έναντι μυκητολογικών προσβολών, αλλά οδηγεί επίσης στη μόλυνση των σπόρων των καλλιεργειών, με αποτέλεσμα την παραγωγή μυκοτοξινών. Αυτή η μόλυνση από μύκητες επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη των καλλιεργειών, την απόδοση και την αξία της αγοράς. Ο *A. flavus* είναι γνωστό ότι μολύνει κυρίως καλλιέργειες όπως το καλαμπόκι, η σόγια, τα φιστίκια, τα καρύδια Βραζιλίας, τους σπόρους βαμβακιού, τους ηλιόσπορους και το ρύζι (Klich, 2007). Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές έχουν επισημάνει την παρουσία αυτών των μυκήτων σε φρούτα και λαχανικά όπως φράουλες, σταφύλια και ντομάτες, υπογραμμίζοντας τον ευρύ αντίκτυπο της μυκητιακής μόλυνσης στην ασφάλεια και την

ποιότητα των τροφίμων. Η πρόληψη της ανάπτυξης των μυκήτων και της παραγωγής μυκοτοξινών είναι ζωτικής σημασίας για τον μετριασμό αυτών των κινδύνων. Ενώ η απολύμανση και η αποτοξίνωση των μολυσμένων προϊόντων είναι απαραίτητες, ορισμένοι νηματοειδείς μύκητες και ζύμες έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στις χημικές επεξεργασίες και τα συντηρητικά, θέτοντας προκλήσεις στην ασφάλεια των τροφίμων (Podgórska, 2023). Η βιοσυντήρηση, μια μέθοδος που περιλαμβάνει τον έλεγχο ενός οργανισμού με έναν άλλο, έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές φυσικές και χημικές προσεγγίσεις. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή Lactic Acid Bacteria (LAB), μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ κατά τη ζύμωση, έχουν παρουσιάσει δυνατότητες ως φυσικοί βιολογικοί ανταγωνιστές κατά των μυκοτοξινογόνων μυκήτων. Τα LAB, συμπεριλαμβανομένων των ειδών όπως τα *Lactobacillus* και τα *Bifidobacterium*, διερευνώνται για το προβιοτικό τους δυναμικό και την ικανότητά τους να καταπολεμούν την ανάπτυξη μυκήτων. Αυτά τα βακτήρια αξιολογούνται με βάση κριτήρια όπως η ασφάλεια, η βιωσιμότητα, η αντοχή σε σκληρές συνθήκες και ο αντίκτυπός τους στην υγεία του εντέρου. Η έρευνα δείχνει ότι τα LAB μπορούν να παρουσιάσουν αντιμυκητιακές ιδιότητες έναντι μυκοτοξινογόνων μυκήτων όπως ο *Aspergillus* και ο *Penicillium*, αναδεικνύοντας το ρόλο τους στη μείωση των κινδύνων για την υγεία που συνδέονται με την έκθεση σε μυκοτοξίνες, προσφέροντας μια πολλά υποσχόμενη οδό για τη βελτίωση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων (Abbaszadeh et al., 2015). Επίσης, οι ζύμες και οι μύκητες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο ως βιοσυντηρητικά στα τρόφιμα, προσφέροντας μια βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά μυκητοκτόνα. Η εφαρμογή ζυμομυκήτων στη γεωργία υπόσχεται μείωση των ζημιών από τοξικογόνους μύκητες. Ορισμένοι ζυμομύκητες δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου, αναστέλλοντας την ανάπτυξη μυκήτων και διατηρώντας τα γεωργικά προϊόντα μειώνοντας τη μόλυνση από μυκοτοξίνες. Οι ζύμες μπορούν να αναστέλλουν άμεσα την παραγωγή τοξινών στους μύκητες, ξεχωριστά από την επίδραση καταστολής της ανάπτυξής τους, ενώ ορισμένα είδη ζυμομυκήτων μπορούν να συσσωρεύουν μυκοτοξίνες από προϊόντα, απολυμαίνοντάς τα αποτελεσματικά. Οι προβιοτικές ζύμες χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της μυκοτοξίκωσης στα ζώα και ορισμένες ζύμες μπορούν να αποικοδομήσουν τις τοξίνες σε λιγότερο επιβλαβείς

μορφές. Η κατανόηση της γενετικής και μοριακής βάσης της αποικοδόμησης των τοξινών είναι ζωτικής σημασίας για αυτόν τον τομέα (Pfliegler, 2015).

Οι προαναφερθέντες προστατευτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής στο ράφι, να αναστέλλουν τους μύκητες και τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα και να απενεργοποιούν τις μυκοτοξίνες. Συμπερασματικά, η περίπλοκη σχέση μεταξύ μυκήτων, ιδίως των ειδών *Aspergillus*, και της αλλοίωσης των τροφίμων είναι ένα σύνθετο και πολύπλευρο ζήτημα που απαιτεί προσοχή και αποτελεσματικές στρατηγικές μετριασμού για τη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων, τη μείωση των αποβλήτων και τον μετριασμό των οικονομικών απωλειών στη βιομηχανία τροφίμων.

1.2 Μύκητες

1.2.1 Γενικές Πληροφορίες

Οι μούχλες βρίσκονται παντού στη φύση και συνήθως μολύνουν γεωργικά προϊόντα, τρόφιμα, ποτά και ζωοτροφές. Αυτά τα προϊόντα παρέχουν ένα πλούσιο περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών λόγω της παρουσίας βασικών θρεπτικών συστατικών, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλοι παράγοντες ανάπτυξης, καθώς και επαρκούς υγρασίας (Rastall et. al., 2022). Παλαιότερα, η αλλοίωση από μούχλα θεωρούνταν ανεπιθύμητη κυρίως λόγω των αισθητικών και οργανοληπτικών επιπτώσεών της. Ορισμένα είδη μούχλας μπορούν να παράγουν τοξικούς μεταβολίτες, γνωστούς ως μυκοτοξίνες, οι οποίοι αποτελούν απειλή τόσο για την υγεία του ανθρώπου όσο και για την υγεία των ζώων. Οι μικροβιολόγοι τροφίμων και οι υπεύθυνοι στον τομέα υγείας αναγνωρίζουν πλέον ότι η απλή αφαίρεση των μουχλιασμένων τμημάτων και η χρήση του υπόλοιπου προϊόντος δεν αποτελεί βιώσιμη λύση. Αυτό συμβαίνει επειδή οι μυκοτοξίνες μπορούν να διαχυθούν από τις μουχλιασμένες περιοχές στα μη μουχλιασμένα μέρη, καθιστώντας ολόκληρο το προϊόν δυνητικά επικίνδυνο. Επιπλέον, εκτιμάται ότι το 5 έως 10% των παγκόσμιων απωλειών τροφίμων αποδίδεται σε μόλυνση από μούχλα, γεγονός που αποτελεί σημαντική οικονομική επιβάρυνση. Ο ακριβής χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των ειδών μούχλας που μολύνουν τα τρόφιμα έχουν καταστεί ζωτικής

σημασίας για τον έλεγχο και την πρόληψη της μόλυνσης από μύκητες και της πιθανής παραγωγής μυκοτοξινών. Τα είδη μούχλας έχουν ξεχωριστές απαιτήσεις ανάπτυξης που διαφέρουν από εκείνες των βακτηρίων και των ζυμών και παράγουν μοναδικούς μεταβολίτες (Gourama & Bullerman, 1995). Γενικά η αλλοίωση από μούχλα συμβαίνει όταν ένα προϊόν μολύνεται με σπόρια μυκήτων που βλαστάνουν και αναπτύσσονται σε ορατό μυκήλιο.

Οι μούχλες είναι ικανές να ευδοκιμούν σε ένα ευρύ φάσμα τιμών ενεργότητας νερού (a_w), επιπέδων pH και θερμοκρασιών, χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, οργανικών οξέων, πρωτεϊνών και λιπιδίων (Veld, 1996). Αυτή η προσαρμοστικότητα τούς επιτρέπει να αναπτύσσονται σε όξινα προϊόντα, όπως φρούτα και χυμούς φρούτων όπως ο *Penicillium expansum* (Lahlali et al., 2005), καθώς και σε τρόφιμα με ενδιάμεσα επίπεδα υγρασίας, όπως το ψωμί και τα προϊόντα αρτοποιίας, όπου άλλοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια, δεν μπορούν να επιβιώσουν. Επιπλέον, οι μούχλες μπορούν να αναπτυχθούν σε δημητριακά, ποτά, γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα ζύμωσης, γεγονός που τις καθιστά συνδεδεμένες με την αλλοίωση ενός ευρέος φάσματος τροφίμων (Filtenborg et al., 1996). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού, οι μούχλες μπορούν να παράγουν εξωένζυμα όπως λιπάσες, πρωτεάσες, τα οποία μπορούν να αλλοιώσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου προκαλώντας δυσάρεστες γεύσεις, αποχρωματισμό και παραγωγή τοξικών ενώσεων. Ενώ οι δυσάρεστες γεύσεις και ο αποχρωματισμός είναι ανεπιθύμητοι, οι τοξίνες που παράγονται από τις μούχλες μπορούν να θέσουν σημαντικούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών (Dagnas & Membré, 2013).

1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων

Ενεργότητα Νερού: Η ενεργότητα νερού (a_w) σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του ελεύθερου νερού, δηλαδή αυτού που δεν είναι δεσμευμένο σε άλλα μόρια και παραμένει διαθέσιμο για την ανάπτυξη των μικροβίων και έτσι θεωρείται ο πρωταρχικός παράγοντας για τον έλεγχο της σταθερότητας των τροφίμων και την πρόληψη της αλλοίωσης (Troller, 2012). Με βάση την a_w , οι μούχλες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τις ξηροφιλικές (ή ξηροανεκτικές) μούχλες, οι οποίες μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλά

επίπεδα a_w (κάτω από 0,85), και τις μη ξηροφιλικές μούχλες, οι οποίες μπορούν να αναπτυχθούν σε επίπεδα a_w που κυμαίνονται από 0,85 έως 1,0. Παρατηρήθηκε ότι οι ξηροφιλικοί μύκητες παρουσιάζουν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε επίπεδα a_w κάτω από 0,95. Παραδείγματα ξηροφιλικών μυκήτων περιλαμβάνουν ορισμένα είδη *Eurotium*, *Wallemia* και *Chrysosporium* (Marvanova et al., 2002), ενώ ορισμένα είδη *Penicillium* και *Aspergillus* δεν είναι ξηροφιλικά. Μεταξύ των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη της μούχλας, η a_w αναγνωρίζεται ευρέως ότι έχει τον σημαντικότερο αντίκτυπο στην ανάπτυξη της μούχλας και στον πολλαπλασιασμό των υφών. Καθώς η a_w μειώνεται, οι ρυθμοί τόσο της ανάπτυξης όσο και του πολλαπλασιασμού επιβραδύνονται έως ότου επιτευχθεί μία ελάχιστη a_w , οπότε δεν συμβαίνει ούτε ανάπτυξη ούτε πολλαπλασιασμός (Huang et al., 2009).

Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (pH): Το εύρος του pH που συνήθως συναντάται στα τρόφιμα δεν έχει άμεσο αντίκτυπο στη ανάπτυξη της μούχλας (pH 3 έως 6,5) ή στον πολλαπλασιασμό του μυκηλίου (pH 3 έως 8). Ωστόσο, το pH μπορεί να έχει έμμεσες επιπτώσεις στην ανάπτυξη της μούχλας. Πρώτον, επηρεάζει την ανάπτυξη της βακτηριακής χλωρίδας. Όταν το pH είναι βέλτιστο (4,5 έως 8), τα βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν και να ανταγωνιστούν τις μούχλες, μειώνοντας ενδεχομένως τα ποσοστά ανάπτυξης μούχλας. Δεύτερον, το pH επηρεάζει την αναλογία των διαλυμένων προς τις μη διαλυμένες μορφές των δυνητικά ανασταλτικών οργανικών οξέων και έτσι οι μη διαλυμένες μορφές ορισμένων οργανικών οξέων έχουν γενικά μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη μούχλας σε σύγκριση με τις διαλυμένες μορφές τους. Κάποια από αυτά είναι συντηρητικά ασθενών οξέων όπως σορβικό κάλιο, προπιονικό ασβέστιο και βενζοϊκό νάτριο (Guynot et al., 2005).

Συντηρητικά: Για να αποτραπεί η αλλοίωση των τροφίμων από μικροοργανισμούς, οι κατασκευαστές χρησιμοποιούν συχνά συντηρητικά. Μεταξύ αυτών, το προπιονικό οξύ, το σορβικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ και τα άλατά τους είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης μούχλας (Guynot et al., 2002). Τα ασθενή οξέα, εξαρτώνται από το pH, επειδή υπάρχουν τόσο σε διαχωρισμένες όσο και σε μη διαχωρισμένες μορφές. Ο τρόπος δράσης των ασθενών οξέων πιστεύεται ότι σχετίζεται με την αδιαστατοποιημένη κατάσταση. Σε αυτή τη μορφή, το οξύ είναι ουδέτερο και μπορεί να διεισδύσει στην κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια, το οξύ μειώνει το ενδοκυτταρικό pH απελευθερώνοντας ιόντα υδρογόνου

και έτσι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Η επίδραση των ασθενών οξέων στην ανάπτυξη της μούχλας έχει διερευνηθεί από τους Guynot et al. και Marin et al. κοντά σε ουδέτερο pH (6,5 έως 7) και διαπίστωσαν ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις ασθενών οξέων (0,025 και 0,05%) στην πραγματικότητα προάγουν την ανάπτυξη της μούχλας αντί να την αναστέλλουν. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα ασθενή οξέα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις για να είναι αποτελεσματικά (Stratford et al., 2009).

Οξυγαλακτικά Βακτήρια: Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν μια σειρά ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων, υπεροξειδίου του υδρογόνου και βακτηριοσινών, οι οποίες επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη μούχλας. Τα βακτήρια αυτά αναγνωρίζονται επίσης ως ασφαλή για χρήση σε προϊόντα τροφίμων λόγω του ότι είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή (GRAS) (Ibrahim et al., 2021). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια επίσης μπορούν να ενσωματωθούν άμεσα στην επεξεργασία των ζυμούμενων τροφίμων. Συνεπώς η βιοσυντήρηση των τροφίμων μέσω της αναστολής της μούχλας έχει μελετηθεί και διερευνηθεί εκτενώς ως φυσική εναλλακτική λύση στα χημικά συντηρητικά (Dalié et al., 2010).

1.2.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη μυκήτων

Θερμοκρασία αποθήκευσης: Η θερμοκρασία είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη της μούχλας, και έρχεται δεύτερος μετά την ενεργότητα του νερού (a_w). Η αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και a_w επηρεάζει επίσης σημαντικά την ανάπτυξη των μυκήτων (Dagnas & Membré, 2013). Ορισμένα είδη μούχλας παρουσιάζουν θερμοανεκτικότητα, δηλαδή είναι ικανά να αναπτύσσονται σε μέτριες έως υψηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, οι μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus niger* μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ 8 και 45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία κοντά στους 30°C. Αυτές οι θερμοανεκτικές μούχλες εμπλέκονται συχνά στην αλλοίωση τροφίμων που διατηρούνται στο ράφι, ιδίως κατά τη διάρκεια θερμών καιρικών συνθηκών. Αντίθετα, οι μούχλες που ευθύνονται για την αλλοίωση των τροφίμων που διατηρούνται στην ψύξη είναι συνήθως ψυχρόφιλες, ικανές να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Pitt & Hocking, 2009).

Θερμική Επεξεργασία και θερμική αντίσταση της μούχλας στη θερμότητα: Λίγα είδη μούχλας παρουσιάζουν αντοχή στη θερμότητα, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να επιβιώσουν από διαδικασίες παστερίωσης. Τα περισσότερα αγενή σπόρια (κονίδια) και βλαστικά κύτταρα των *Penicillium* και *Aspergillus* θανατώνονται μετά από θέρμανση για 5 λεπτά στους 60°C. Η αντοχή της μούχλας στη θερμότητα σχετίζεται με τα ασκοσπόρια.

Αιθανόλη: Η αιθανόλη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τόσο την ανάπτυξη όσο και τον πολλαπλασιασμό της μούχλας. Μπορεί είτε να σταματήσει εντελώς την ανάπτυξη είτε να την καθυστερήσει διαταράσσοντας την κυτταρική μεμβράνη. Στην παρασκευή τροφίμων, η αιθανόλη εφαρμόζεται απευθείας στην επιφάνεια του προϊόντος (δηλαδή ψεκάζεται στην επιφάνεια) ή εισάγεται στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας ως ατμός. Οι Dantigny et al. διαπίστωσαν ότι συγκεντρώσεις ατμών αιθανόλης 4% ή υψηλότερες ανέστειλαν τα κονίδια του *Penicillium chrysogenum* που απομονώθηκαν από αλλοιωμένα προϊόντα αρτοποιίας (Dantigny et al., 2005).

Συσκευασία: Οι μούχλες που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων είναι υποχρεωτικά αερόβιες, δηλαδή χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους. Ως εκ τούτου, ο περιορισμός της διαθεσιμότητας οξυγόνου είναι μια βιώσιμη μέθοδος για την αναστολή της ανάπτυξης μούχλας. Ωστόσο, ορισμένες μούχλες όπως το *Penicillium roqueforti*, το *Mucor plumbeus* και ορισμένα είδη *Fusarium* μπορούν να αναπτυχθούν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, όπως 0,5% ή 2%. Αυτή η μέθοδος συσκευασίας είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την πρόληψη της ανάπτυξης μούχλας σε συσκευασμένα τρόφιμα (Halouat & Debevere, 1997).

1.2.4 Μορφολογία Μυκήτων

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που στερούνται χλωροφύλλης και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να διασπούν σύνθετες ενώσεις. Παρουσιάζουν μια σειρά μορφολογικών μορφών, όπως μονοκύτταρη ζύμη, νηματοειδείς μούχλες και ψευδομύκητες. Ορισμένοι μύκητες, γνωστοί ως διμορφικοί μύκητες, μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ αυτών των μορφών ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Samanta, 2015). Οι μούχλες είναι μικροσκοπικοί, νηματοειδείς οργανισμοί που αναπτύσσονται πάνω και μέσα σε διάφορες ουσίες φυτικής, τροφικής, ξηρής φυλλικής ή

ζωικής προέλευσης. Η νηματοειδής δομή τους τους επιτρέπει να ευδοκιμούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Μπορούν να εμφανιστούν σε διάφορα χρώματα, όπως λευκό, πορτοκαλί, πράσινο ή μαύρο. Οι μούχλες παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον διασπώντας τη νεκρή οργανική ύλη. Τα μυκητιακά νημάτια, γνωστά ως υφές, είναι τα θεμελιώδη συστατικά της ανάπτυξης της μούχλας. Όταν αυτές οι υφές συσσωρεύονται σε επαρκείς αριθμούς, σχηματίζουν ένα ορατό δίκτυο που ονομάζεται μυκήλιο. Επίσης οι μούχλες αναπαράγονται μέσω της παραγωγής σπορίων, τα οποία είναι ουσιαστικά αναπαραγωγικές μονάδες και βλαστάνουν όταν βρεθούν σε μια κατάλληλη επιφάνεια, δημιουργώντας μια νέα αποικία μούχλας (Nwakanma & Unachukwu, 2017). Στη συνέχεια παρατηρούνται διάφορα είδη μυκήτων που συναντώνται στη φύση αλλά και στα τρόφιμα.



Εικόνα 1: *Amanita muscaria*, ένας βασιδιομύκητας, *Sarcoscypha coccinea*, ένας ασκομύκητας, ψωμί με μούχλα, χυτριομύκητας, ένα κονιδιοφόρο του *Aspergillus*

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Fungus>)

1.2.5 Ταξινόμηση και Ονοματολογία των Μυκήτων

Οι μύκητες ταξινομούνται ως ένα ξεχωριστό βασίλειο χωριστά από τα φυτά και τα ζώα, με βάση τα μοναδικά χαρακτηριστικά και την εξελικτική τους ιστορία. Ενώ οι μύκητες κάποτε ομαδοποιούνταν με τα φυτά, σήμερα αναγνωρίζονται ως ξεχωριστό βασίλειο με στενότερη εξελικτική σχέση με τα ζώα. Έτσι το σύγχρονο βασίλειο των μυκήτων

χωρίζεται πλέον σε διάφορα φύλα, με τα Ascomycota και Zygomycota να είναι οι πιο ποικίλες και γνωστές ομάδες, που περιέχουν την πλειονότητα των μανιταριών, της μούχλας και των ζυμομυκήτων και σε μικρότερο βαθμό είναι τα Basidiomycota (Pitt & Hocking, 2009).

1.2.6 Η δομή των κυττάρων των μυκήτων

Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αποτελείται από πολυσακχαρίτες (γλυκάνες, μαννάνες, χιτίνη), γλυκοπρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα άλατα (ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορος).

Η πλασματική μεμβράνη των κυττάρων των μυκήτων βρίσκεται κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα. Αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων, όπου είναι διασκορπισμένες οι πρωτεΐνες. Οι υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων είναι στραμμένες προς την επιφάνεια, ενώ οι υδρόφοβες ουρές είναι ενσωματωμένες στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η εργοστερόλη είναι το πρωταρχικό συστατικό στερολών των πλασματικών μεμβρανών των μυκήτων. Επομένως οι αντιμυκητιασικοί παράγοντες στοχεύουν άμεσα στην εργοστερόλη (πολυένια) ή στη βιοσυνθετική της οδό αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη των μυκήτων.

Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων των μυκήτων περιέχει διάφορα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi, λυσοσώματα, κενοτόπια και πυρήνα. Επιπλέον, υπάρχουν μακριές, κοίλες κυλινδρικές δομές που ονομάζονται μικροσωληνίσκοι, με διάμετρο περίπου 25 νανόμετρα. Αυτοί οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από πρωτεΐνες τουμπουλίνης και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση ή τη μείωσή τους. Η διακοπή της σύνθεσης της τουμπουλίνης από αντιμυκητιασικούς παράγοντες όπως η γκριζεοφουλβίνη μπορεί να αποτρέψει τη μίτωση των μυκήτων, αναδεικνύοντας τη σημασία των μικροσωληνίσκων στην κυτταρική διαίρεση (Samanta, 2015).

1.2.7 Διατροφή και ανάπτυξη

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί που αντλούν ενέργεια από χημικές ενώσεις και ηλεκτρόνια και άνθρακα από οργανικές ενώσεις. Απορροφούν θρεπτικά συστατικά είτε από το περιβάλλον τους (σαπρόφυτα) είτε από έναν ξενιστή (παράσιτα). Οι περισσότερες σαπροφυτικές μούχλες αναπτύσσονται αερόβια σε τεχνητά μέσα καλλιέργειας σε θερμοκρασίες μεταξύ 20-30°C. Οι παθογόνοι ζυμομύκητες και η ζυμομυκητιακή φάση των διμορφικών μυκήτων προτιμούν θερμοκρασίες γύρω στους 37°C. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης περιλαμβάνουν υψηλή υγρασία, όξινο pH (3,8-5,6), υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (4-5%) και παρουσία άνθρακα, φωσφόρου, θείου, καλίου, μαγνησίου, σιδήρου και ασβεστίου. Οι μύκητες χρησιμοποιούν τα νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου, ανάγοντάς τα σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε αμμωνία. Κανένας από αυτούς δεν μπορεί να δεσμεύσει άμεσα το άζωτο. Οι ρυθμοί ανάπτυξης των μυκήτων είναι γενικά βραδύτεροι από εκείνους των βακτηρίων και το μέσο μπορεί εύκολα να μολυνθεί με βακτήρια. Για την πρόληψη της μόλυνσης, προστίθενται στα μέσα αντιβιοτικά και αντιμυκητιασικοί παράγοντες (Samanta, 2015).

Πίνακας 1: Απαιτήσεις ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων (Samanta, 2015)

Χαρακτηριστικά	Βακτήρια	Μύκητες
Θερμοκρασία	37°C	20-30°C (σαπρόφυτα)/ 37°C παράσιτα
pH	6-7	3,8-5,6
Οξυγόνο	Αερόβια, αναερόβια	Αυστηρά αερόβια
Σάκχαρα	0,5-1%	4-5%
Υγρασία	Χαμηλή	Υψηλή
Άνθρακα	Οργανικός ή ανόργανος	Οργανικός
Άζωτο	Άμεση πρόσδεση από ορισμένα βακτήρια (<i>Rhizobacter</i>)	Όχι άμεση πρόσβαση

Ρυθμός ανάπτυξης	Γρήγορος	Αργός
------------------	----------	-------

Πίνακας 2: Σύγκριση επιλεγμένων χαρακτηριστικών μυκήτων και βακτηρίων (Γιαβάσης, 2020)

	Μύκητες	Βακτήρια
Τύπος κυττάρου	Ευκαρυωτικό	Προκαρυωτικό
Κυτταρική μεμβράνη	Υπάρχουν στερόλες	Δεν υπάρχουν στερόλες, εκτός από το Mycoplasma
Κυτταρικό τοίχωμα	Γλυκάνες, μαννάνες, χιτίνη (όχι πεπτιδογλυκάνη)	Πεπτιδογλυκάνη
Σπόρια	Σεξουαλικά και ασεξουαλικά αναπαραγωγικά σπόρια	Ενδοσπόρια (όχι αναπαραγωγικά)
Μεταβολισμός	Μόνο ετερότροφοι, αερόβιοι και δυνητικά αναερόβιοι	Ετερότροφα, αυτότροφα, αερόβια, δυνητικά αναερόβια, αυστηρώς αναερόβια

1.3 Μυκοτοξίνες

1.3.1 Γενικές πληροφορίες

Οι μύκητες εκτός από τις ασθένειες που μπορούν να προκαλέσουν στον άνθρωπο μέσω άμεσης μόλυνσης ή εισπνοής σπορίων, μπορούν επίσης να παράγουν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που ονομάζονται μυκοτοξίνες και οδηγούν σε διάφορες τοξικολογικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Η επιστημονική βιβλιογραφία έχει καθιερώσει μια σαφή σύνδεση μεταξύ της κατάποσης τροφίμων μολυσμένων με μυκοτοξίνες και δυσμενών αποτελεσμάτων για την υγεία, ιδίως ηπατικών παθήσεων, γαστρεντερικών προβλημάτων και καρκίνου (Fung & Clark, 2004).

Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικοί περιβαλλοντικοί μολυντές που απαντούν ευρέως σε διάφορα τρόφιμα. Παγκόσμιες έρευνες έχουν αναφέρει σταθερά αυξημένα επίπεδα μυκοτοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές από χώρες σε όλο τον κόσμο. Η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων έχει συνδεθεί με μια σειρά τοξικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με την έκθεση σε μυκοτοξίνες. Τα τελευταία χρόνια, ορισμένες μελέτες έχουν συνδέσει είδη μυκοτοξινών που παράγουν ορισμένοι μύκητες όπως *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys* και *Alternaria*. Ο όρος μυκοτοξίκωση αναφέρεται στις τοξικές επιδράσεις ή τη δηλητηρίαση που προκαλούν οι μυκοτοξίνες. Η μυκοτοξίκωση έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία της τροφικής και κτηνιατρικής τοξικολογίας, με έμφαση στην ανθρώπινη τοξικότητα (Kendrick, 2017).

Τα δημητριακά και τα υποπροϊόντα τους είναι ζωτικής σημασίας πηγές ενέργειας τόσο για τα αγροτικά ζώα όσο και για τον άνθρωπο. Ωστόσο, όταν μύκητες αποικίζουν αυτούς τους σπόρους και τις ζωοτροφές, υπάρχει σημαντικός κίνδυνος μόλυνσης με τους τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από αυτούς τους μύκητες, γνωστούς ως μυκοτοξίνες. Αυτές οι μυκοτοξίνες παράγονται κυρίως από τις μυκηλιακές δομές των νηματοειδών μυκήτων, που συνήθως αναφέρονται ως μούχλες. Πρόκειται για ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους που είναι επιβλαβή τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο. Οι μυκοτοξίνες διαφέρουν ως προς την τοξικότητα και τη χημική τους δομή, αλλά ομαδοποιούνται λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν ασθένειες και θάνατο στον άνθρωπο και σε άλλα σπονδυλωτά. Τα δημητριακά αποτελούν πρωταρχικό συστατικό της πλούσιας σε ενέργεια διατροφής που καταναλώνουν τα αγροτικά ζώα. Οι

νηματοειδείς μύκητες που απαντώνται συνήθως σε αυτά τα σιτηρά παράγουν μυκοτοξίνες, γεγονός που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση αυτών των σιτηρών σε σκευάσματα ζωοτροφών. Περίπου το 70% των ζωοτροφών που βασίζονται σε δημητριακά είναι μολυσμένες με τουλάχιστον μία μυκοτοξίνη. Αυτές οι μυκοτοξίνες εισέρχονται έτσι στην τροφική αλυσίδα και προκαλούν ισχυρές τοξικές αντιδράσεις ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα ζώα και περαιτέρω στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 300 μυκοτοξίνες, ενώ η αφλατοξίνη, η φουμονισίνη, η ωχρατοξίνη, οι τριχοθηκίνες (δεοξυνιβαλενόλη, T-2 και HT-2) και το ZEN είναι οι πιο συχνά αναφερόμενες μυκοτοξίνες λόγω των προβλημάτων ασφαλείας και της οικονομικής τους σημασίας (Singh & Kumari, 2022).

Οι μυκοτοξικώσεις είναι ασθένειες που προκαλούνται από την έκθεση σε μυκοτοξίνες μέσω κατάποσης, εισπνοής ή επαφής με το δέρμα. Η σοβαρότητα αυτών των ασθενειών μπορεί να ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου της μυκοτοξίνης που καταναλώνεται, του επιπέδου και της διάρκειας της έκθεσης, της ηλικίας, της φυλής, της υγείας και της διατροφικής κατάστασης του ζώου, καθώς και των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία και οι πρακτικές διαχείρισης. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να έχουν ποικίλες επιπτώσεις, από την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος έως τη θανάσιμη επίδραση σε σοβαρές περιπτώσεις. Για τον μετριασμό αυτών των κινδύνων και τη διασφάλιση της ασφάλειας των ανθρώπινων τροφίμων, έχουν θεσπιστεί σε παγκόσμιο επίπεδο ρυθμιστικά όρια για την επιτρεπόμενη συγκέντρωση μυκοτοξινών σε δημητριακά, ζωοτροφές και άλλα προϊόντα (Singh & Kumari, 2022).

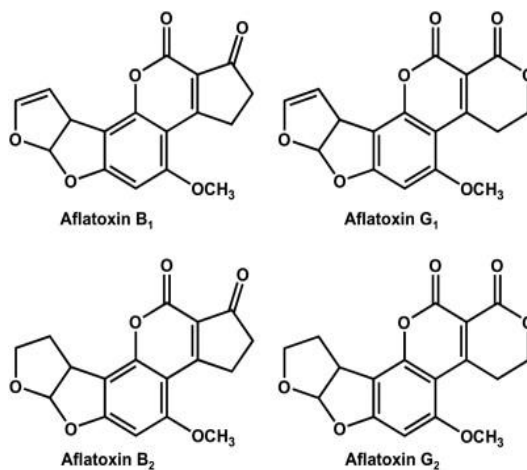
Η πολυπλοκότητα των μυκοτοξινών προκύπτει από τις ποικίλες χημικές δομές, τη βιοσυνθετική προέλευση και τις πολυάριθμες βιολογικές επιδράσεις τους. Αυτή η ποικιλομορφία καθιστά δύσκολη την κατηγοριοποίησή τους. Συγκεκριμένα οι μυκητολόγοι τις ομαδοποιούν με βάση τους μύκητες που τις παράγουν. Για παράδειγμα, η αφλατοξίνη παράγεται από τον *Aspergillus flavus*, η ωχρατοξίνη από τον *Aspergillus ochraceous* και ούτε καθεξής (Singh & Kumari, 2022). Ακόμα η εμφάνιση και η παραγωγή των μυκοτοξινών ποικίλλουν λόγω γεωγραφικών και κλιματικών διαφορών. Ωστόσο, η παραγωγή μυκοτοξινών για ένα συγκεκριμένο είδος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις

συνθήκες ανάπτυξης, όπως η υγρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και η θερμοκρασία (Samarundo et al., 2005).

1.3.2 Είδη μυκοτοξινών

Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα εξαιρετικά τοξικών και καρκινογόνων μυκοτοξινών που παράγονται από ορισμένα στελέχη των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Οι τοξίνες αυτές ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή και τις ιδιότητες φθορισμού τους υπό υπεριώδες (UV) φως. Οι κυριότερες αφλατοξίνες περιλαμβάνουν τις AFB₁, AFB₂, AFG₁ και AFG₂. Οι ονομασίες "B" και "G" αναφέρονται στον μπλε και πράσινο φθορισμό αυτών των τοξινών υπό υπεριώδες φως. Οι αφλατοξίνες μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο μεγάλες δομικές κατηγορίες (Fung & Clark, 2004).



Εικόνα 2: Αφλατοξίνες AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (Motarjemi, 2013)

Οι αφλατοξίνες βρίσκονται συνήθως στις καλλιέργειες πριν από τη συγκομιδή και μπορούν επίσης να μολύνουν τα τρόφιμα μετά τη συγκομιδή, εάν η ξήρανση καθυστερήσει ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, όταν υπάρχει υγρασία, που επιτρέπει την ανάπτυξη μούχλας. Οι αφλατοξίνες ανιχνεύονται συνήθως σε καλαμπόκι, φιστίκια, βαμβακόσπορο, αμύγδαλα, σύκα και άλλα τρόφιμα και ζωοτροφές. Το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αυγά και τα προϊόντα κρέατος μπορούν επίσης να μολυνθούν λόγω της κατανάλωσης

ζωοτροφών μολυσμένων με αφλατοξίνες από τα ζώα. Η παραγωγή αφλατοξίνης ευνοείται από ένα εύρος θερμοκρασιών 25-30°C και από την υγρασία των σιτηρών. Επιπλέον, η υψηλή υγρασία, το στρες, η ξηρασία και οι ζημιές από έντομα συνδέονται επίσης με αυξημένη παραγωγή αφλατοξίνης (Singh & Kumari, 2022). Η έκθεση στις αφλατοξίνες γίνεται συνήθως μέσω της κατάποσης μολυσμένων τροφίμων και μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές συνέπειες για την υγεία. Οι αφλατοξίνες μπορούν να ανιχνευθούν στα εργαστήρια με διάφορες τεχνικές όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία-ηλεκτροψεκασμού ιονισμού tandem-φασματομετρία μάζας (LC-ESI-MS-MS) (Pohland & Trucksess, 2001). Οι ανοσολογικές μέθοδοι, όπως τα κιτ ανοσοανάλυσης με ένζυμο (ELISA), παρέχουν ταχεία διαλογή για αφλατοξίνες, αλλά ενδέχεται να μην είναι αξιόπιστες για ποσοτική ανίχνευση λόγω της περιορισμένης ευαισθησίας τους.

Ωχρατοξίνες

Η ωχρατοξίνη Α (OTA) είναι ένα σύνθετο μόριο που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον μύκητα *Aspergillus ochraceous* και αργότερα βρέθηκε σε άλλα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*, όπως το *Penicillium verucosum*. Αποτελεί σημαντική επιμόλυνση διαφόρων δημητριακών, όπως το καλαμπόκι, το κριθάρι και το σιτάρι, καθώς και ορισμένων οσπρίων όπως τα φασόλια, ο καφές, η σόγια και το κακάο. Η OTA, το κύριο συστατικό της ωχρατοξίνης, είναι γνωστή για την μεγάλη τοξικότητά της. Εκτός του ότι η ωχρατοξίνη Α είναι νεφροτοξίνη, οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα δείχνουν επίσης ότι είναι ηπατοτοξική, ανοσοκατασταλτική, ισχυρή τερατογόνος και επίσης καρκινογόνος (Schrenk et al., 2020). Η ωχρατοξίνη Α (OTA) μπορεί να αναλυθεί με διάφορες τεχνικές, όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA). Για να διασφαλιστούν ακριβή αποτελέσματα, συνιστάται η χρήση πολλαπλών τεχνικών για την επιβεβαίωση των επιπέδων OTA (Fung & Clark, 2004). Τα συνιστώμενα επίπεδα ανοχής για την OTA ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) έχουν

καθορίσει προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη 100 μικρογραμμάρια ανά κιλό σωματικού βάρους για την ΟΤΑ.

Κιτρινίνη

Η κιτρινίνη, μια πολυκετιδική μυκοτοξίνη, απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον μύκητα *Penicillium citrinum*. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι παράγεται και από άλλα είδη *Penicillium*. Αυτή η μυκοτοξίνη έχει εντοπιστεί σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των δημητριακών και των προϊόντων με βάση τα δημητριακά, όπως η βρώμη, η σίκαλη, το κριθάρι, το καλαμπόκι και οι σπόροι σιταριού. Επιπλέον, έχει ανιχνευθεί σε συμπληρώματα διατροφής που προέρχονται από ζυμωμένο ρύζι, σε φασόλια, σε μαύρες ελιές, μήλα, πυρηνόκαρπα κ.α. Ακόμα, η κιτρινίνη έχει βρεθεί σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, όπως τυρί, αλλοιωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, μπύρα, ζαμπόν και ζυμωμένα προϊόντα κρέατος (Singh & Kumari, 2022). Παρά τη συχνή συνύπαρξή της με την ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), η κιτρινίνη έχει αναγνωριστεί ως νεφροτοξίνη, προκαλώντας βλάβη στα νεφρά και το ήπαρ. Είναι ευαίσθητη στην αποικοδόμηση σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως οι 175°C, και μπορεί να διασπαστεί κατά την επεξεργασία τροφίμων (Fung & Clark, 2004).

Πατουλίνη

Η πατουλίνη είναι μια πολυκετιδική λακτόνη που παράγεται από διάφορα είδη μούχλας, συμπεριλαμβανομένων των *Penicillium*, *Aspergillus* και άλλων, τα οποία συνήθως μολύνουν φρούτα όπως τα μήλα, τα αχλάδια και τα σταφύλια. Η μέση θανατηφόρος δόση της πατουλίνης κυμαίνεται μεταξύ 15 και 25 mg/kg (χιλιοστογραμμάρια ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους), ανάλογα με το ζωικό είδος και τον βαθμό έκθεσης (Fung & Clark, 2004). Η τοξικότητα της πατουλίνης περιλαμβάνει συμφόρηση και οίδημα στα πνευμονικά, ηπατικά και εντερικά αιμοφόρα αγγεία και ιστούς. Υψηλές δόσεις πατουλίνης έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη σαρκομάτων σε ζώα, γεγονός που εγείρει ανησυχίες σχετικά με πιθανές καρκινογόνες επιδράσεις σε παιδιά και ενήλικες που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες χυμού φρούτων, ιδίως χυμού μήλου, για παρατεταμένες περιόδους. Η

Επιτροπή Codex Alimentarius του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) συνιστά όριο 50 (ppb) μικρογραμμάρια πατουλίνης ανά χιλιόγραμμο σε χυμό μήλου και μηλίτη για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων. Η πατουλίνη μπορεί να αποικοδομηθεί από διοξειδίο του θείου ή σουλφίδιο, ένα κοινό συντηρητικό τροφίμων που χρησιμοποιείται σε ξηρά φρούτα και χυμούς (Saleh & Goktepe, 2019).

Πίνακας 3: Διεθνείς κανονισμοί και οδηγίες για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Matthews et al., 2017)

Χώρα, περιοχή	Μυκοτοξίνες	Τρόφιμο ή ζωοτροφή	Μέγιστη τιμή ανοχής
Ηνωμένες Πολιτείες	Πατουλίνη	Χυμός μήλου, συμπυκνωμένος χυμός μήλου, προϊόντα χυμού μήλου	50ppb
	Φουμονισίνες B ₁ , B ₂ , B ₃	Ποπ κορν	4ppm
		Πίτουρο ξηρού αλεσμένου καλαμποκιού	4ppm
		Πουλερικά που υποβάλλονται σε επεξεργασία για σφαγή	100ppb
	Αφλατοξίνες B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Τρόφιμα	20ppb
		Φιστίκια, προϊόντα φιστικιού	20ppb
		Καρύδια Βραζιλίας, καρύδια τύπου πιστάτσιο	20ppb
	Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα	0,5ppb
	Αφλατοξίνες B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Ζωοτροφές καλαμποκιού και φιστικιών που προορίζονται για Ενήλικες μόσχους	

		Ενήλικες χοίρους	300ppb 200ppb
Ευρωπαϊκή Ένωση	Πατουλίνη	Χυμός μήλου και προϊόντα που προέρχονται από μήλα	50ppb
	Αφλατοξίνες B ₁	Καρυκεύματα (μοσχοκάρυδο, τζίντζερ, κουρκουμάς)	5ppb
	Αφλατοξίνες B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Καρυκεύματα (μοσχοκάρυδο, τζίντζερ, κουρκουμάς)	10ppb
	Αφλατοξίνες B ₁	Αραχίδες, ξηροί καρποί	2ppb
		Δημητριακά και μεταποιημένα προϊόντα	2ppb
	Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα	0,05ppb
	Ωχρατοξίνη A	Ακατέργαστα δημητριακά Αποξηραμένα φρούτα αμπέλου	5ppb 10ppb
	Ζεαραλενόνη	Ψωμιά, αρτοσκευάσματα, μπισκότα, δημητριακά	50ppb
Οδηγίες του Codex Alimentarius	Πατουλίνη	Χυμός μήλου και συστατικά χυμού μήλου σε άλλα ποτά	50ppb
	Αφλατοξίνες B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Φιστίκια που προορίζονται για περαιτέρω επεξεργασία	15ppb
	Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα	0,5ppb

Πίνακας 4: Σημαντικές μυκοτοξίνες που παράγονται από τα είδη του γένους *Aspergillus* και οι τοξικές τους επιδράσεις (Matthews et al., 2017)

Μυκοτοξίνες	Είδη	Τοξικότητα
Αφλατοξίνες B₁ και B₂	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Οξεία βλάβη στο συκώτι, καρκινογόνες (συκώτι), τερατογενετικές, ανοσοκατασταλτικές
Αφλατοξίνες G₁ και G₂	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Επιδράσεις παρόμοιες με τις αφλατοξίνες B. Η τοξικότητα της G ₁ είναι μικρότερη από της B ₁ , αλλά μεγαλύτερη από της B ₂
Κυκλοπιαζονικό οξύ	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i>	Εκφυλισμός και νέκρωση διαφόρων οργάνων, πρόκληση τρέμουλου, χαμηλή στοματική τοξικότητα
Ωχρατοξίνη A	<i>A. ochraceous</i> και σχετικά είδη <i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> (περιστασιακά)	Νέκρωση νεφρού, τερατογόνος, ανοσοκατασταλτική, πιθανώς καρκινογόνος
Fumitremorgens	<i>A. fumigatus</i>	Πρόκληση τρέμουλου (αρουραίοι και ποντίκια)
Κρυπτοκιβαλίνες	<i>A. clavatus</i>	Πρόκληση τρέμουλου

Πίνακας 5: Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής μυκοτοξινών (Matthews et. al., 2017)

Μυκοτοξίνη	Είδος	Θερμοκρασία (°C)	a _w
Αφλατοξίνη	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	33	0,99
Ωχρατοξίνη	<i>Aspergillus ochraceous</i>	30	0,98
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	15-20	0,85-0,90
	<i>Penicillium verrucosum</i>	25	0,90-0,98
Φουμοσίνη	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	10-30	0,93
Πατουλίνη	<i>Penicillium expansum</i>	0-25	0,95-0,99

1.3.3 Αναστολή - μείωση μυκοτοξινών παρουσία ζυμομυκήτων και οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB)

Οι μυκοτοξίνες έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο σε ολόκληρη την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων και ζωοτροφών. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η μόλυνση από μυκοτοξίνες είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ζήτημα σε παγκόσμιο επίπεδο τόσο στις βιομηχανίες τροφίμων και ζωοτροφών όσο και στις βιομηχανίες βιοαιθανόλης, γεγονός που προκάλεσε εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τις μεθόδους πρόληψης και απολύμανσης. Οι δυνατότητες των μικροοργανισμών να μετριάσουν τις σημαντικές οικονομικές απώλειες που προκαλούν οι τοξικοί μύκητες στη γεωργία διερευνώνται εκτενώς, με τους προκαρυώτες να είναι οι πιο διεξοδικά μελετημένοι, ακολουθούμενοι από τους ζυμομύκητες και, σε μικρότερο βαθμό, τους νηματοειδείς μύκητες (Pfliegler et al., 2015).

Συγκεκριμένα η παρουσία ζυμομυκήτων σε διάφορες τεχνολογικές διεργασίες μπορεί να έχει άμεση ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή τοξινών από ορισμένες μούχλες, η οποία είναι ανεξάρτητη από την κατασταλτική επίδραση της ανάπτυξής τους (Hua et al.,

2014). Επιπλέον, τα κυτταρικά τοιχώματα ορισμένων ειδών ζύμης έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις μυκοτοξίνες που υπάρχουν στα γεωργικά προϊόντα, απομακρύνοντάς τες αποτελεσματικά και απολυμαίνοντας τα προϊόντα. Οι προβιοτικές ζύμες ή τα προϊόντα που περιέχουν κυτταρικά τοιχώματα ζύμης ή άλλα πρόσθετα χρησιμοποιούνται για τον μετριασμό των επιπτώσεων της μυκοτοξίκωσης στα ζώα. Ορισμένα είδη ζύμης διαθέτουν επίσης επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα διάσπασης των τοξινών σε λιγότερο τοξικές ή μη τοξικές ενώσεις (Pfliegler et al., 2015).

Οι ανταγωνιστικοί ζυμομύκητες όχι μόνο μετριάζουν τις οικονομικές επιπτώσεις των παθογόνων νηματοειδών μυκήτων πριν ή μετά τη συγκομιδή, αλλά συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην πρόληψη της μόλυνσης από μυκοτοξίνες σε διάφορα προϊόντα. Επιπλέον, οι ζυμομύκητες αυτοί θεωρούνται ευρέως φιλικόι προς το περιβάλλον. Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει άμεση συσχέτιση μεταξύ της μείωσης της ανάπτυξης τοξινογόνου μούχλας και των μειωμένων επιπέδων μυκοτοξινών σε διάφορα προϊόντα και σε εργαστηριακό επίπεδο.

Ζύμη αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*)

Για παράδειγμα, ορισμένα στελέχη ζύμης αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*) έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη των *Aspergillus carbonarius* και *Fusarium graminearum*, καθώς και την καταστολή της παραγωγής ωχρατοξίνης Α (OTA), ζεαραλενόνης (ZEA) και δεοξυνιβαλενόλης (DON) υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (Armando et al., 2013).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο *S. cerevisiae* μειώνει την εμφάνιση της συνολικής ανάπτυξης μούχλας (*Aspergillus ochraceus* και *Aspergillus niger*) και της μόλυνσης OTA στον καφέ (Velmourougane et al., 2011). Διάφοροι πιθανοί τρόποι δράσης των ζυμομυκήτων είναι ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά συστατικά και η παραγωγή των ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Armando et al., 2013).

Debaryomyces hansenii CYC 1244

Ακόμα μία ζύμη όπως ο *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 είναι σε θέση να αναστείλει τη βιοσύνθεση της OTA του *Aspergillus westerdijkiae* σε επίπεδο μεταγραφής χρησιμοποιώντας αναπτυγμένα και ειδικά πρωτόκολλα με Real Time PCR. Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα απομάκρυνσης εξωκυτταρικής ποσότητας ωχρατοξίνης Α μέσω προσρόφησης στα κυτταρικά τοιχώματα της ζύμης, ιδίως σε χαμηλό pH (98% σε pH 3). Η προσρόφηση θα μπορούσε να παραχθεί από άμεση σύνδεση ορισμένων μορίων του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης και της ωχρατοξίνης Α, επομένως, η κατάσταση ιονισμού που παράγεται από το χαμηλό pH βελτιώνει την απομάκρυνση της τοξίνης από τα κύτταρα. Αντιθέτως οι υψηλότερες τιμές pH (5 και 7) θα προκαλούσαν μεγάλη αστάθεια στη σύνδεση μεταξύ τοξίνης και του κυτταρικού τοιχώματος μειώνοντας την ικανότητα των μορίων του κυτταρικού τοιχώματος να συνδέουν την OTA και να την απομακρύνουν. Η εφαρμογή αυτής της ζύμης, ακόμη και των νεκρών κυττάρων, θα μπορούσε να είναι κατάλληλη για την απομάκρυνση της OTA από ποτά που συχνά μολύνονται από την τοξίνη, όπως οι μούστοι, τα κρασιά ή οι χυμοί (Serna et. al., 2011).

S. cerevisiae οίνου

Ένα στέλεχος κρασιού *S. cerevisiae* βρέθηκε να ανταγωνίζεται την ανάπτυξη των *Aspergilli* και ανέστειλε επίσης την παραγωγή OTA των *A. carbonarius* και *A. ochraceus* μέσω της καταστολής του βιοσυνθετικού γονιδίου *pks* (πολυκετιδική συνθάση). Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά η δράση βιοελέγχου του στελέχους *S. cerevisiae* (*DISAABA1182*), το οποίο αναστέλλει την παραγωγή ωχρατοξίνης Α (OTA). Αυτό το στέλεχος παρουσιάζει εξαιρετικά χαρακτηριστικά βιοελέγχου τόσο σε συνθήκες *in vitro* όσο και σε συνθήκες *in vivo*, γεγονός που το καθιστά μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα μυκητοκτόνα για τον έλεγχο της ανάπτυξης μυκήτων και της παραγωγής OTA σε σταφύλια και άλλα νωπά ή αποξηραμένα φρούτα που είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από *Aspergillus spp.* και στη μόλυνση με OTA. Ο *S. cerevisiae* *DISAABA1182* έχει ήδη αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα OTA σε συνθετικό γλεύκος (Cubaiu et. al., 2012).

Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria)

Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε η ικανότητα ορισμένων στελεχών LAB που θανατώθηκαν με θερμότητα 100°C για 1 ώρα να δεσμεύουν την αφλατοξίνη M₁ (AFM₁) στο γάλα και την αφλατοξίνη B₁ (AFB₁), την ωχρατοξίνη A (OTA) και τη ζεαραλενόνη (ZEN) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα καλίου (PPB) in vitro. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν δέκα στελέχη LAB μεμονωμένα, με εμβολιασμό τους ταυτόχρονα με τον μύκητα ή μετά από επώαση του μύκητα για 24 ή 48 ώρες στους 25°C. Τα αποτελέσματα της έρευνας καταδεικνύουν ότι ορισμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) έχουν ισχυρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες. Η αναστολή παρατηρήθηκε μέσω της μείωσης του μεγέθους των αποικιών των μυκήτων, γεγονός που υποδηλώνει ένα φαινόμενο ανταγωνισμού (Møller et. al., 2021).

Συγκεκριμένα, η παραγωγή αφλατοξίνης B₁ (AFB₁) από τον *Aspergillus parasiticus* παρεμποδίστηκε όταν ο μύκητας εμβολιάστηκε ταυτόχρονα με τα στελέχη *Lactiplantibacillus plantarum* 3QB361 και 3QB350. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε AFB₁ όταν ο μύκητας εμβολιάστηκε με το στέλεχος 2QB383 του *Levilactobacillus* spp., ακόμη και όταν το LAB προστέθηκε 48 ώρες μετά τον μύκητα (Møller et al., 2021).

Σε μελέτες δέσμευσης, επτά αδρανοποιημένα στελέχη LAB μπόρεσαν να μειώσουν τα επίπεδα AFB₁, ωχρατοξίνης A (OTA) και ζεαραλενόνης (ZEN) κατά τουλάχιστον 50%, με τη μείωση να ποικίλλει ανάλογα με το pH. Ωστόσο, στο γάλα, μόνο δύο αδρανοποιημένα στελέχη LAB, *Levilactobacillus* spp. 3QB398 και *L. brevis* 2QB422, ήταν σε θέση να μειώσουν τα επίπεδα της αφλατοξίνης M₁ (AFM₁) κατά 33% και 45%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης στελεχών LAB για την μείωση της παρουσίας μυκοτοξινών (Corassin et. al., 2013).

Συμπερασματικά η απομάκρυνση των μυκοτοξινών από τα LAB γίνεται συνήθως με προσρόφηση (Bueno et. al., 2007), κατά την οποία τα μόρια των μυκοτοξινών δεσμεύονται αντιστρεπτά στις δομές που υπάρχουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (πεπτιδογλυκάνες, υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες, τειχοϊκό και λιποτειχοϊκό οξύ) μέσω ανταλλαγής ιόντων, συμπλοκοποίησης και υδρόφοβων επαναλήψεων (Afshar et. al., 2020). Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να συμβάλει στη μείωση των αφλατοξινών με προσρόφηση είναι η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, χαρακτηριστικό που υπάρχει στα

LAB όπως *Levilactobacillus* spp. 1QB459, *L. plantarum* 3QB361 και *Levilactobacillus* spp. 3QB398 (Møller et. al., 2021).

Κεφίρ

Στην παρούσα μελέτη, το κεφίρ (γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με τη χρήση κόκκων κεφίρ), το υπερκείμενο κεφίρ χωρίς κύτταρα (CFS) και το εξουδετερωμένο κεφίρ CFS (CFS-pH7) αξιολογήθηκαν για τις αντιμυκητιασικές τους ιδιότητες έναντι των *Aspergillus flavus* και *A. carbonarius*, που είναι γνωστό ότι παράγουν μυκοτοξίνες. Η παραγωγή OTA από τον *Aspergillus carbonarius* εξαλείφθηκε πλήρως (100%) από το κεφίρ και μείωσε σημαντικά την παραγωγή AFB₁ από τον *Aspergillus flavus* κατά 99,98%. Το υπερκείμενο χωρίς κύτταρα (CFS) και το εξουδετερωμένο CFS (CFS-pH7) μείωσαν σημαντικά την παραγωγή AFB₁ και OTA κατά 99,94-92,90% και 27,98-8,76%, αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το κεφίρ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διαχείριση των *Aspergillus flavus* και *A. carbonarius*, μειώνοντας την παραγωγή AFB₁ και OTA και ενισχύοντας έτσι την ασφάλεια της ανθρώπινης τροφικής αλυσίδας (Taheur et. al., 2020). Οι κόκκοι κεφίρ αποτελούνται από μια ποικιλία μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacilli*, *Lactococci*, *Leuconostocs*), βακτηρίων οξικού οξέος και ζύμης. Αυτοί οι μικροοργανισμοί συνυπάρχουν σε μια συμβιωτική σχέση και ο μικροβιόκοσμος στους κόκκους κεφίρ είναι υπεύθυνος για την παραγωγή μιας ποικιλίας ενώσεων όπως αμινοξέα, πεπτίδια, αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες, ακετοΐνη, ασβέστιο, φολικό οξύ, οξικό οξύ και βιταμίνες (de Oliveira et. al., 2019). Κατά συνέπεια, η προσρόφηση είναι πιθανώς ο κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην μείωση των επιπέδων AFB₁ και OTA από το κεφίρ. Επιπλέον, τα τρία βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus kefir*, *Kazachstania servazzii* και *Acetobacter syzygii* που απομονώθηκαν από το kefir βρέθηκε ότι μπορούν να προσροφούν μεταξύ 65-81% των AFB₁ και OTA που υπάρχουν σε συγκέντρωση 1 μg/ml στο γάλα (Taheur et al., 2017).

Οι ικανότητες προσρόφησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των κυττάρων ζύμης επηρεάζονται κυρίως από τις φυσικές τους δομές. Ωστόσο, τα χημικά συστατικά διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ κυτταρικών τοιχωμάτων και μυκοτοξινών. Οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από τον

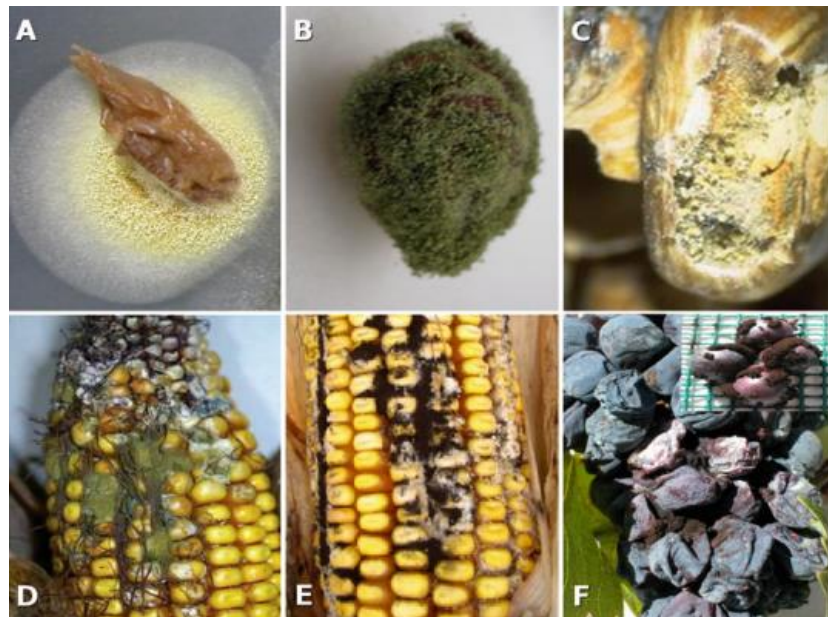
μικροοργανισμό ή υπάρχουν στα κυτταρικά του τοιχώματα είναι βασικοί παράγοντες στη δέσμευση των μυκοτοξινών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια από κεφίρ είναι ικανά να παράγουν τον εξωπολυσακχαρίτη kefiran, ο οποίος είναι μια διαλυτή γλυκογαλακτάνη που παράγεται κυρίως από το *L. kefiranofaciens* (Paiva et al., 2016). Οι μηχανικές ιδιότητες του kefiran μπορεί να συμβάλλουν στις ιδιότητες προσρόφησης του κεφίρ. Από την άλλη πλευρά, οι β-(1,3)- και β-(1,6)-d-γλυκάνες πιστεύεται ότι είναι κυρίως υπεύθυνες για τις ιδιότητες προσρόφησης μυκοτοξινών των ζυμών. Τα συστατικά αυτά είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική δέσμευση των μυκοτοξινών από αυτούς τους μικροοργανισμούς (Piotrowska & Masek, 2015).

1.4 Είδη του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* ταξινομείται στους ασκομύκητες και είναι ένα από τα πιο γνωστά και πιο συχνά αναγνωρισμένα γένη μυκήτων. Συγκεκριμένα είναι ένα ποικιλόμορφο γένος με μεγάλο οικονομικό και κοινωνικό αντίκτυπο. Τα είδη απαντούν σε διάφορους βιότοπους και είναι γνωστό ότι αλλοιώνουν τα τρόφιμα, παράγουν μυκοτοξίνες και αναφέρονται συχνά ως παθογόνα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Επιπλέον, πολλά είδη χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία για την παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών, όπως αντιβιοτικά, οργανικά οξέα, φάρμακα ή ένζυμα, ή ως παράγοντες σε πολλές ζυμώσεις τροφίμων (Samson et al., 2014). Αυτά τα είδη του γένους *Aspergillus* μπορούν να βρεθούν σε αποθηκευμένα προϊόντα όπως σιτηρά, καρύδια, μπαχαρικά και εντοπίζονται συχνότερα σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα παρά σε εύκρατα (Matthews et al., 2017). Το γένος *Aspergillus* είναι μεγάλο και περιλαμβάνει πάνω από 100 αναγνωρισμένα είδη πολλά από τα οποία είναι ευκαιριακά παθογόνα ικανά να προκαλέσουν λοιμώξεις. Ο *Aspergillus* αποτελεί σημαντική πηγή γεωργικής μόλυνσης και ρύπανσης με ορισμένα είδη του να παρουσιάζουν ανοχή στην ξηρασία, γεγονός που τους επιτρέπει να ευδοκιμούν σε δύσκολες συνθήκες και να προκαλούν αλλοίωση και μόλυνση των τροφίμων παγκοσμίως. Όταν τα σπόρια του *Aspergillus* συναντήσουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και βρεθούν σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, οι μύκητες αποικίζουν γρήγορα και προχωρούν στη σύνθεση μιας σειράς τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα

τα είδη *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* είναι οι κύριοι παραγωγοί των εξαιρετικά ισχυρών αφλατοξινών

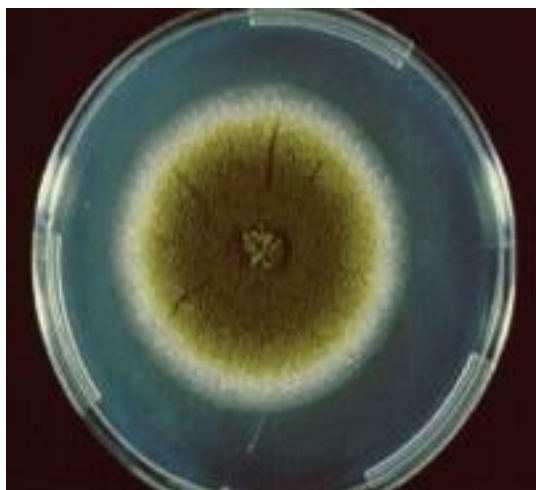
Ακόμα ο *Aspergillus* έχει ένα ευρύ φάσμα ανάπτυξης. Διαπιστώθηκε ότι αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασίας 10-50°C και pH μεταξύ και 2,0-11,0. Επίσης είναι οσμοανεκτικός σε συγκεντρώσεις αλατιού έως και 34% και η νηματοειδής μορφή του έχει αναπτύξει ικανότητα έκκρισης ενζύμων για τον βιότοπο ανάπτυξής του και αναπτύσσεται σε ενεργότητα νερού 0,40 (Jatomea et al., 2014). Στη συνέχεια παρατηρείται η παρουσία του γένους *Aspergillus* σε διάφορα φυτικά προϊόντα.



Εικόνα 3: Είδη *Aspergillus* σε φυτικά προϊόντα: **A)** *A. westerdijkiae* σε αποξηραμένα φρούτα, **B)** *A. flavus* σε αμύγδαλα, **C)** *A. flavus* σε πυρήνα αραβοσίτου, **D)** *A. flavus* σε στάχυ καλαμποκιού, **E)** *A. niger* σε στάχυ καλαμποκιού, **F)** *A. carbonarius* σε μούρα σταφυλιών (Perrone & Gallo, 2017).

1.4.1 *Aspergillus flavus*

Ο *Aspergillus flavus* είναι ένας σαπροφυτικός μύκητας που ευδοκimeί στο έδαφος και μπορεί να μολύνει τις γεωργικές καλλιέργειες, τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή, με την καρκινογόνο τοξίνη που παράγει, την αφλατοξίνη. Αυτός ο μύκητας είναι επίσης ευκαιριακός παθογόνος που μπορεί να προκαλέσει ασθένειες ασπεργίλλωσης σε ζώα και ανθρώπους, με αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Τα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην παθογένεια και την προσαρμογή του *A. flavus* σε εξειδικευμένες περιοχές περιλαμβάνουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, την έκκριση ενζύμων και άλλα (Amaiike & Keller, 2011). Ο *A. flavus* ευδοκimeί καλύτερα σε περιβάλλοντα με ενεργότητα νερού (a_w) που κυμαίνεται από 0,86 έως 0,96. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του *A. flavus* είναι οι 37°C, αλλά ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 12 έως 48°C. Αυτή η υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης συμβάλλει στην παθογένεια του *A. flavus* στον άνθρωπο, καθώς μπορεί να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί στον ανθρώπινο οργανισμό (Hedayati et al., 2007). Επίσης η χρήση κατάλληλων μέσων καλλιέργειας είναι απαραίτητη για την ακριβή ταυτοποίηση των ειδών *Aspergillus*. Τα τελευταία 30 χρόνια τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη των ειδών *Aspergillus* είναι σε άγαρ εκχυλίσματος βύνης (Malt Extract Agar, MEA) και άγαρ Czapek. Ταυτόχρονα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το Potato Dextrose Agar (PDA), όμως η εμφάνιση των αποικιών *Aspergillus* σε αυτό δεν θεωρείται αρκετά σταθερή ώστε να χρησιμοποιείται αξιόπιστα για διαγνωστικούς σκοπούς. Επίσης ένα από τα εκλεκτικά μέσα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικά για την ταυτοποίηση του *A. flavus* είναι το *Aspergillus flavus-parasiticus* agar (AFPA) (Gourama & Bullerman, 1995). Σε γενικές γραμμές, ο *A. flavus* σχηματίζει μία βελούδινη μυκηλιακή υφή που κυμαίνεται σε χρώμα από κιτρινοπράσινο έως καφέ στην επιφάνεια, με μια χρυσή έως κοκκινωπή-καφέ πίσω πλευρά. Οι κονιδιοφόροι, οι οποίοι φέρουν τα αγενή σπόρια, ποικίλλουν σε μήκος και έχουν τραχιά, σπυρωτή και αγκαθωτή υφή και τα κονίδια, ή σπόρια, είναι σφαιρικά έως ελαφρώς ωοειδή, με εμφανή τραχιά τοιχώματα, και έχουν διάμετρο μεταξύ 3,5 και 4,5 μm (Hedayati et al., 2007).



Εικόνα 4: Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του *A. flavus* στο άγαρ Czapek (Hedayati et al., 2007).



Εικόνα 5: Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του *A. flavus* (Hedayati et al., 2007)

Ο *Aspergillus flavus* παράγει μία ομάδα εξαιρετικά τοξικών και καρκινογόνων δευτερογενών μεταβολιτών όπως είναι οι αφλατοξίνες B₁ ή και B₂, καθώς και άλλες τοξικές ενώσεις όπως η στερογματοκυστίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ, το κοτζικό οξύ, το β-νιτροπροπιονικό οξύ, η ασπερτοξίνη, η γλοιτοξίνη και το ασπεργιλικό οξύ. Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων αποτελούν σημαντική απειλή για την ασφάλεια των γεωργικών προϊόντων και την ανθρώπινη υγεία.

Ακόμα τα είδη *Aspergillus*, συμπεριλαμβανομένου του *A. flavus*, είναι ικανά να παράγουν ένα ευρύ φάσμα υδρολυτικών ενζύμων, όπως α-αμυλάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες και λιπάσες. Τα ένζυμα αυτά πιστεύεται ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επίθεση και τη γονιμότητα των μυκήτων, καθώς επιτρέπουν τη χρησιμοποίηση θρεπτικών ουσιών πλούσιων σε λιπίδια και πρωτεΐνες, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με την επιτυχή εισβολή στους ιστούς του ξενιστή (Amaiike & Keller, 2011).

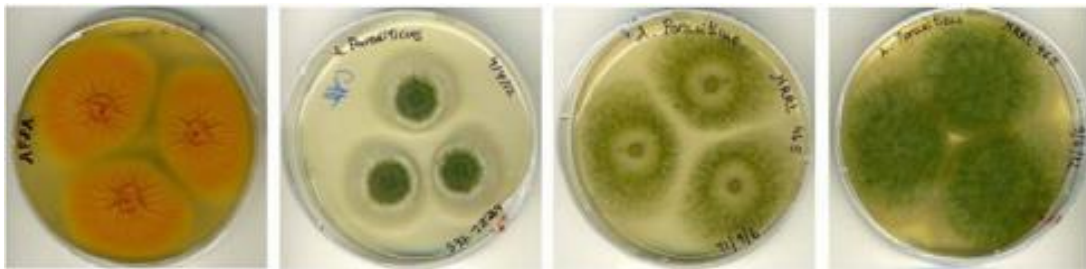
Ο μύκητας είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στις τροπικές περιοχές, όπου έχει μεγάλη προτίμηση στους ξηρούς καρπούς και τους ελαιούχους σπόρους. Για παράδειγμα, ο *A. flavus* βρέθηκε στο 97% των δειγμάτων φιστικιών που εξετάστηκαν στη Νοτιοανατολική Ασία. Δείγματα αραβοσίτου από την Ινδονησία και τις Φιλιππίνες παρουσίασαν επίσης υψηλά επίπεδα μόλυνσης από αυτόν τον μύκητα. Άλλα κοινά τρόφιμα της Νοτιοανατολικής Ασίας που έχουν βρεθεί να φιλοξενούν τον *A. flavus* περιλαμβάνουν ξηρούς καρπούς kemiri, πιπέρι, φασόλια velvet και talo, ψίχα καρύδας, μανιόκα, ρύζι και σόγια. Επιπλέον τα δημητριακά, ιδίως ο αραβόσιτος και τα προϊόντα με βάση τον αραβόσιτο, αποτελούν κοινό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *Aspergillus flavus* (Pitt & Hocking, 2009).

Συμπερασματικά αυτό το είδος μύκητα αποτελεί μια πολύπλευρη απειλή, επηρεάζοντας διάφορες πτυχές της ανθρώπινης υγείας. Η ικανότητά του να προκαλεί αλλεργική βρογχική ασπεργίλλωση υπογραμμίζει τη σημασία της κατανόησης και της αντιμετώπισης αυτής της μυκητιακής πρόκλησης.

1.4.2 *Aspergillus parasiticus*

Η κλιματική αλλαγή, ιδίως οι τάσεις αύξησης της θερμοκρασίας, δημιούργησε ευνοϊκές συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων και τοξινογόνων ειδών *Aspergillus* κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του αραβοσίτου στη Σερβία τα τελευταία χρόνια. Η πρώτη ανίχνευση του *Aspergillus parasiticus* που προσβάλλει σπόρους αραβοσίτου σε συνθήκες αγρού έγινε το 2012 στη Σερβία (Nikolić et al., 2018). Η εμφάνιση αυτού του τοξινογόνου μύκητα στις καλλιέργειες σιτηρών συνδέεται άμεσα με την αλλαγή του κλίματος, αποτελώντας σημαντική απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων και την ασφάλεια στην περιοχή (Nikolić et al., 2021). Ο *A. parasiticus* δεν ευθύνεται μόνο

για τη σήψη των σταχυών στον αραβόσιτο, αλλά αποτελεί επίσης σημαντικό κίνδυνο για την υγεία λόγω της ικανότητάς του να παράγει επιβλαβείς δευτερογενείς μεταβολίτες που ονομάζονται μυκοτοξίνες. Οι αφλατοξίνες, οι πιο τοξικές και καρκινογόνες φυσικές μυκοτοξίνες, μπορούν να μολύνουν διάφορες καλλιέργειες όπως ο αραβόσιτος, το βαμβάκι, η σόγια, τα φιστίκια και οι ξηροί καρποί πριν από τη συγκομιδή, αποτελώντας απειλή για την ανθρώπινη υγεία όταν καταναλώνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα οι τύποι αφλατοξινών που μπορεί να παράξει ο *A. parasiticus* είναι τέσσερις οι B₁, B₂, G₁, G₂ και ουσιαστικά όλες είναι τοξινογόνες και έχουν βρεθεί σε όλες τις ηπείρους (Hua et al., 2018).



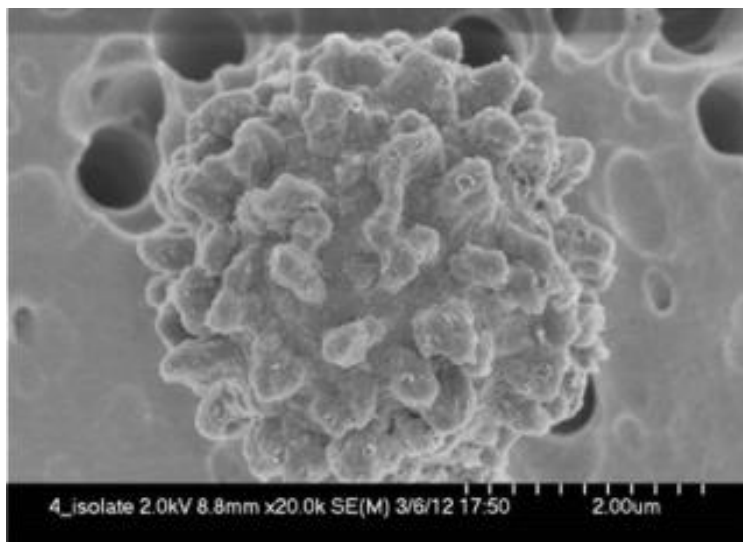
AFPA

CYA

MEA

CYA & 20 % σακχαρόζη

Εικόνα 6: Ο *Aspergillus parasiticus* εμβολιάστηκε σε τρυβλία με υποστρώματα Czapek yeast autolysate agar (CYA), Czapek yeast agar (CYA) με 20% σακχαρόζη, Malt Extract agar (MEA) και *Aspergillus flavus-parasiticus* agar (AFPA). Επώαστηκε για 7 ημέρες σε σκοτάδι στους 28°C και η εμφάνιση των αποικιών και οι διάμετροι καταγράφηκαν με ψηφιακή εικόνα (Hua et al., 2018).



Εικόνα 7: Εικόνα του *Aspergillus parasiticus* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hua et al., 2018).

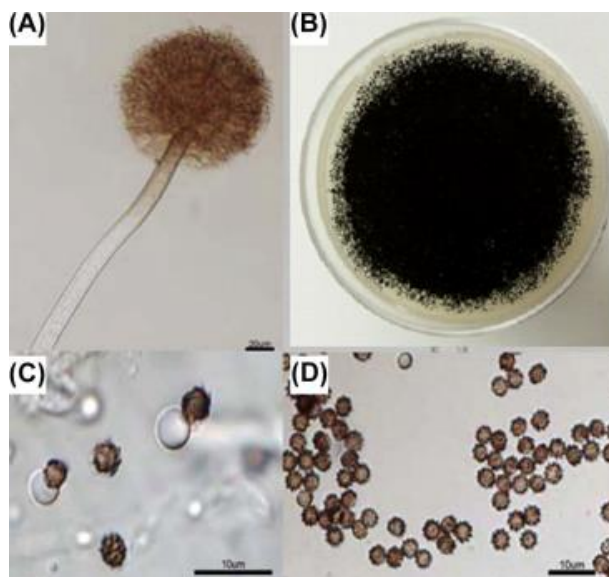
Πίνακας 6: Ελάχιστες και βέλτιστες θερμοκρασίες (T_m) και ενεργότητα νερού (a_w) για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή μυκοτοξίνης (Mannaa & Kim, 2017).

Ανάπτυξη μύκητα / παραγωγή μυκοτοξίνης

Μύκητας	Τοξίνη	Ελάχιστη Θερμοκρασία T_m (°C)	Βέλτιστη Θερμοκρασία T_m (°C)	Ελάχιστη a_w	Βέλτιστη a_w
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Αφλατοξίνη	-	35/33	0,81-0,82	0,95/0,99

1.4.3 *Aspergillus niger*

Ο *Aspergillus niger* είναι ένας νηματοειδής μύκητας που ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων. Είναι ευρέως γνωστός για την ικανότητά του να παράγει μεγάλες ποσότητες κιτρικού οξέος, γεγονός που τον καθιστά πρότυπο οργανισμό για τις διεργασίες μυκητιακής ζύμωσης. Με περισσότερους από ένα εκατομμύριο τόνους κιτρικού οξέος που παράγονται ετησίως, ο *A. niger* έχει καταστεί βασικός παράγοντας στον παγκόσμιο κύκλο του άνθρακα ως εδαφικός σαπρόφυτος ικανός να διασπάσει τη λιγνοκυτταρίνη των φυτών χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων (Liaud et al., 2014). Ο *Aspergillus niger* ευδοκίμει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Ως κοινό μέλος της ομάδας των "black Aspergilli", μπορεί να αναπτύσσεται αερόβια σε οργανική ύλη όπως το έδαφος, τα απορρίμματα, το κομπόστ και το αποσυντιθέμενο φυτικό υλικό. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο *A. niger* παρουσιάζει αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών 6-47°C, με βέλτιστο εύρος 35-37°C. Επιπλέον, μπορεί να ανεχθεί σχετικά υψηλά επίπεδα ενεργότητας νερού (a_w), με ελάχιστη απαίτηση 0,88 και είναι αξιοσημείωτο ότι αυτός ο μύκητας μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα pH, από 1,4 έως 9,8 (Schuster et al., 2002). Αυτά τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης, σε συνδυασμό με την αερομεταφερόμενη διασπορά των κονιδιοσπορίων, συμβάλλουν στην παρουσία του *A. niger*, ιδίως σε θερμά και υγρά περιβάλλοντα. Η ικανότητά του να ευδοκίμει υπό ποικίλες συνθήκες τον έχει καταστήσει μολυσματικό παράγοντα, με υψηλότερες συχνότητες να παρατηρούνται σε ορισμένα βιομηχανικά και γεωργικά περιβάλλοντα που περιλαμβάνουν υλικά φυτικής προέλευσης.



Εικόνα 8: **A)** Κονιδιοφόροι του *A. niger* με ακτινωτή κεφαλή, **B)** Αποικία του *A. niger*, **C** και **D)** Στρογγυλά κονίδια (Jatomea et al., 2014)

Εκτός από τον πρωταρχικό του ρόλο στην παραγωγή κιτρικού οξέος, ο *Aspergillus niger* είναι επίσης πλούσια πηγή διαφόρων ενζύμων που έχουν αξιοποιηθεί για βιομηχανικές εφαρμογές. Ορισμένα από τα πρώτα ένζυμα που παρήχθησαν από τον *A. niger* περιλαμβάνουν την πηκτινάση, την πρωτεάση και την αμυλογλυκοσιδάση, τα οποία αρχικά παρασκευάστηκαν με τεχνικές επιφανειακής καλλιέργειας (Schuster et al., 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι ένα μικρό ποσοστό απομονωμένων ατόμων του *A. niger*, είναι ικανό να παράγει τη μυκοτοξίνη, ωχρατοξίνη Α υπό ορισμένες συνθήκες. Ο *Aspergillus niger* είναι ένας μύκητας που απομονώνεται συχνά από διάφορους ξηρούς καρπούς και ελαιούχους σπόρους. Έχει βρεθεί σε φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια, κάσιους, καρύδες και άλλα. Εκτός από τους ξηρούς καρπούς, ο *A. niger* ανιχνεύεται ακόμα και σε δημητριακά ιδίως στον αραβόσιτο (Pitt & Hocking, 2009).

1.5.Βακτήρια

1.5.1. Γενικές Πληροφορίες

Τα βακτήρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στο φυσικό οικοσύστημα, καθώς χρησιμεύουν ως πρωταρχικοί αποικοδομητές και ανακυκλωτές του βιοτικού κόσμου. Τα βακτήρια είναι ουσιώδεις συμμετέχοντες στους βιολογικούς κύκλους των στοιχείων, δρώντας ως φορείς χημικών αλλαγών μεγάλης κλίμακας που έχουν ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικές μεταβολές. Οι αποικοδομητικές δραστηριότητές τους είναι υψίστης σημασίας για τη μετατροπή των οργανικών υλικών. Τόσο στο έδαφος όσο και στο νερό, μπορούν να αποσυνθέσουν μια μεγάλη ποικιλία ουσιών, πολλές από τις οποίες δεν μπορούν να διασπαστούν από άλλους οργανισμούς. Ένα μόνο βακτηριακό είδος μπορεί να είναι ικανό να μεταβολίζει έως και εκατό ή περισσότερες διαφορετικές οργανικές ενώσεις (Raza et al., 2023).

Ενώ υπάρχουν όρια στις ικανότητες κάθε βακτηριακού είδους, συλλογικά, είναι ικανά να αποικοδομούν σχεδόν όλες τις φυσικές και πολλές συνθετικές ενώσεις (Palmer & Foster, 2022). Αυτό περιλαμβάνει ουσίες όπως η φορμαλδεΰδη, η φαινόλη, η αιθανόλη, το βενζόλιο, το ναφθαλένιο, η κηροζίνη, η παραφίνη, το μεθάνιο, η τεστοστερόνη, η νικοτίνη, η χιτίνη. Ο ρόλος των βακτηρίων ως οι μεγάλοι αποικοδομητές του βιοτικού κόσμου είναι απαραίτητος για την οικονομία της φύσης. Η ικανότητά τους να αποσυνθέτουν και να αναδιατάσσουν τα υλικά είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας και της σταθερότητας του οικοσυστήματος. Συμμετέχοντας στους βιολογικούς κύκλους των στοιχείων και επιφέροντας χημικές μεταβολές μεγάλης κλίμακας, τα βακτήρια διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη διαμόρφωση του περιβάλλοντος και εξασφαλίζουν τη συνεχή ανακύκλωση των πόρων (Tkaczyk et al., 2023).

Μία από τις βασικές λειτουργίες των βακτηρίων είναι η ικανότητά τους να διαλύουν αδιάλυτα βιοπολυμερή, όπως πρωτεΐνες, κυτταρίνη και χιτίνη. Η διαδικασία αυτή όχι μόνο καθιστά τις ενώσεις αυτές πιο προσιτές για τον βακτηριακό μεταβολισμό, αλλά και μετατρέπει τις "άχρηστες" ουσίες σε πιο εύκολα διαθέσιμες μορφές. Για παράδειγμα, τα βακτήρια μπορούν να μετατρέψουν υδρογονάνθρακες πετρελαίου σε βακτηριακές πρωτεΐνες, μετατρέποντας αποτελεσματικά αυτές τις δύσκολες ενώσεις σε μια πιο

εύχρηστη μορφή. Συννοψίζοντας, τα βακτήρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της σταθερής κατάστασης του φυσικού περιβάλλοντος μέσω της ικανότητάς τους να διαλύουν και να μετασχηματίζουν διάφορες ενώσεις, καθώς και μέσω της ενεργού συμμετοχής τους στις τροφικές αλυσίδες και της μεταβολής τους. Ωστόσο, αυτή η ισορροπία είναι εύθραυστη και μπορεί εύκολα να διαταραχθεί από την εισαγωγή ξένων ή υπερβολικών υλικών, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία της κατανόησης και της διατήρησης της περίπλοκης ισορροπίας που συντηρείται από τη βακτηριακή κοινότητα.

Τα βακτήρια, μέσω των μεταβολικών τους διεργασιών, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη και την εξέλιξη άλλων οργανισμών στο περιβάλλον τους (Ντάβου, 2021). Αυτά τα μικρόβια μπορούν να παράγουν ουσίες που είτε αναστέλλουν είτε προωθούν την ανάπτυξη άλλων έμβιων όντων, ανάλογα με τις συγκεκριμένες ενώσεις που παράγουν.

Μια αξιοσημείωτη συνέπεια των βακτηριακών δραστηριοτήτων είναι ο αυξημένος ανταγωνισμός για βασικά θρεπτικά συστατικά. Λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξής τους και του αποτελεσματικού μεταβολισμού τους, τα βακτήρια μπορούν γρήγορα να καταναλώνουν και να εξαντλούν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά στο περιβάλλον τους. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί όταν προστίθενται στο έδαφος μεγάλες ποσότητες οργανικών υλικών, όπως άχυρο ή πριονίδι. Ο ταχύς πολλαπλασιασμός των βακτηρίων που αποικοδομούν την κυτταρίνη οδηγεί σε εξάντληση του αζώτου, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των φυτών, με αποτέλεσμα την προσωρινή επιβράδυνση της ανάπτυξης τους (Παπαδημητρίου, 2015).

Επιπλέον, τα βακτήρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη μετατροπή της οργανικής ύλης σε ανόργανες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου του διοξειδίου του άνθρακα. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως ανοργανοποίηση, έχει σημαντικές επιπτώσεις στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον (Τσουμαχίδου, 2016). Με τη διάσπαση πολύπλοκων οργανικών μορίων σε απλούστερες ανόργανες μορφές, τα βακτήρια καθιστούν αυτά τα θρεπτικά συστατικά πιο προσιτά σε άλλους οργανισμούς, όπως τα φυτά και άλλα μικρόβια, επηρεάζοντας έτσι τη συνολική δυναμική του οικοσυστήματος.

Η αποσύνθεση είναι ο γενικός όρος για τη διαδικασία διάσπασης της οργανικής ύλης στα ανόργανα συστατικά της (Dragomiretskiy & Zosso, 2014). Όταν πρόκειται για οργανικές

ενώσεις, η διαδικασία αυτή απαιτεί συνήθως οξυγόνο και περιλαμβάνει την οξείδωση αυτών των ενώσεων σε διοξείδιο του άνθρακα μέσω της αερόβιας αναπνοής.

Τα βακτήρια αναπτύσσουν περίπλοκες σχέσεις μεταξύ τους και με άλλους οργανισμούς στο περιβάλλον τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υπερβαίνουν τους τρόπους που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως ο ανταγωνισμός για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων και ανασταλτικών ουσιών και η κινητοποίηση θρεπτικών συστατικών. Ορισμένα βακτήρια, ιδίως τα μυξοβακτήρια, εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα που μπορούν να διαλύσουν ή να διαρρήξουν άλλα βακτηριακά κύτταρα, μια διαδικασία γνωστή ως λύση.

Τα βακτήρια ανήκουν στο Βασίλειο των Προκαρυωτικών, το οποίο περιλαμβάνει επίσης τα κυανοβακτήρια και τα αρχαιοβακτήρια. Ενώ πολλοί πιστεύουν ότι τα αρχαιοβακτήρια θα έπρεπε να αποτελούν ξεχωριστό Βασίλειο λόγω των σημαντικών διαφορών τους από τις άλλες δύο ομάδες, οι περισσότεροι επιστήμονες τα κατατάσσουν σε ξεχωριστό υποβασίλειο. Τα βακτήρια και τα προκαρυωτικά γενικότερα είναι αποκλειστικά μονοκύτταροι οργανισμοί μικρού μεγέθους, με απλή κυτταρική οργάνωση και χαμηλή πολυπλοκότητα (Sender et al., 2016). Στο Βασίλειο των Προκαρυωτικών παρατηρούνται διαδικασίες και μορφές παρόμοιες με αυτές των ευκαρυωτικών οργανισμών, αλλά σε πολύ απλούστερη μορφή. Για παράδειγμα, υπάρχει φωτοσύνθεση, η οποία εξελίχθηκε αργότερα στα ανώτερα φυτά, καθώς και εφησυχάζουσες μορφές όπως τα σπόρια, παρόμοια με τις κύστες των πρωτοζώων και τα χλαμυδοσπόρια των μυκήτων (Simkin et al., 2022). Τα βακτήρια μπορούν να είναι παραγωγοί, καταναλωτές ή αποικοδομητές. Τα κυανοβακτήρια και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια είναι παραγωγοί και φωτοαυτότροφοι ή φωτοετερότροφοι οργανισμοί (Touliabah et al., 2022). Εκτός από τα χημειοετερότροφα βακτήρια που είναι καταναλωτές ή αποικοδομητές, υπάρχουν και χημειοαυτότροφα βακτήρια που παραλαμβάνουν ενέργεια οξειδώνοντας χημικές ενώσεις του περιβάλλοντος. Τα βακτήρια επιδεικνύουν εξαιρετική προσαρμοστικότητα σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, ακόμη και ακραίες. Κάθε είδος ή στέλεχος είναι προσαρμοσμένο σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Το απλό βακτηριακό κύτταρο επιτρέπει μεγάλη πολυμορφία, χάρη στις χαμηλές αναβολικές ανάγκες και την ενεργειακή αποτελεσματικότητα (Tacconelli et al., 2017).

1.5.2.Στοιχεία Μορφολογίας, Κυτταρολογίας Και Ταξινόμησης Βακτηρίων

A. Φύση των βακτηρίων

Τα βακτήρια αναπαράγονται μέσω αγενούς αναπαραγωγής. Ο πολλαπλασιασμός τους συνήθως πραγματοποιείται μέσω διχοτόμησης, όπου το κύτταρο διαιρείται σε δύο ίσα μέρη (Cojic et al., 2023). Δεν υπάρχει περιορισμός στον αριθμό των διαιρέσεων που μπορεί να υποστεί ένα βακτηριακό κύτταρο, εφόσον οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Ορισμένα βακτήρια αναπαράγονται επίσης μέσω εκβλάστησης, όπου σχηματίζονται νέα κύτταρα από το μητρικό κύτταρο. Τα βακτήρια δεν διαθέτουν εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα. Κάθε βακτηριακό κύτταρο έχει τη δυνατότητα να αναπαραχθεί ανά πάσα στιγμή, εφόσον οι συνθήκες είναι κατάλληλες. Για αυτόν τον λόγο, τα βακτηριακά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως βλαστικά, καθώς μπορούν να παράγουν απογόνους ανά πάσα στιγμή (Lambert & Weinberg, 2021).

Ορισμένα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν ανθεκτικές μορφές, γνωστές ως σπόρια, όταν αντιμετωπίζουν δυσμενείς συνθήκες. Τα σπόρια δεν είναι αναπαραγωγική μορφή, αλλά μια μέθοδος επιβίωσης σε αντίξοες συνθήκες. Κατά τη διαδικασία της σποριογονίας, το βακτηριακό κύτταρο πραγματοποιεί αναδιπλασιασμό του γενετικού υλικού και παράγει ένα σπόριο εντός του κυττάρου (ενδοσπόριο). Η θέση του ενδοσπορίου μέσα στο κύτταρο είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος βακτηρίου. Τα σπόρια έχουν ιδιαίτερα ανθεκτικό περίβλημα και μειωμένο μεταβολισμό, επιτρέποντάς τους να επιβιώνουν σε δυσμενείς συνθήκες για πολύ μεγάλες χρονικές περιόδους. Όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές, το σπόριο μπορεί να βλαστήσει και να παράγει ξανά το κανονικό βακτηριακό κύτταρο (Jonsson et al., 2023).

Το βακτηριακό κύτταρο διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα που χαρακτηρίζεται από δύο βασικούς τύπους, οι οποίοι διακρίνονται από τις χρώσεις Gram (Kumar et al., 2022). Αυτοί οι δύο τύποι δεν έχουν καμία σχέση βιοχημικά με το ευκαρυωτικό κυτταρικό τοίχωμα. Η χρώση Gram, παρόλο που είναι μια τεχνητή μέθοδος, αντικατοπτρίζει μια βασική βιολογική διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος. Τα αρνητικά κατά

Gram βακτήρια έχουν ένα πολύ πιο πολύπλοκο αλλά λεπτότερο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν ένα πολύ παχύτερο αλλά απλούστερο κυτταρικό τοίχωμα. Αυτή η διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος είναι το βασικό χαρακτηριστικό που αντικατοπτρίζεται στη χρώση Gram (Chrissian et al., 2020).

Παρόλο που ορισμένα βακτήρια, δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα τα περισσότερα βακτήρια το διαθέτουν. Η δομή και λειτουργία του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει από αυτή των ευκαρυωτικών οργανισμών. Κυρίως, το βασικό συστατικό του (τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια, αν και σε διαφορετικές αναλογίες) είναι η πεπτιδογλυκάνη, ενώ στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι οι πολυσακχαρίτες (χιτίνη στους μύκητες, κυτταρίνη στα φυτά). Λόγω της απουσίας κυτταρικού σκελετού, το κυτταρικό τοίχωμα προσδίδει οσμωτική προστασία και σχήμα στο βακτηριακό κύτταρο (Hummels et al., 2023). Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη, από την οποία διαχωρίζεται από τον περιπλασμικό χώρο. Το σύνολο του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης αναφέρεται ως περίβλημα ή εξωτερική στοιβάδα. Εκτός από το κυτταρικό τοίχωμα, το βακτηριακό κύτταρο μπορεί να διαθέτει επιπρόσθετα εξωτερικά περιβλήματα. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη, και μπορεί να θεωρηθεί ως όργανο του βακτηρίου. Τα εξωτερικά περιβλήματα, παρόλο που μπορεί να είναι εξίσου ζωτικής σημασίας, δεν θεωρούνται όργανα. Τέτοια εξωτερικά περιβλήματα περιλαμβάνουν το έλυτρο και τον γλυκοκάλυκα. Πρόκειται για περιβλήματα από μακρομοριακές ενώσεις, κυρίως πολυσακχαρίτες ή/και πολυπεπτίδια. Το έλυτρο απαντάται σε διάφορα βακτήρια, κυρίως Gram-θετικά, αλλά όχι αποκλειστικά, ούτε από όλα τα Gram-θετικά βακτήρια. Τα βακτήρια που διαθέτουν έλυτρο ονομάζονται ελυτροφόρα. Το έλυτρο έχει βλεννώδη υφή και πυκνή διάταξη, παρέχοντας προστασία από τη φαγοκυττάρωση, την αφυδάτωση, την προσέγγιση βακτηριοφάγων και τοξικών ουσιών. Επιπλέον, βοηθά στην καλύτερη προσκόλληση σε διάφορες επιφάνειες (Goczał & Beutel, 2023). Αντίθετα, ο γλυκοκάλυκας αποτελείται από παρόμοια μόρια, αλλά με χαλαρή διάταξη, σχηματίζοντας ένα πλέγμα, προκειμένου να έχει αυξημένη προσκολλητική ικανότητα, ιδίως στους βλεννογόνους, αλλά χωρίς την αμυντική λειτουργία του ελύτρου.

Η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με αυτή των ευκαρυωτικών οργανισμών. Συγκεκριμένα, περιέχει λιγότερες πρωτεΐνες, τόσο

περιφερειακές όσο και διαμεμβρανικές. Επιπλέον, απουσιάζουν μόρια στερολών (με εξαίρεση τα μυκοπλάσματα), τα οποία περιορίζουν την κινητικότητα των φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας στα ευκαρυωτικά και προσδίδουν μεγαλύτερη συνοχή στη δομή της, αποτρέποντας διαρροές ύδατος λόγω της υψηλής υδροφοβικότητάς τους (Zhang et al., 2016). Επιπροσθέτως, τα φωσφολιπίδια της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης διαφοροποιούνται σημαντικά από αυτά των ευκαρυωτικών, με κύρια διαφορά το μήκος των λιπαρών οξέων. Στα βακτήρια, τα λιπαρά οξέα είναι μικρότερου μήκους, γεγονός που προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή και αυξημένη λειτουργικότητα υπό συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Smith et al., 2013).

Τα βακτήρια διαθέτουν μαστίγια, που είναι μακριές, λεπτές δομές που τους επιτρέπουν να κινούνται. Αυτά τα μαστίγια, τα οποία μπορούν να καλούνται και βλεφαρίδες, έχουν μια πολύ διαφορετική δομή και βιοχημεία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δομικά στοιχεία των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως τα πρωτόζωα, ορισμένα μετόζωα (π.χ. σπερματοζωάρια) και οι μύκητες (π.χ. μαστιγομύκητες) (Worrall et al., 2023). Συγκεκριμένα, το βακτηριακό μαστίγιο δεν περιβάλλεται από βασική μεμβράνη ούτε δομείται από μικροσωληνίσκους, όπως τα ευκαρυωτικά μαστίγια και οι βλεφαρίδες, και δεν εκφύεται από κεντρίδια. Το βακτηριακό μαστίγιο δεν κάμπτεται, αλλά κάνει περιστροφική κίνηση για να δημιουργήσει ελκτική ή προωστική ισχύ. Εκφύεται από την κυτταρική μεμβράνη, από ένα σχηματισμό πτερωτής (ρότορα) που ονομάζεται βασικό σώμα, ο οποίος προσδίδει την περιστροφική κίνηση. Η δομή του βασικού σώματος διαφέρει μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Sun et al., 2021). Ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των μαστιγίων, τα βακτήρια διακρίνονται σε μονότριχα, αμφίτριχα, λοφιοτίριχα, αμφιλοφιοτίριχα και περίτριχα.

Εκτός από τα μαστίγια, τα βακτήρια διαθέτουν και άλλα νηματοειδή εξαρτήματα που ονομάζονται ινίδια. Τα ινίδια δεν αποτελούν όργανα κίνησης, αλλά έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Είναι λεπτά και βραχέα, ευθύγραμμου και όχι κυματοειδούς σχήματος, στερούνται βασικού σώματος, εκφύονται από την κυτταρική μεμβράνη, και αποτελούνται από πρωτεϊνικές υπομονάδες που διατάσσονται ελικοειδώς για να προσδώσουν δομή κυλίνδρου. Τα ινίδια χρησιμεύουν είτε για την αναγνώριση άλλων βακτηρίων προς

δημιουργία κυτταροπλασματικής γέφυρας κατά τη βακτηριακή σύζευξη (φυλετικά ή συζευκτικά ινίδια) είτε αποτελούν όργανα προσκόλλησης του βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή (Piscon et al., 2023).

Τα βακτήρια, παρόλο που διαθέτουν απλούστερη δομή σε σύγκριση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, εκτελούν βασικές βιολογικές λειτουργίες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Αντί για διακριτά οργανίδια, οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται στις έσω πτυχές της κυτταρικής τους μεμβράνης. Τα βακτήρια διαθέτουν ριβοσώματα, αλλά μικρότερου μεγέθους και πρωτεϊνικού περιεχομένου σε σύγκριση με τα ευκαρυωτικά.

Το βακτηριακό κύτταρο διαθέτει ένα κυκλικό μόριο DNA που συνδέεται με πρωτεΐνες διαφορετικής φύσης, σύστασης και ποσότητας σε σύγκριση με τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα. Παρόλο που δεν έχει οργανωμένη χρωμοσωμική δομή ή σύσταση, αυτό το μόριο DNA συχνά αναφέρεται ως "βακτηριακό χρωμόσωμα" (Harju et al., 2023). Το βακτηριακό DNA δεν βρίσκεται διάσπαρτο στο κυτταρόπλασμα, αλλά σε μια σχετικά καθορισμένη θέση, το πυρηνοειδές. Ωστόσο, το πυρηνοειδές δεν είναι περιφραγμένο και ελεγχόμενο όπως ο οργανωμένος και διαχωρισμένος από το κυτταρόπλασμα πυρήνας των ευκαρυωτικών κυττάρων.

B. Ταξινόμηση

Όπως αναφέρθηκε, τα βακτήρια ανήκουν στα προκαρυωτικά. Το Βασίλειο μπορεί να χωριστεί σε δύο ευρύτατα υποσύνολα (Υποβασίλεια), τα Αρχαιοβακτήρια και τα Ευβακτήρια (Λάζου, 2021). Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι αρμονικός, καθώς τα δεύτερα είναι πολύ περισσότερα, αλλά αντικατοπτρίζει τις μεγάλες διαφορές τους. Είναι σύνηθες ωστόσο, όλα τα προκαρυωτικά να χωρίζονται σε 35 μεγάλες ομάδες, κάθε μία εκ των οποίων μπορεί να εμπεριέχει άλλες μικρότερες ταξινομικές βαθμίδες ή όχι, και ομαδοποιείται σε μία από τις 4 Κατηγορίες στις οποίες διαιρείται το Βασίλειο. Σε αυτές τις 35 ομάδες περιγράφονται 566 γένη βακτηρίων. Βασικό χαρακτηριστικό σε αυτή την κατάταξη είναι η απουσία ή παρουσία και η φύση (Gram+ ή -) του κυτταρικού τοιχώματος. Οι 3 από τις 4 Κατηγορίες ανήκουν στα ευβακτήρια και διακρίνονται ακριβώς από την ύπαρξη Gram- (1η κατηγορία) ή Gram+ (2η κατηγορία) κυτταρικού τοιχώματος. Η 3η κατηγορία είναι τα βακτήρια που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος, ενώ η 4η

αποτελείται από τα αρχαιοβακτήρια. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν μόλις μία ομάδα από τις 35 των Προκαρυωτικών, και ανήκουν στην 1η κατηγορία, δηλαδή είναι Gram-αρνητικά.

Περαιτέρω, τα βακτήρια διαιρούνται με βάση τη μορφολογία της βλαστικής τους φάσης. Το σχήμα του κυττάρου διακρίνει τα βακτήρια σε 4 υποσύνολα:

- 1) Κόκκοι ή κοκκιοειδή, που έχουν βασικά σφαιρικό σχήμα.
- 2) Βακτηρίδια ή βακτηριοειδή ή βάκιλλοι, με επίμηκες σχήμα (τα πρώτα έχουν μεγαλύτερο κλάσμα μήκους/διάμετρο από τα τελευταία).
- 3) Σπειροειδή με κεκαμμένο κύτταρο, που μπορεί να μοιάζει με ανοικτή καμπύλη ή να έχει έναν αριθμό από πλήρεις σπείρες.
- 4) Πολύμορφα, που δεν λαμβάνουν συγκεκριμένο σχήμα. Εντός αυτών υπάρχουν κάποια, τα διακλαδιζόμενα, που δίνουν την εντύπωση ευκαρυωτικού οργανισμού λόγω του πολύπλοκου σχήματος του κυττάρου τους. Άλλα έχουν ακανόνιστο ή ευμετάβλητο σχήμα, ενίοτε λόγω απουσίας κυτταρικού τοιχώματος.

Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει μια επιπλέον διάκριση ανάλογα με τη μορφή που αποκτούν οι κόκκοι στο χώρο μετά από μερικές κυτταρικές διαιρέσεις. Αυτή διαφοροποιείται ανάλογα με τη διατήρηση ή αλλαγή των επιπέδων κατά τα οποία συντελούνται οι διαδοχικές κυτταροδιαιρέσεις. Έτσι, διακρίνονται: α) στρεπτόκοκκοι, β) διπλοί κόκκοι ή διπλόκοκκοι, γ) κόκκοι σε τετράδες, γ) σταφυλόκοκκοι, και δ) σαρκίνες (8 κόκκοι σε διάταξη κύβου).

Στη δεύτερη περίπτωση διακρίνονται: α) τα ατρακτόμορφα, που είναι ευρύτερα στο μέσον τους σε σχέση με τα άκρα, β) τα κοκκοβακτηρίδια ή κοκκοβάκιλλους, με το μήκος τους να είναι λίγο μεγαλύτερο από το εύρος, με αποτέλεσμα μορφολογικά να βρίσκονται μεταξύ κόκκων και βακίλλων, γ) τους στρεπτοβάκιλλους ή στρεπτοβακτηρίδια.

Στην τρίτη περίπτωση παρατηρούνται: α) τα δονάκια, με κύτταρο καμπύλο, σαν το σημείο στίξης κόμμα, β) τα σπειρίλλια, με κύτταρα που εμφανίζουν πραγματικές αλλά ολιγάριθμες σπείρες και γ) τα σπειροχαιτικά, με πολλές σπείρες. Τα σπειροειδή ευβακτήρια είναι Gram⁺.

Στην τέταρτη περίπτωση συνωστίζονται βακτήρια χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, και ως εκ τούτου, μεταβλητού σχήματος, δηλαδή της τρίτης κατηγορίας (Μυκοπλάσματα), αλλά και βακτήρια διακλαδιζόμενα, είτε Gram⁺ (Ακτινομύκητες) είτε Gram- (Κυανοβακτήρια). Τα διακλαδιζόμενα εμφανίζουν αθροίσματα που μοιάζουν περισσότερο με πολυκύτταρο σχηματισμό (για την ακρίβεια, με θαλλό μυκήτων, εξ ου και το όνομα Ακτινομύκητες) και λιγότερο με τυπικές αποικίες προκαρυωτικών.

Υπενθυμίζεται ότι η αποικιακή μορφή αποτελεί συνάθροιση κυττάρων χωρίς λειτουργική διαφοροποίηση, ενώ στον πολυκύτταρο οργανισμό υπάρχει υψηλή αλληλεξάρτηση, συντονισμός και ενίοτε διαφοροποίηση μεταξύ κυττάρων, άσχετα με το αν αυτή η διαφοροποίηση έχει οδηγήσει σε εξειδικευμένους σχηματισμούς/αθροίσματα κυττάρων (όργανα/ιστούς) ή όχι (Μαυρίδου, 2012).

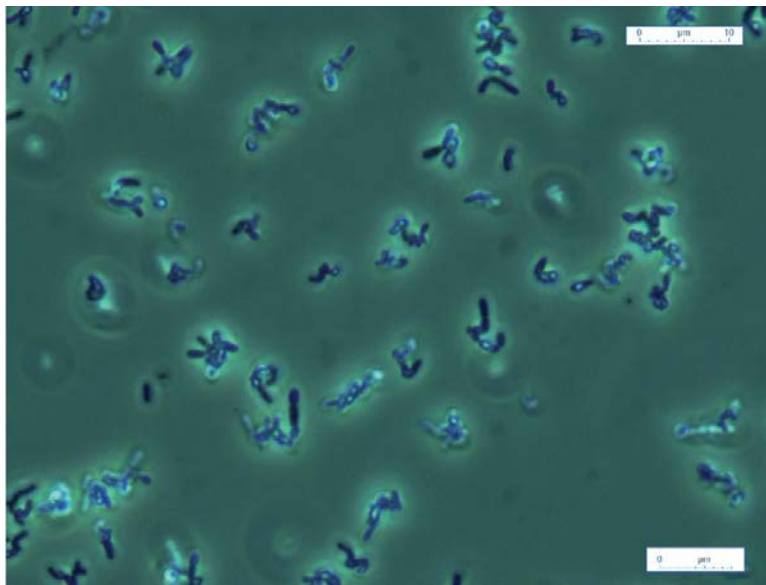
1.5.3. *Propionibacterium freudenreichii*

Το γένος *Propionibacterium* περιλαμβάνει προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, των οποίων τα κύτταρα έχουν ποικίλες μορφολογίες, όπως ραβδοειδή, διακλαδιζόμενα ή κοκκοειδή. Δεν έχουν μαστίγια και είναι θετικά σε καταλάση. Αναπτύσσονται σε ουδέτερο pH και σε θερμοκρασίες 25 – 45°C. Παράγουν ως προϊόντα ζύμωσης προπιονικό οξύ, οξικό οξύ και CO₂, μια διαδικασία γνωστή ως προπιονική ζύμωση. Απομονώνονται από γαλακτοκομικά προϊόντα, το ανθρώπινο δέρμα και άλλα περιβάλλοντα. Ένα είδος, το *Propionibacterium freudenreichii*, χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών Ελβετικού τύπου. Τα παραγόμενα προπιονικό και οξικά οξέα προσδίδουν το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση σε αυτά τα τυριά, ενώ το CO₂ ευθύνεται για τους χαρακτηριστικούς θόλους στη μάζα τους. Ωστόσο, όταν τα *Propionibacterium* αναπτύσσονται σε ζυμωμένα φυτικά προϊόντα, όπως οι πράσινες ελιές, μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση, καθώς μετατρέπουν το γαλακτικό οξύ σε προπιονικό οξύ μέσω δευτερογενών ζυμώσεων (Αγγελής, 2017).

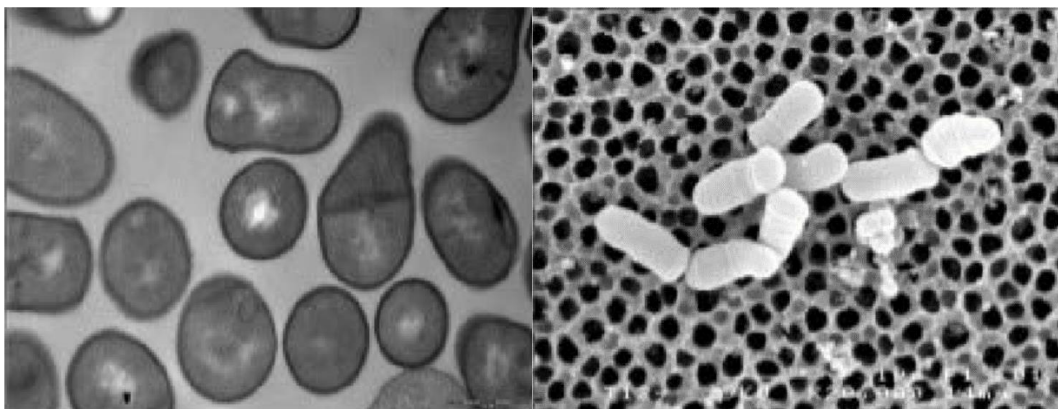
Το *Propionibacterium freudenreichii* χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια ως καλλιέργεια ωρίμανσης στην παραγωγή τυριών ελβετικού τύπου και αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο για τις ισχυρές προβιοτικές του ικανότητες. Αυτό το βακτήριο διαθέτει έναν ιδιαίτερο μεταβολισμό, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παραγωγή προπιονικού οξέος ως κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης (Konopelski & Mogilnicka, 2022). Έχει μέτριες

διατροφικές απαιτήσεις και μπορεί να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία πηγών άνθρακα. Η ανάλυση του γονιδιώματος του *P. freudenreichii* CIRM-BIA1T αποκάλυψε πολυάριθμα μεταβολικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου του κύκλου Wood-Werkman, ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και βιοσυνθετικών μονοπατιών για όλα τα αμινοξέα και πολλές βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης B12 (Emwas et al., 2022). Το *P. freudenreichii* παρουσιάζει χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τη μακροχρόνια επιβίωσή του, όπως η συσσώρευση ανόργανου πολυφωσφορικού άλατος ως ενεργειακού αποθέματος, ενώσεις αποθήκευσης άνθρακα (γλυκογόνο) και συμβατές διαλυτές ουσίες όπως η τρεαλόζη. Στην παραγωγή τυριού, το *P. freudenreichii* διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό ποικίλων αρωματικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων όχι μόνο του προπιονικού οξέος, αλλά και των ελεύθερων λιπαρών οξέων που απελευθερώνονται μέσω της λιπόλυσης των γλυκεριδίων του γάλακτος και των μεθυλο-βουτανοϊκών οξέων που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των αμινοξέων. Πολλές από τις ιδιότητες του *P. freudenreichii* που συμβάλλουν στην προσαρμοστικότητα, την ωρίμανση του τυριού, τη βιοσυντήρηση και τις προβιοτικές επιδράσεις του εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στέλεχος. Η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν αυτά τα χαρακτηριστικά έχει διευκολυνθεί από τη διαθεσιμότητα δεδομένων αλληλουχίας γονιδιώματος και μοριακών εργαλείων, τα οποία θα βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων στελεχών για συγκεκριμένες εφαρμογές. Τα προπιονιβακτήρια έχουν κερδίσει πρόσφατα την προσοχή για τις πιθανές αντιμυκητιασικές τους ιδιότητες, αν και υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για την ευρεία διαλογή αυτού του γένους. Μια μελέτη εξέτασε 197 πιθανά απομονωμένα προπιονικά βακτήρια από διάφορες γαλακτοκομικές και γεωργικές πηγές, εντοπίζοντας 13 στελέχη με υψηλή ανασταλτική δράση έναντι ζυμομυκήτων και μούχλας αλλοίωσης γιαουρτιού. Πρόκειται κυρίως για το *Propionibacterium jensenii*, ακολουθούμενο από το *P. thoenii* και το *P. acidipropionici*. Περαιτέρω έρευνα αξιολόγησε την αντιμυκητιασική δράση πέντε στελεχών τύπου προπιονιβακτηρίων γαλακτοκομικών προϊόντων έναντι οκτώ μυκήτων και ζυμών που σχετίζονται με τρόφιμα και ζωοτροφές, διαπιστώνοντας ότι το *P. thoenii* ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας. Αντίθετα, σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκαν αντιμυκητιασικές επιδράσεις από τους εξωκυτταρικούς μεταβολίτες δύο στελεχών *P. freudenreichii* σε υγρές καλλιέργειες, με την ισχυρότερη αναστολή να προέρχεται από καλλιέργειες που περιείχαν βιώσιμα

κύτταρα και όχι υπερκείμενα χωρίς κύτταρα. Συνολικά, οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν το αντιμυκητιασικό δυναμικό των προπιονιβακτηρίων, αν και απαιτείται ακόμη πιο ολοκληρωμένος έλεγχος για τον πλήρη χαρακτηρισμό αυτής της δραστηριότητας σε όλο το γένος (Schwenninger et. al., 2004).



Εικόνα 9: Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου που δείχνει τη μορφολογική όψη μιας καλλιέργειας *P. freudenreichii* CIRM-BIA129, με τυπικά συσσωματώματα που μοιάζουν με κινεζικούς χαρακτήρες (Rodvalho et al., 2021)



Εικόνες 10&11: Ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του *Propionibacterium freudenreichii* (Rabah et al., 2017)

1.5.4. Οξυγαλακτικά Βακτήρια (LAB)

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μια ποικίλη ομάδα μικροοργανισμών που συνήθως βρίσκονται σε φυτικά υλικά όπως το λάχανο, το καλαμπόκι, το κριθάρι και το σιλό, καθώς και στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Jurášková et al., 2022). Χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλιέργειες εκκίνησης στην παραγωγή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το ξινόγαλο, το γιαούρτι, το βουτυρόγαλα, το τυρί cottage, τα σκληρά τυριά (π.χ. Cheddar, Provolone, Romano και Edam) και τα μαλακά τυριά (π.χ. Brie και Camembert). Τα LAB διαδραματίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στην επεξεργασία κρεάτων, αλκοολούχων ποτών και λαχανικών, συμβάλλοντας στην παρασκευή λουκάνικων, αλλαντικών, κρασιών, μύρας, ενισχυμένων αλκοολούχων ποτών, τουρσιών και λάχανου.

Οι LAB χαρακτηρίζονται κυρίως από την ικανότητά τους να παράγουν διαφορετικά ισομερή γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της γλυκόζης (Senanayake et al., 2023). Με βάση τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης, οι LAB ταξινομούνται είτε ως ομοζυμωτές είτε ως ετεροζυμωτές (Sobanski et al., 2023). Οι ομοζυμωτές παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο προϊόν της ζύμωσης της γλυκόζης, ενώ οι ετεροζυμωτές παράγουν ποικιλία προϊόντων, όπως διοξείδιο του άνθρακα, οξικό οξύ και αιθανόλη. Οι ομοζυμωτές διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση και μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη πιο άμεσα σε γαλακτικό οξύ από ό,τι οι ετεροζυμωτές. Οι ετεροζυμωτές χρησιμοποιούν το εναλλακτικό μονοφωσφορικό μονοπάτι της πεντόζης, μετατρέποντας τις εξόζες σε πεντόζες και παράγοντας επιθυμητές αρωματικές και ενισχυτικές της γεύσης ουσίες όπως οι αλδεΐδες και το διακετύλιο.

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) περιλαμβάνουν διάφορα γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Lactococcus* (επίσης γνωστά ως γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι) (Jurášková et al., 2022). Αυτά τα βακτήρια μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, όπως ότι είναι θετικά κατά Gram, αερόβια έως προαιρετικά αναερόβια, ασπορογόνα ραβδία και κοκκία, και δεν διαθέτουν οξειδάση, καταλάση, βενζιδίνη, κυτοχρώματα και την ικανότητα να ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, να υδρολύουν ζελατίνη ή να χρησιμοποιούν γαλακτικό.

Οι γαλακτοβάκιλλοι ταξινομήθηκαν αρχικά από τους Orla και Jensen σε δύο ομάδες με βάση την ποσότητα γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη ζύμωση της γλυκόζης: Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά (Bastard et al., 2022). Διέκριναν επίσης τους *Lactobacilli* σε τρεις υποομάδες (*Thermobacteria*, *Streptobacteria* και *Betabacteria*) με βάση τη θερμοκρασία ανάπτυξης και τις βιοχημικές αντιδράσεις (Kim et al., 2022), αν και αυτές οι ταξινομήσεις έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό, τα ονόματα εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως.

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) μπορούν να καλλιεργηθούν χρησιμοποιώντας διάφορα μέσα, ανάλογα με τις ειδικές ανάγκες της διαδικασίας απομόνωσης ή συντήρησης (Chau et al., 2023). Η καλλιέργεια των LAB περιλαμβάνει συχνά τη χρήση ζωμών εμπλουτισμού και επιλεκτικών ή μη επιλεκτικών μέσων. Τα εκλεκτικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση ενός συγκεκριμένου γένους από ένα μείγμα μικροοργανισμών, ενώ τα μη εκλεκτικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατήρηση απομονωμένων ατόμων σε καλλιέργεια.

Μια συνήθης προσέγγιση για την εκλεκτική απομόνωση των LAB είναι η ρύθμιση του pH του μέσου. Πολλοί LAB είναι ανθεκτικοί στα οξέα και έχουν ένα βέλτιστο pH ανάπτυξης. Για παράδειγμα, ένα pH μικρότερο από 4,5 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των *Lactobacillus* και *Pediococcus* από τον *Leuconostoc*, καθώς ο τελευταίος απαιτεί pH 4,5 ή μεγαλύτερο για την ανάπτυξή του. Τόσο ο *Lactobacillus* όσο και ο *Pediococcus* μπορούν να αναπτυχθούν σε pH μικρότερο από 4,5.

Ο ζωμός ή το άγαρ MRS (de Man, Rogosa και Sharpe) έχει κερδίσει ευρεία αποδοχή ως ένα ευέλικτο εκλεκτικό μέσο για την καλλιέργεια διαφόρων ειδών LAB, λόγω της ικανότητάς του να υποστηρίζει την ανάπτυξη διαφορετικών γενών LAB (Kostov et al., 2022).

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή διαφόρων τροφίμων και στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Τα βακτήρια αυτά βρίσκονται φυσικά συνδεδεμένα με διάφορα φυτά, όπως το λάχανο (*Lactobacillus plantarum*), το καλαμπόκι (*Streptococcus lactis*), το σιλό αραβοσίτου (διάφορα LAB), το γάλα (*Lactobacillus casei*) και τα τυριά (*Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus lactis* για το τυρί Cheddar) (Wang et al., 2022). Οι LAB

βρίσκονται επίσης συνήθως σε κόκκινο κρέας (συνήθως άτυποι LAB) και σε καλοκαιρινά λουκάνικα και κρέατα σε συσκευασία κενού (*Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus sake*) (Zheng et al., 2020).

Οι LAB, όπως οι *Lactobacillus plantarum* και *L. casei*, ζυμώνουν τόσο τη λακτόζη όσο και τη μαλτόζη, αλλά διαφέρουν από εκείνους τους LAB που ζυμώνουν τη μαννιτόλη. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι οι LAB απελευθερώνουν παράγοντες που αναστέλλουν άλλους μικροοργανισμούς, επιτυγχάνοντας έτσι το επιθυμητό αποτέλεσμα της συντήρησης ορισμένων τροφίμων. Αυτοί οι παράγοντες, που ονομάζονται βακτηριοσίνες, αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, των ειδών *Salmonella*, της *Escherichia coli* και άλλων μικροοργανισμών. Αυτές οι βακτηριοσίνες μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν με ή χωρίς την παρουσία των LAB. Δύο είδη ικανά να απελευθερώνουν τέτοιους παράγοντες, ο *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* και ο ζυμομύκητας *Candida utilis*, εμφανίζουν συνεργιστική δράση όταν αναπτύσσονται μαζί σε ξινόγαλα.

Οι ομοζυμωτικές LAB μπορούν προσωρινά να ομαδοποιηθούν και να ταυτοποιηθούν ως εξής: αναπτύσσονται κατά κύριο λόγο σε θερμοκρασία 15°C και όχι 45°C, με λίγες εξαιρέσεις. Ο *Lactobacillus fermentum* είναι ικανός να αναπτυχθεί στους 45°C, ενώ ο *L. sake*, ο *L. curvatus* και ο *L. plantarum* είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από 2°C έως 8°C και θα πρέπει να θεωρούνται ψυχρόφιλοι, αν και αναπτύσσονται μόνο αργά σε αυτές τις θερμοκρασίες. Οι LAB ζυμώνουν σάκχαρα πεντόζης και παράγουν διοξείδιο του άνθρακα από την υδρόλυση γλυκονικών, αλλά επειδή είναι ομοζυμωτές, δεν παράγουν διοξείδιο του άνθρακα από τη ζύμωση της γλυκόζης (Carr et al., 2002).

1.5.5. Γένος *Lactobacillus*

Το γένος *Lactobacillus* είναι το μεγαλύτερο και σπουδαιότερο γένος της ομάδας των γαλακτικών βακτηρίων, αποτελώντας το μοναδικό μέλος της οικογένειας *Lactobacillaceae* (Kullar et al., 2023). Τα μέλη του είναι ραβδοειδή βακτήρια που απαντώνται κατά ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες, ενώ σπανιότερα μπορεί να είναι και κοκκοβάκιλοι. Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα, αρνητικά σε καταλάση και δεν διαθέτουν κυτοχρώματα. Απομονώνονται από την επιφάνεια φυτών,

γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, νερά κ.λπ. Αποτελούν επίσης μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπινου σώματος, όπως το στόμα και το πεπτικό σύστημα, προσφέροντας μερική προστασία από μολύνσεις. Τα ίδια συνήθως δεν είναι παθογόνα. Τα *Lactobacillus* μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες) προς γαλακτικό οξύ είτε μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhof (ομοζυμωτική ζύμωση) είτε μέσω της οδού των φωσφοροπεντοζών (ετεροζυμωτική ζύμωση) (Senanayake et al., 2023). Στην πρώτη περίπτωση, το σάκχαρο μετατρέπεται σε ποσοστό περίπου 90% σε γαλακτικό οξύ, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παράγονται ίσες ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και CO₂. Αναπτύσσονται σχετικά εύκολα σε μεσόφιλο και ελαφρώς όξινο περιβάλλον, σε pH 4,5-6,4. Οι γαλακτοβάκκοι έχουν μεγάλη σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων (Hassoun et al., 2022). Χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης, όπως ελιές, πίκλες και ενσιρωμένες ζωοτροφές, καθώς και ζωικής προέλευσης, όπως αλλαντικά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Επίσης, χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογική παραγωγή γαλακτικού οξέος. Μερικά είδη με βιομηχανικό ενδιαφέρον είναι τα ομοζυμωτικά *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus* και *L. delbrueckii* (χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτικού οξέος), τα ετεροζυμωτικά *L. buchneri* και *L. brevis*, καθώς και τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά *L. plantarum* και *L. casei*.

1.5.6. *Lactobacillus rhamnosus*

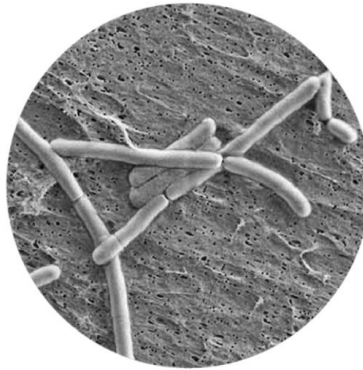
Ο *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) είναι ένα προβιοτικό στέλεχος που έχει μελετηθεί εκτενώς για τα πιθανά οφέλη του στην υγεία τις τελευταίες τρεις δεκαετίες.

Ο LGG παρουσιάζει διάφορους μηχανισμούς δράσης που συμβάλλουν στις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία του εντέρου. Μπορεί να σχηματίσει ένα προστατευτικό βιοφίλμ που θωρακίζει τον εντερικό βλεννογόνο και να παράγει διαλυτούς παράγοντες που ενισχύουν την επιβίωση των κρυπτών, μειώνουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και διατηρούν την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού.

Ο *Lactobacillus rhamnosus* GG είναι ένα καλά μελετημένο προβιοτικό στέλεχος με ευρύ φάσμα οφελών για την υγεία. Οι μοναδικές του ιδιότητες και οι μηχανισμοί δράσης του

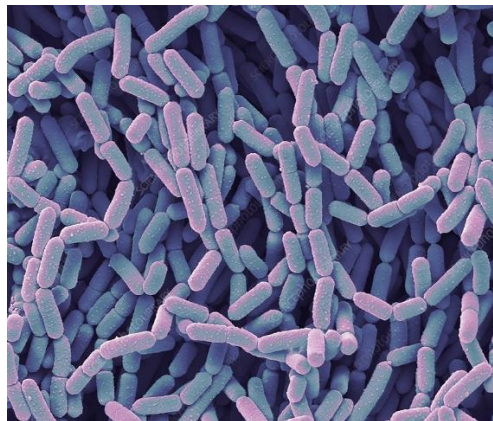
τον καθιστούν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές (Capurso et al., 2019).

Ο *Lactobacillus rhamnosus* είναι ένας τύπος οξυγαλακτικού βακτηρίου που ανήκει στην ομάδα των ετεροζυμωτικών. Έχει σχήμα που μοιάζει με ράβδο και δεν διαθέτει την ικανότητα να κινείται μόνο του. Τα περισσότερα στελέχη του *L. rhamnosus* μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 10°C, ενώ ορισμένα μπορούν να ανεχθούν θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο 15°C και τόσο υψηλές όσο 45°C. Αυτό το βακτήριο παράγει L-γαλακτικό οξύ ως το κύριο μεταβολικό του προϊόν και μπορεί να ζυμώσει ένα ευρύ φάσμα υδατανθράκων, όπως αμυγδαλίνη, αρβουτίνη, σελοβιόζη, D-φρουκτόζη κ.α.



Εικόνα 12: *Lactobacillus rhamnosus* GG σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

<https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/lactobacillus/lactobacillus-rhamnosus/lactobacillus-rhamnosus-lgg>



Εικόνα 13: Βακτήρια *Lactobacillus rhamnosus* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

<https://www.sciencephoto.com/media/886814/view/lactobacillus-rhamnosus-bacteria-sem>

1.5.7. *Lactobacillus plantarum*

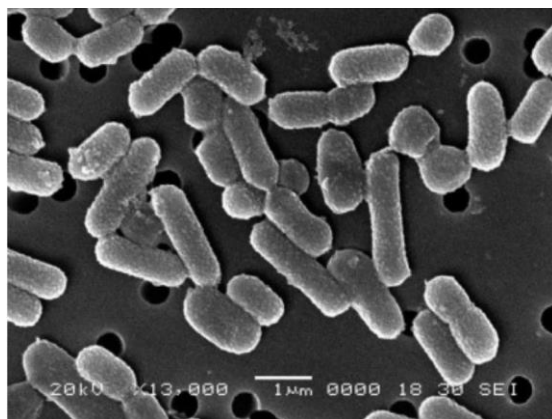
Ο *Lactobacillus plantarum*, είναι ένα βακτήριο γαλακτικού οξέος που έχει συγκεντρώσει σημαντική προσοχή για τα πιθανά οφέλη του για την υγεία (Costa et al., 2023). Αυτός ο ευπροσάρμοστος μικροοργανισμός απαντάται σε ένα ευρύ φάσμα οικολογικών θέσεων, αναδεικνύοντας την αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα και γονιδιωματική ευελιξία του.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του *L. plantarum* είναι η ικανότητά του να παράγει ποικίλες και ισχυρές βακτηριοσίνες, οι οποίες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογές ως συντηρητικά τροφίμων ή συμπληρωματικοί παράγοντες των αντιβιοτικών (Sharma et al., 2023).

Συλλογικά, τα χαρακτηριστικά του *L. plantarum*, συμπεριλαμβανομένων των προβιοτικών επιδράσεων στην υγεία, της προσαρμοστικότητας και της παραγωγής βακτηριοσινών, τον καθιστούν πολύτιμο για την ακαδημαϊκή έρευνα και έναν πολλά υποσχόμενο βιολογικό παράγοντα με διάφορες πρακτικές εφαρμογές.

Αρκετά στελέχη του *Lactobacillus plantarum* είναι γνωστό ότι παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου, διακετύλιο και αντιμικροβιακά πεπτίδια που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Η επιλογή ανταγωνιστικών στελεχών έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της πιθανής εφαρμογής τους στη συντήρηση τροφίμων, με στόχο την παράταση της διάρκειας ζωής και τη μείωση ή ακόμη και την αντικατάσταση των χημικών πρόσθετων (Yang et al., 2023) .

Οι βακτηριοσίνες είναι ριβοσωμικά συντιθέμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια που παράγονται τόσο από θετικά όσο και από αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Το αντιβιοτικό νισίνη παραμένει η γνωστή και εμπορικά διαθέσιμη βακτηριοσίνη, αν και πολλές βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες, προσφέροντας δυνατότητες για εφαρμογές στη συντήρηση τροφίμων.



Εικόνα 14: Μικρομορφολογική εικόνα του στελέχους *Lactobacillus plantarum* (Arasu et al., 2015)



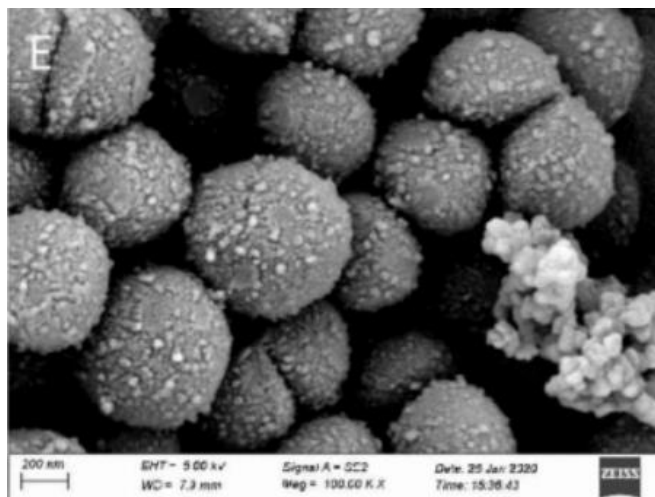
Εικόνα 15: *Lactobacillus plantarum* στο μικροσκόπιο (Abdulgawad, 2016).

Στελέχη *L. plantarum* που παράγουν βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές, όπως κρέας, ψάρια, φρούτα, λαχανικά και γάλα. Αυτές οι βακτηριοσίνες χαρακτηρίζονται συνήθως ως φυταρικές. Έχουν αναφερθεί στελέχη *L. plantarum* που παράγουν περισσότερες από μία βακτηριοσίνες. Οι φυταρικές έχουν αποδειχθεί δραστικές έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων και σπάνια έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η χρήση γαλακτικών βακτηρίων (LAB) και/ή των βακτηριοσινών τους για τον έλεγχο των μικροοργανισμών που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων και των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση, έχει προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από τα LAB εμπλέκονται

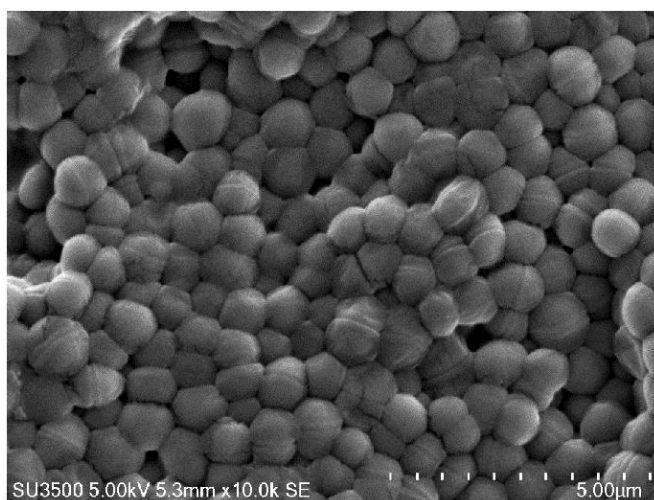
στη συντήρηση διαφόρων τροφίμων και η χρήση τους ως βιοσυντηρητικών παραγόντων μπορεί να μειώσει την ανάγκη για χημικά συντηρητικά και έντονες θερμικές επεξεργασίες, με αποτέλεσμα ελάχιστα επεξεργασμένα και φυσικά συντηρημένα τρόφιμα. Μελέτες έχουν δείξει τις δυνατότητες των στελεχών *L. plantarum* ή/και των αντιμικροβιακών ενώσεων τους στην πρόληψη της αλλοίωσης των τροφίμων και των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Εν κατακλείδι, ο *L. plantarum* είναι ένας εξαιρετικά ευπροσάρμοστος μικροοργανισμός που προσφέρει ποικίλες εφαρμογές, μεταξύ των οποίων η χρήση του ως προβιοτικό (Izuddin et al., 2019).

1.5.8. *Pediococcus acidilactici*

Ο *Pediococcus* είναι ένα γένος Gram-θετικών, μη κινητικών γαλακτικών βακτηρίων που στερούνται κυτοχρωμάτων και είναι αρνητικοί ως προς την καταλάση. Οι πεδιόκοκοι απαιτούν σύνθετες ενώσεις αζώτου και δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν άλατα αμμωνίας ως μοναδική πηγή αζώτου ή να ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, σε αντίθεση με τα είδη *Bacillus*. Είναι αερόβιοι έως μικροαερόφιλοι και ζυμώνουν τη γλυκόζη μέσω της οδού Embden-Meyerhof, παράγοντας είτε DL- είτε L-γαλακτικό οξύ χωρίς διοξείδιο του άνθρακα. Τα είδη του γένους αυτού παρουσιάζουν διαφορετικές απαιτήσεις σε οξυγόνο, με τα *P. pentosaceus* και *P. acidilactici* να είναι αερόβια, το *P. dextrinicus* να είναι προαιρετικά αναερόβιο και άλλα να είναι μικροαερόφιλα (Frank et al, 2002).



Εικόνα 16: Ανάπτυξη *P. acidilactici* ανεξάρτητα χωρίς καμία πρόκληση παθογόνου (Emran et al., 2022)



Εικόνα 17: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης της ανάπτυξης του *Pediococcus acidilactici* MK20 σε μέσο MRSB, 37°C, 18 ώρες (μεγέθυνση 10.000x) (Herdian et al., 2018)

Ο *Pediococcus acidilactici* είναι αξιοσημείωτος για την ικανότητά του να ευδοκιμεί σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένου ενός ευρέος φάσματος επιπέδων pH, θερμοκρασιών και ωσμωτικών πιέσεων. Ο *Pediococcus acidilactici* είναι ένα ομοζυμωτικό βακτήριο, το οποίο παράγει κυρίως γαλακτικό οξύ μέσω της ζύμωσης. Είναι προαιρετικά αναερόβιος, που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου, και εμφανίζει έναν βαθμό οξύφιλου, ευδοκιμώντας σε χαμηλά

επίπεδα pH. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για αυτό το βακτήριο είναι σε άγαρ de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) σε pH περίπου 6,2, με θερμοκρασίες επώασης που κυμαίνονται από 37 έως 45°C, ενώ μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες έως και 65°C. Ο *Pediococcus acidilactici* χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το γιαούρτι και το τυρί, όπου συμβάλλει στην οξίνιση και την ανάπτυξη της γεύσης.

Το βακτήριο παράγει βακτηριοσίνες, συγκεκριμένα πεδιοσίνες, οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων όπως η *Shigella*, η *Salmonella* και η *Escherichia coli*. Αυτό το χαρακτηριστικό το καθιστά υποψήφιο για χρήση στη συντήρηση και την ασφάλεια των τροφίμων. Ο *Pediococcus acidilactici* έχει αναγνωριστεί για την ασφάλειά του σε διάφορες εφαρμογές, μεταξύ άλλων ως πρόσθετο ζωοτροφών για την κτηνοτροφία και την υδατοκαλλιέργεια. Η χρήση του υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι δεν υπάρχουν τοξικές επιδράσεις, γεγονός που τον καθιστά μια πολλά υποσχόμενη επιλογή για την ενίσχυση της υγείας των ζώων και της ασφάλειας των τροφίμων (Franz et al., 2014).

1.6. Ζύμες

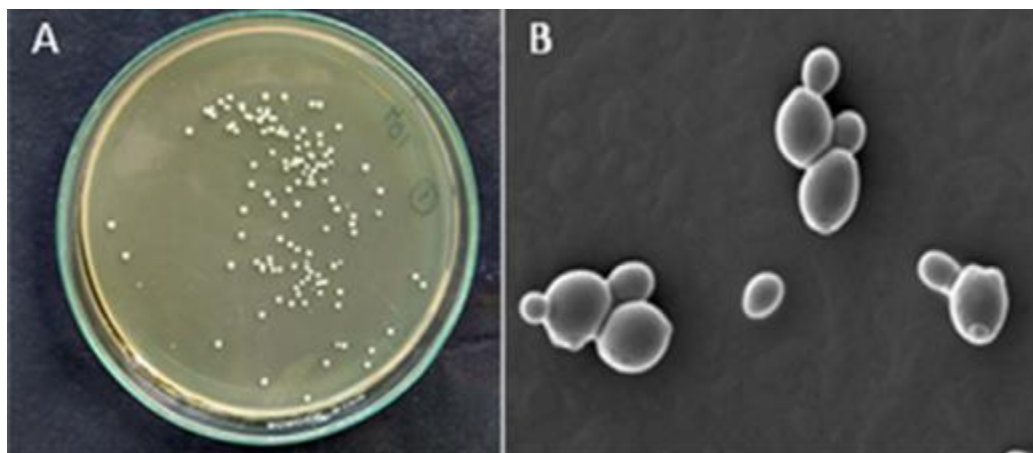
1.6.1. Γενικές Πληροφορίες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ευδοκιμούν σε διάφορα σημεία, όπως το νερό, το έδαφος, τον αέρα και τις επιφάνειες των φυτών και των φρούτων. Ένας από τους πιο κοινούς βιότοπους για τις ζύμες είναι τα ώριμα φρούτα, όπου διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αποσύνθεση τους και συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Σε αυτό το φυσικό περιβάλλον, οι ζυμομύκητες μπορούν να πραγματοποιούν αποτελεσματικά τις μεταβολικές και ζυμωτικές τους δραστηριότητες, επειδή έχουν πρόσβαση στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και υποστρώματα (Maicas, 2020). Όσον αφορά τη διατροφή, οι ζύμες δεν είναι τόσο απαιτητικές σε σύγκριση με άλλους μικροοργανισμούς, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Συγκεκριμένα οι ζύμες προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν χρειάζονται την παρουσία ορισμένων ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των αμινοξέων, των βιταμινών, των μετάλλων και του οξυγόνου. Αυτά τα βασικά θρεπτικά συστατικά παρέχουν τους απαραίτητους πόρους για να ευδοκιμήσουν οι

ζύμες στους διάφορους βιότοπους (Walker & Stewart, 2016). Ακόμα οι ζύμες παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό μορφολογικής απόκλισης, με τα πιο συνηθισμένα σχήματα να είναι στρογγυλά, ελλειψοειδή και ωοειδή. Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, η παραγωγή και η ανοχή των ζυμομυκήτων στην αιθανόλη, τα οργανικά οξέα και το διοξείδιο του θείου (SO₂) είναι σημαντικά για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών ζυμομυκήτων. Επίσης, ο κύριος τρόπος αναπαραγωγής των ζυμομυκήτων είναι η εκβλάστηση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός νέου, γενετικά πανομοιότυπου κυττάρου και συνεπώς αυτός είναι ο συνηθέστερος τύπος αγενής αναπαραγωγής στους ζυμομύκητες. Τέλος, οι ζύμες έχουν την ικανότητα να ευδοκιμούν σε όξινα περιβάλλοντα, με τιμές pH να κυμαίνονται γύρω στο 3,5 ή και χαμηλότερα (Maicas, 2020).

1.6.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae*, κοινώς γνωστός ως μαγιά αρτοποιίας ή ζύμη ζυθοποιίας, είναι ο πιο εκτενώς μελετημένος ευκαρυώτης και ένα πολύτιμο εργαλείο για τη βασική έρευνα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αυτό οφείλεται στην απλότητά του ως μονοκύτταρου οργανισμού, η οποία καθιστά ευκολότερη τη μελέτη και τον χειρισμό του. Τα μοναδικά βιολογικά χαρακτηριστικά του, όπως η ικανότητά του να ζυμώνει τα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα και η ανοχή του στην υψηλή οσμωτικότητα και το χαμηλό pH, το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και παραγωγής βιοκαυσίμων (Parapouli et al., 2020). Τα περισσότερα στελέχη του *S. cerevisiae* αναπτύσσονται σε υποστρώματα που περιέχουν γλυκόζη, άλατα αμμωνίου, ανόργανα ιόντα και μερικούς αυξητικούς παράγοντες. Ακόμα ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται στην παραγωγή ζυμωμένων ποτών και έχει συνήθως ελλειψοειδές σχήμα με διάμετρο 5-10 μm. Ως μονοκύτταροι μύκητες, τα κύτταρα του *S. cerevisiae* μοιράζονται πολλά υπερδομικά χαρακτηριστικά με τα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, μύκητες, όπως: κυτταρικό τοίχωμα, πυρήνας, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi, κενोटόπια, μικροσωμάτια και κυστίδια (Walker & Stewart, 2016).



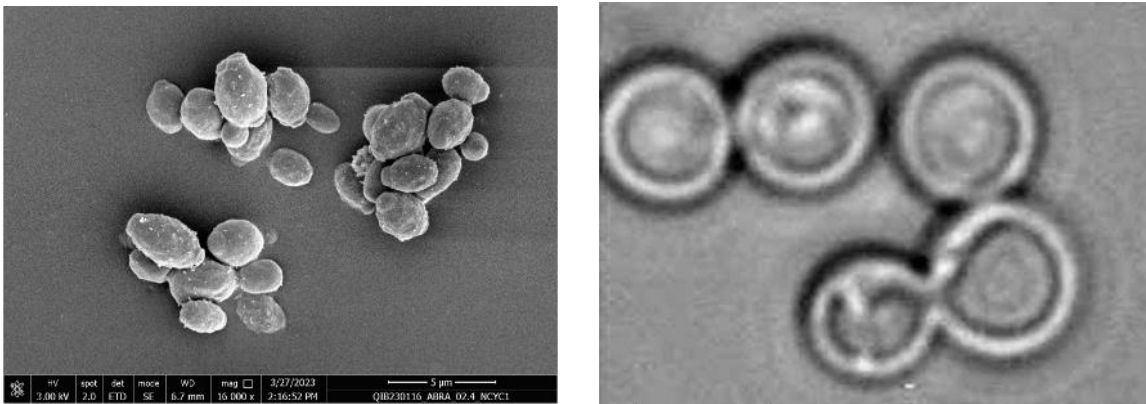
Εικόνα 18: Α) Μορφολογία αποικίας του *S. cerevisiae* και Β) ηλεκτρονικό μικρογράφημα σάρωσης του *S. cerevisiae* (Bhukya et al., 2019).

1.6.3. *Debaryomyces hansenii*

Ο *Debaryomyces hansenii*, επίσης γνωστός ως *Candida famata*, είναι ένα είδος ζύμης που ανήκει στην οικογένεια *Saccharomycetaceae*. Είναι αξιοσημείωτο για την οικολογική του ευελιξία και τις πιθανές εφαρμογές του στη βιοτεχνολογία. Ο *D. hansenii* συναντάται συνήθως σε διάφορα περιβάλλοντα, ιδίως σε τρόφιμα όπως το τυρί και τα ζυμωμένα κρέατα. Μπορεί να ευδοκιμήσει σε ακραίες συνθήκες, όντας ωσμοάντοχος, αλοάντοχος και ξηροφιλικός. Αυτή η ζύμη είναι διαδεδομένη στην παραγωγή μαλακών τυριών και συμβάλλει σημαντικά στη ζύμωση των μυρών που ωριμάζουν σε βαρέλια (Desnos-Ollivier et. al., 2008).

Το *D. hansenii* έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της βιοτεχνολογίας λόγω της ικανότητάς του να παράγει διάφορους μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένης της D-αραβιτιτόλης, της ριβοφλαβίνης και της ξυλιτόλης. Έχει χρησιμοποιηθεί στην αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος για την παραγωγή 2-μεθοξυ-4-βινυλφαινόλης, αναδεικνύοντας τις δυνατότητές του για διαδικασίες βιομετασχηματισμού (Navarrete et al., 2022). Αυτή η ζύμη μπορεί να αναπτυχθεί σε μέσα με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (έως και 25% NaCl) και μπορεί να ανεχθεί ένα εύρος pH από 3 έως 10. Η ικανότητά της να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες την καθιστά υποψήφια για περαιτέρω έρευνα στη μικροβιακή οικολογία και για

πιθανές εφαρμογές στην τεχνολογία και τη συντήρηση τροφίμων. Ο *D. hansenii* έχει ένα μοναδικό γενετικό προφίλ, που περιλαμβάνει επτά χρωμοσώματα και έναν εναλλακτικό γενετικό κώδικα, όπου το κωδικόνιο CUG κωδικοποιεί σερίνη αντί για λευκίνη. Αυτή η γενετική προσαρμοστικότητα μπορεί να συμβάλλει στην ανθεκτικότητά του σε διάφορα περιβάλλοντα (Desnos-Ollivier et al, 2008). Συνοπτικά, ο *Debaryomyces hansenii* είναι ένας ευέλικτος ζυμομύκητας με σημαντική οικολογική και βιοτεχνολογική σημασία, ιδίως στη βιομηχανία τροφίμων και πιθανές εφαρμογές στη διαχείριση της υγείας και των ασθενειών.



Εικόνα 19 & 20: *Debaryomyces hansenii* και *Debaryomyces hansenii* H158 asci με ένα ασκοσπόριο μετά από 6 εβδομάδες σε άγαρ YEPD στους 30°C. Μεγέθυνση $\times 1125$. Bar = 2,5 µm (Breuer & Harms, 2006)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Στόχοι και οργάνωση του πειράματος

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διατριβής είναι η μελέτη προστατευτικών καλλιεργειών βακτηρίων, γαλακτικών βακτηρίων (LAB), ζυμών και της ανασταλτικής δράσης που μπορεί να έχουν στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus flavus* και στην αφλατοξίνη που παράγει, με in vitro δοκιμές.

Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν

Ο μικροοργανισμός στόχος που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια του πειράματος, είναι ο μύκητας *Aspergillus flavus*.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως προστατευτικές καλλιέργειες είναι τα γαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* και *Pediococcus acidilactici*, το βακτήριο *Propionibacterium freudenreichii* και οι ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* και *Debaryomyces hansenii*.

2.1.1. Υλικά και μέθοδοι

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μικροβιολογικές αναλύσεις του πειράματος, είναι τα εξής:

- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Potato Dextrose Broth (PDB)
- De Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS agar)
- De Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS broth)

- Propionibacter Isolation Agar Base (Agar)
- Propionibacter Isolation Agar Base (Broth)

Όργανα

Στο πειραματικό πλαίσιο, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα όργανα και σκεύη για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε μια πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου για τη λήψη δειγμάτων, tips για τη μέτρηση μικρών όγκων υγρών και σπάτουλα, ποτήρια ζέσεως και σωληνάκια για τη λήψη και επεξεργασία των δειγμάτων. Επιπλέον, για τη θέρμανση και την ψύξη των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ένα υδατόλουτρο, θερμαντικές πλάκες, κλίβανοι επώασης και ένα εργαστηριακό ψυγείο. Για τη διαδικασία της επίστρωσης των θρεπτικών υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Petri, μεταλλική ράβδος επίστρωσης, κρίκος εμβολιασμού και γυάλινες πιπέτες paster. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν μπουκάλια των 500ml και των 250ml για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ένα vortex, ένα μαγνητάκι ανάδευσης και μια φυγόκεντρος. Ακόμα, για τη ζύγιση και τη μέτρηση της διαμέτρου των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ένας ηλεκτρονικός ζυγός και ένα παχύμετρο. Για την αποστείρωση των όλων των υλικών και των οργάνων, έγινε χρήση κλίβανου αποστείρωσης. Τέλος, για την πραγματοποίηση όλων των πειραματικών διαδικασιών, χρησιμοποιήθηκε θάλαμος νηματικής ροής και λύχνος Bunsen, ώστε να υπάρχουνε ασηπτικές συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος

Μέθοδοι

In vitro δοκιμές ανάπτυξης του μύκητα *A. Flavus*

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια όλων των προστατευτικών μικροοργανισμών και του μύκητα *A. flavus* στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά υποστρώματα, μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10ml υπόστρωμα. Έπειτα, οι μικροοργανισμοί επώαστηκαν σε κλίβανους στις κατάλληλες θερμοκρασίες και αφότου αναπτύχθηκαν, ο κάθε μικροοργανισμός εκτός του *A. flavus*, επιστρώθηκε σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ώστε να ληφθεί μια μεμονωμένη αποικία από τον καθένα. Η κάθε αποικία, εμβολιάστηκε στο αντίστοιχο υγρό

θρεπτικό υπόστρωμα έως ότου αναπτυχθεί. Με τη δημιουργία ιζήματος στα σωληνάκια, σηματοδοτήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και ακολούθησαν τα επόμενα βήματα του πειράματος. Το πείραμα ξεκίνησε με φυγοκέντριση της υγρής προστατευτικής καλλιέργειας ώστε να γίνει λήψη του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας. Έπειτα έγινε διήθηση του υπερκείμενου υγρού με φίλτρα 0,45μm ώστε να ληφθεί στείρο διήθημα. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε εκ νέου διάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 10ml αποστειρωμένο MRD και παραλαβή του εναιωρήματος των ζωντανών κυττάρων. Το μισό μέρος από το τελευταίο εναιώρημα (δηλαδή περίπου 5ml) παστεριώθηκε στους 75°C x 30min σε υδατόλουτρο, ώστε να παραληφθεί και το εναιώρημα των νεκρών κυττάρων της καλλιέργειας.

Μετά το πέρας όλων των παραπάνω διαδικασιών, ακολούθησαν οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *A. flavus*, οι οποίες ήταν οι εξής:

- Μέτρηση ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα (well diffusion assay)
- Μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση (cross streak)
- Μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus*

2.1.2. Εκτέλεση πειραματικής διαδικασίας

- i. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη των προστατευτικών καλλιεργειών και του μικροοργανισμού στόχου (*A. flavus*).

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος παρασκευάστηκαν όλα τα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που αναφέρονται παραπάνω. Για τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν μπουκάλια των 250ml ή των 500ml και σωλήνες (των 10ml) οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση μόνο των υποστρωμάτων σε υγρή μορφή. Για την παρασκευή των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, δημιουργήθηκε πρώτα το broth από το κάθε υπόστρωμα και στη συνέχεια προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα agar για την παρασκευή της ζητούμενης ποσότητας στερεού θρεπτικού υποστρώματος για το

καθένα. Αρχικά προστέθηκαν στα μπουκάλια τα μαγνητάκια ανάδευσης, έπειτα τα g σκόνης των υποστρωμάτων σε κάθε μπουκάλι και τα ml απιονισμένου νερού που αντιστοιχούν στο καθένα. Στη συνέχεια τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν πάνω στις θερμαντικές πλάκες, όπου τα broth αναδεύθηκαν χωρίς θέρμανση μόνο με περιστροφή και για τα υποστρώματα με agar χρησιμοποιήθηκε ανάδευση και θέρμανση. Η διαδικασία αυτή διήρκεσε μέχρι τα υποστρώματα να γίνουν διαυγή. Τέλος, όταν όλα τα υποστρώματα ήταν έτοιμα, τα broth μεταγγίστηκαν στα σωληνάκια και μαζί με τα μπουκάλια με το agar τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για αποστείρωση.



Εικόνες 21,22&23: (21) Δοκιμαστικοί σωλήνες με Propionibacter Isolation Agar Base (Broth), PDB και MRS, (22) Ανάδευση και θέρμανση MRS agar, (23) Ανάδευση και θέρμανση PDA agar

ii. Καλλιέργεια των προστατευτικών μικροοργανισμών και του μύκητα στόχου

Κατά την έναρξη της διαδικασίας αυτής, λήφθηκε ορισμένη ποσότητα από έτοιμες λυοφιλιωμένες καλλιέργειες των προστατευτικών μικροοργανισμών και προστέθηκαν στα αντίστοιχα σωληνάκια με το κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε κλίβανους επώασης και αφέθηκαν μέχρι τον σχηματισμό ιζήματος στο κάθε ένα. Στη συνέχεια, με τη χρήση κρίκου εμβολιασμού, λήφθηκε ποσότητα από το ίζημα του καθενός και με τη μέθοδο streaking εμβολιάστηκε σε τρυβλίο με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία που προέκυψαν, αφέθηκαν για επώαση στους

αντίστοιχους κλίβανους μέχρι τον σχηματισμό αποικιών. Όταν αναπτύχθηκαν αποικίες από τον κάθε προστατευτικό μικροοργανισμό, λήφθηκαν μεμονωμένες αποικίες με κρίκο εμβολιασμού και εμβολιάστηκαν σε σωληνάκια με το αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Έπειτα τα σωληνάκια αυτά αφέθηκαν εκ νέου για να επωαστούν μέχρι τον σχηματισμό ιζήματος. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι προστατευτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα, τα θρεπτικά υποστρώματα που αντιστοιχούν στον κάθε ένα καθώς και οι θερμοκρασίες και οι μέρες επώασής τους.

Πίνακας 7: Οι προστατευτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα, σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και μέρες επώασης.

Προστατευτικός μικροοργανισμός	Θρεπτικό υπόστρωμα	Θερμοκρασίες επώασης x Μέρες επώασης (d)
<i>L. rhamnosus</i>	MRS broth	37°C x 3d
	MRS agar	25°C x 6d
<i>L. plantarum</i>	MRS broth	37°C x 3d
	MRS agar	25°C x 6d
<i>P. acidilactici</i>	MRS broth	37°C x 3d
	MRS agar	25°C x 6d
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Propionibacter Isolation Agar Base (Broth)	30-32°C x 3d
	Propionibacter Isolation Agar Base (Agar)	25°C x 6d
<i>D. hansenii</i>	PDB	25-30°C x 3d
	PDA	25°C x 6d
<i>S. cerevisiae άρτον</i>	PDB	25-30°C x 3d

	PDA	25°C x 6d
<i>S. cerevisiae</i> οίνου	PDB	25-30°C x 3d
	PDA	25°C x 6d
<i>A. flavus</i>	PDB	30°C x 7d
	PDA	25°C x 5-10d



Εικόνα 24: Επώαση προστατευτικών μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

iii. Φυγοκέντρωση υγρής προστατευτικής καλλιέργειας

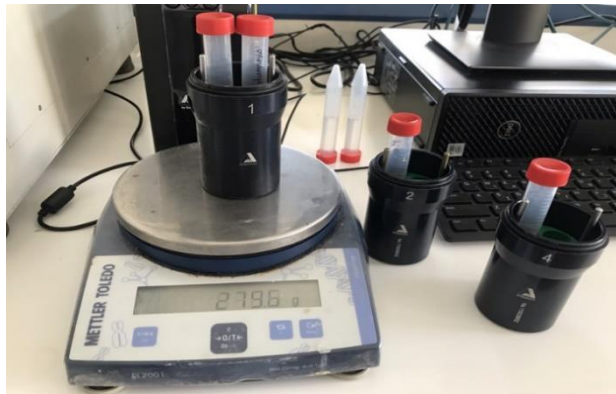
Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση όλων των προστατευτικών μικροοργανισμών και του μικροοργανισμού στόχου, συνεχίστηκε η πειραματική πορεία από το κομμάτι της φυγοκέντρωσης.

Συγκεκριμένα, το σωληνάκι που περιείχε τον κάθε προστατευτικό μικροοργανισμό, αναδεύτηκε με vortex ώστε ομογενοποιηθεί και το περιεχόμενο του καθενός μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάκια Falcon. Τα σωληνάκια που προέκυψαν τελικά, τοποθετήθηκαν κατάλληλα στη φυγόκεντρο και αφού ρυθμίστηκαν οι στροφές και ο χρόνος της φυγοκέντρωσης στις 4.500rpm για 20min, ξεκίνησε η διαδικασία.

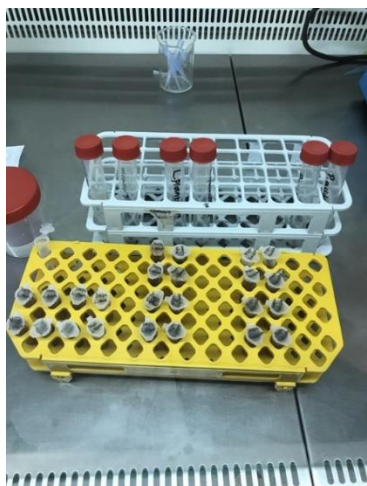
Από τις δύο φάσεις που προέκυψαν από όλα τα φυγοκεντρημένα Falcon (υπερκείμενο και ίζημα), διηθήθηκε με σύριγγα που περιέχει φίλτρο των 0,45μm το υπερκείμενο, ώστε να ληφθεί το στείρο διήθημα της καλλιέργειας και τοποθετήθηκε σε σωληνάκια erpendorf.

Το ίζημα που παρέμεινε στο Falcon του κάθε προστατευτικού μικροοργανισμού, αραιώθηκε εκ νέου με αποστειρωμένο MRD, οπότε προέκυψαν 10ml εναιωρήματος ζωντανών κυττάρων της καλλιέργειας. Το MRD, είναι ένα διάλυμα αλάτων η χρήση του οποίου βοηθάει στο να επιτυγχάνεται η ίδια οσμωτική πίεση στο εσωτερικό και εξωτερικό των κυττάρων λόγω των αλάτων που περιέχει και να μην προκαλείται στρες στα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως συμβαίνει όταν ο διαλύτης είναι το αποστειρωμένο νερό. Τα 5ml από αυτό το εναιώρημα, προστέθηκαν σε σωληνάκια erpendorf τα οποία στη συνέχεια παστεριώθηκαν στους 75°C για 30min σε υδατόλουτρο, ώστε να ληφθεί και το εναιώρημα των νεκρών κυττάρων της καλλιέργειας. Τα υπόλοιπα 5ml του εναιωρήματος των ζωντανών κυττάρων, προστέθηκαν κι εκείνα σε σωληνάκια erpendorf.

Όλα τα σωληνάκια erpendorf που προέκυψαν με το στείρο διήθημα, τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν μετέπειτα.



Εικόνα 25 & 26: Αποστειρωμένοι σωλήνες Falcon για φυγοκέντριση και Ζύγιση σωλήνων Falcon μαζί με εξάρτημα της φυγόκεντρου πριν την έναρξη της φυγοκέντρισης.



Εικόνες 27 & 28: Προστατευτικά αντιμικροβιακά διαλύματα ζωντανών κυττάρων, νεκρών κυττάρων και υπερκείμενου διαλύματος και εμβολιασμός τους σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα

iv. Εφαρμογή μεθόδων

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος έγινε εφαρμογή των μεθόδων, εφόσον τα αποθέματα των μικροοργανισμών ήταν έτοιμα. Κατά την έναρξη της διαδικασίας αυτής, όταν όλα τα υποστρώματα ήταν έτοιμα για χρήση, στρώθηκαν τα τρυβλία. Πιο συγκεκριμένα, στρώθηκαν 9 τρυβλία με υπόστρωμα για την κάθε μέθοδο και 4 τρυβλία τα οποία χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Στο ένα από τα 4 τρυβλία μάρτυρες, εμβολιάστηκε σε βοθρίο στο κέντρο του τρυβλίου ο μύκητας στόχος *Aspergillus flavus* και στα υπόλοιπα 3 τρυβλία πραγματοποιήθηκε επίστρωση των προστατευτικών καλλιέργειών (υπερκείμενο, ζωντανά κύτταρα, νεκρά κύτταρα) με τη μέθοδο streaking. Τα υπόλοιπα 9 τρυβλία χωρίστηκαν σε τριάδες και επιστρώθηκαν με τις προστατευτικές καλλιέργειες με τις τρεις διαφορετικές μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω, ώστε να αντιστοιχούν τρία τρυβλία στο κάθε ένα από τα τρία αντιμικροβιακά διαλύματα που αντιστοιχούν στον κάθε προστατευτικό μικροοργανισμό.

Μέτρηση ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα (well diffusion assay)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, όταν στερεοποιήθηκε το υπόστρωμα στα τρυβλία, πραγματοποιήθηκε επίστρωση του μύκητα *A. flavus* (100μL) με τη χρήση μεταλλικής ράβδου επίστρωσης. Για τη χρήση του μύκητα στη διαδικασία της επίστρωσης, χρειάστηκε

να διαλυθεί πρώτα ένα κομμάτι της καλλιέργειάς του σε σωληνάκι με PDB. Έπειτα, όταν στέγνωσε και ο μύκητας, ανοίχθηκαν τρεις τρύπες (βοθρία ή πηγαδάκια) στο κάθε τρυβλίο όπου προστέθηκαν σε κάθε μία από αυτές 25μL από το ίδιο αντιμικροβιακό διάλυμα.

Τα παραπάνω τρυβλία αφέθηκαν για να επωαστούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 5 μέρες.



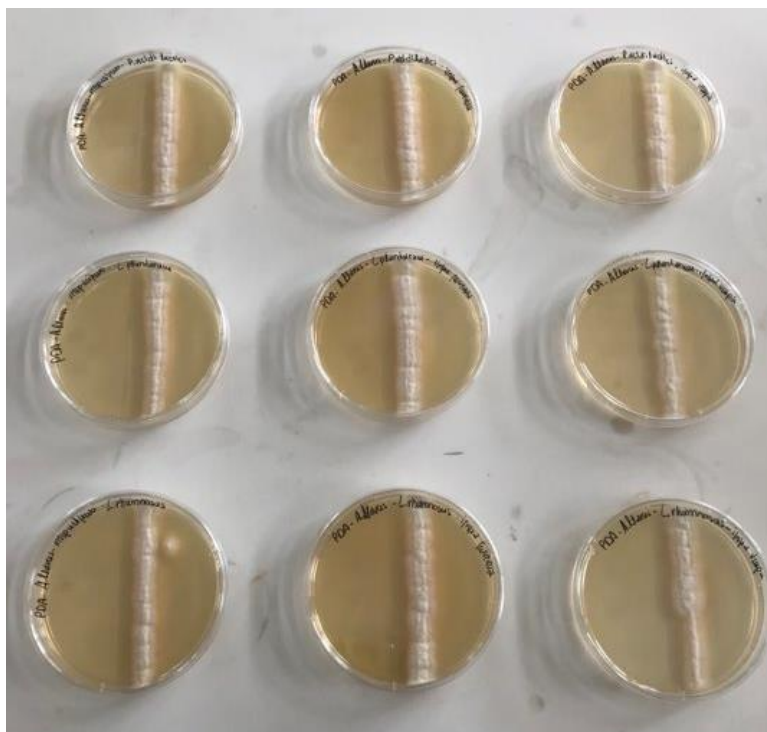
Εικόνα 29: Τρίτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με αντιμικροβιακά διαλύματα του *L. rhamnosus* με τη μέθοδο μέτρησης ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα



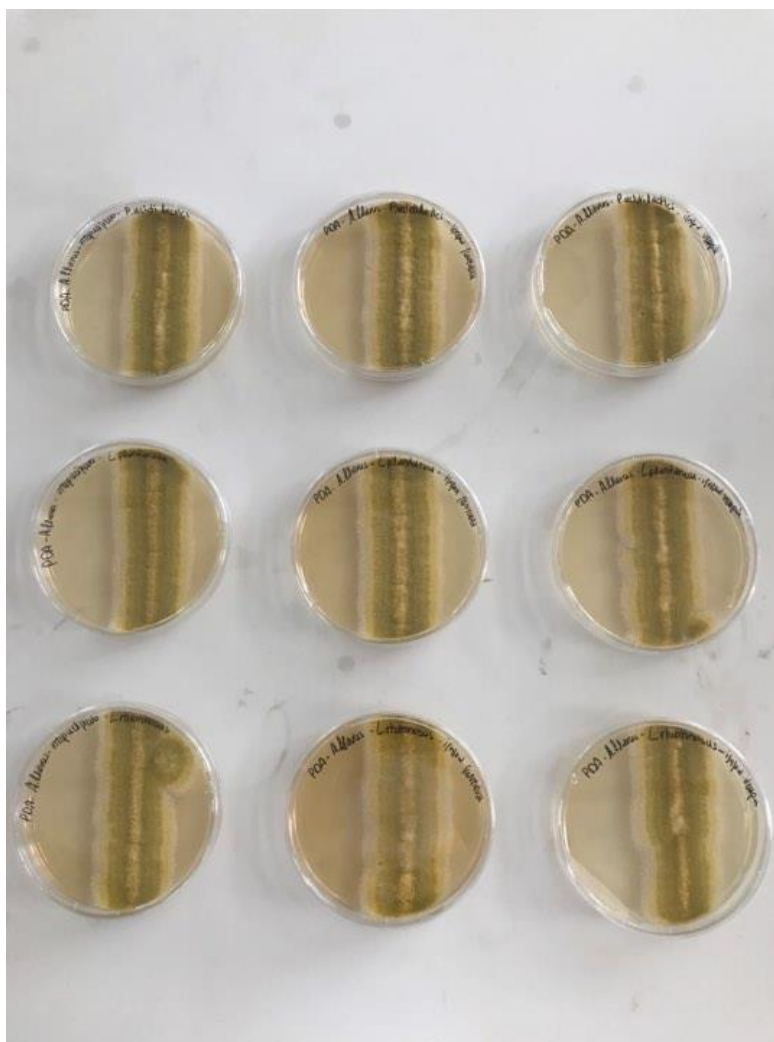
Εικόνα 30: Έκτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με αντιμικροβιακά διαλύματα διάφορων μικροοργανισμών με τη μέθοδο μέτρησης ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα

Μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση (cross streak)

Σε αυτή τη μέθοδο, στρώθηκαν αρχικά τα τρυβλία με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα και αφότου στέγνωσαν, εμβολιάστηκαν με κρίκο εμβολιασμού. Σε κάθε τρυβλίο, σχηματίστηκε μια κάθετη γραμμή με το μύκητα στόχο και έπειτα σχηματίστηκε και μια δεύτερη γραμμή παράλληλη με αυτή του μύκητα, με το αντίστοιχο αντιμικροβιακό διάλυμα. Τα τρυβλία έπειτα αφέθηκαν να επωαστούν για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 31: Τρίτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με αντιμικροβιακά διαλύματα διάφορων μικροοργανισμών με τη μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση



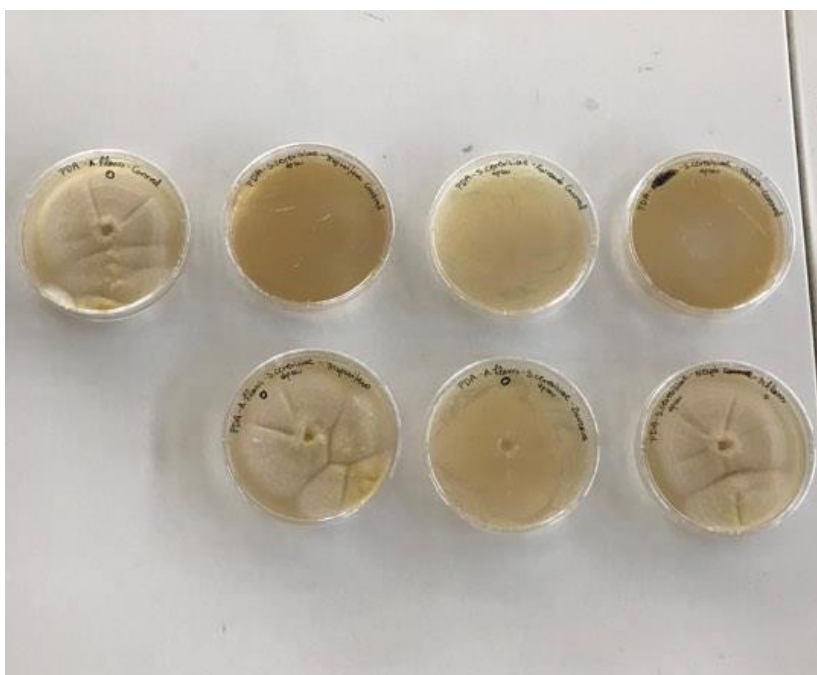
Εικόνα 32: Έκτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με αντιμικροβιακά διαλύματα διάφορων μικροοργανισμών με τη μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση

Μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*

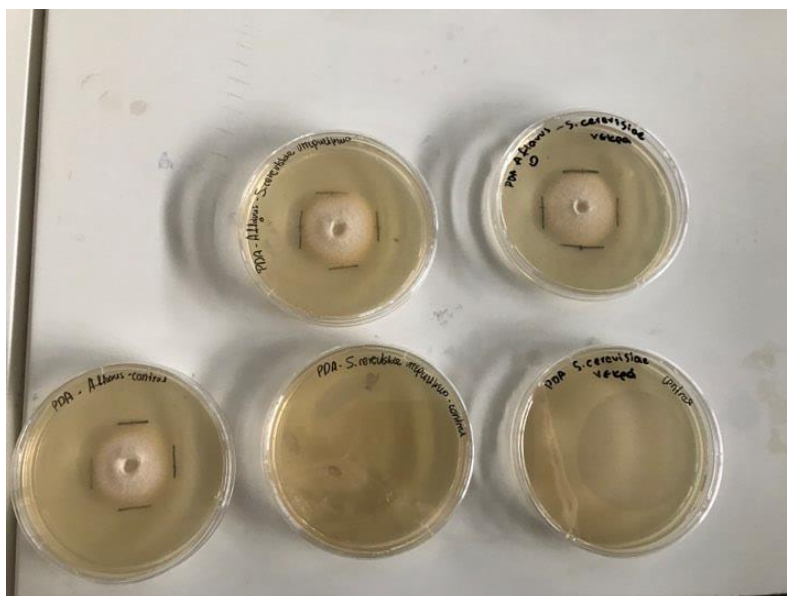
Σε αυτή τη μέθοδο στρώθηκαν αρχικά τα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα και αφέθηκαν μέχρι να στεγνώσουν. Στη συνέχεια το κάθε τρυβλίο επιστρώθηκε με τη χρήση μεταλλικής ράβδου επίστρωσης, με τις αντιμικροβιακές καλλιέργειες από τον κάθε προστατευτικό μικροοργανισμό. Έπειτα, μόλις στέγνωσαν τα επιστρωμένα τρυβλία, ανοίχθηκε μία τρύπα (βοθρίο ή πηγαδάκι) στο κέντρο του καθενός και προστέθηκε σε αυτή, ποσότητα των 25μL με *A. flavus*. Τα τρυβλία έπειτα αφέθηκαν να επωαστούν για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



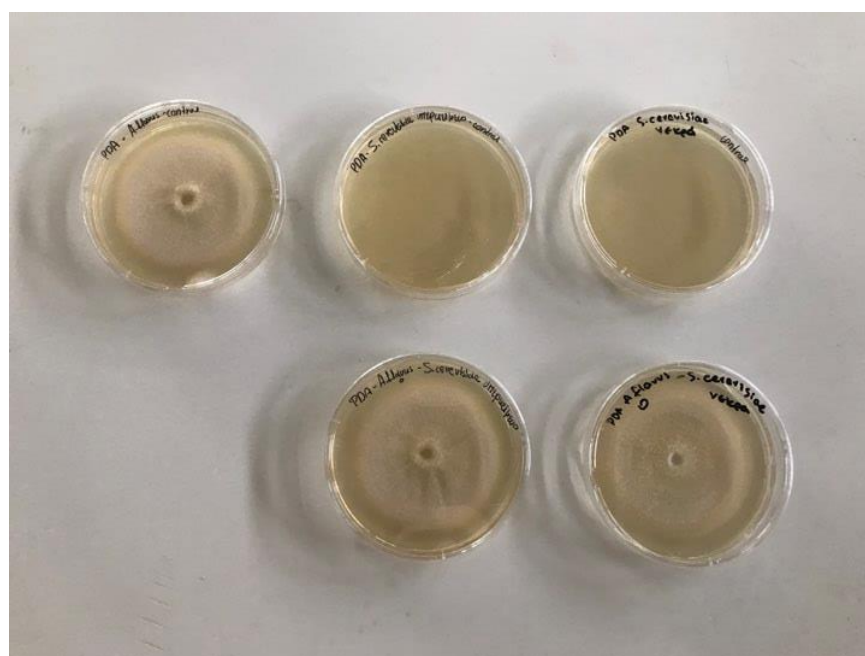
Εικόνα 33: Τρίτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με τα αντιμικροβιακά διαλύματα του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου με τη μέθοδο μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*



Εικόνα 34: Έκτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με τα αντιμικροβιακά διαλύματα του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου με τη μέθοδο μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*



Εικόνα 35: Τρίτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με τα αντιμικροβιακά διαλύματα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου με τη μέθοδο μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*

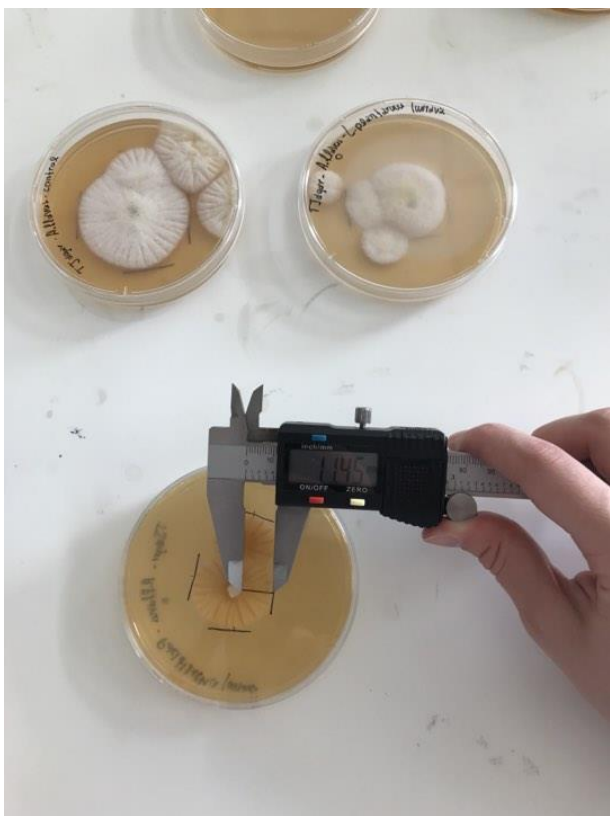


Εικόνα 36: Έκτη ημέρα επώασης των τρυβλίων με τα αντιμικροβιακά διαλύματα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου με τη μέθοδο μέτρηση ζώνης (διαμέτρου) εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*

Σε αυτή τη μέθοδο είναι απαραίτητη η μέτρηση της διαμέτρου του μύκητα στο κάθε τρυβλίο, με τη χρήση του οργάνου παχύμετρου (σε mm), την τρίτη και την έκτη μέρα από την μέρα της επίστρωσής τους. Αυτό έγινε μετρώντας τέσσερις ακτίνες από τις άκρες του βοθρίου μέχρι το άκρο της ανάπτυξης της μυκηλιακής υφής. Αυτές οι τέσσερις ακτίνες έπειτα προστέθηκαν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους.



Εικόνες 37 & 38: Εμβολιασμός τρυβλίων με τον μικροοργανισμό στόχο *Aspergillus flavus* και με τα αντιμικροβιακά διαλύματα, με τη χρήση πιπέτα μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής



Εικόνες 39 & 40: Μέτρηση ζώνης διαμέτρου με παχύμετρο και ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα

v. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης *S. cerevisiae* οίνου σε φράουλες

Κατά την έναρξη της διαδικασίας αυτής, παρασκευάστηκαν δύο σωληνάκια με θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Έπειτα, εμβολιάστηκε στο κάθε ένα ορισμένη ποσότητα σκόνης από λυοφιλιομένη καλλιέργεια του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου και αφέθηκε να επωαστεί για περίπου δύο μέρες σε κλίβανο επώασης στους 30°C. Στη συνέχεια αφού αναπτύχθηκε ίζημα λήφθηκε με κρίκο εμβολιασμού ποσότητα από αυτό το ίζημα, εμβολιάστηκε σε τρυβλίο με τη μέθοδο streaking σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και αφέθηκε εκ νέου για επώαση στους 30°C. Όταν αναπτύχθηκαν αποικίες από τον κάθε προστατευτικό μικροοργανισμό, λήφθηκε μεμονωμένη αποικία με κρίκο εμβολιασμού και εμβολιάστηκε σε σωληνάκι με θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Έπειτα τα σωληνάκια αυτά αφέθηκαν εκ νέου για να επωαστούν μέχρι τον σχηματισμό ιζήματος.

Από την στιγμή που σχηματίστηκε ίζημα, το περιεχόμενο από κάθε σωληνάκι προστέθηκε σε δύο κωνικές φιάλες των 500ml και έπειτα συμπληρώθηκε στην κάθε μια επιπλέον θρεπτικό υπόστρωμα PDB, ώστε η κάθε κωνική φιάλη να περιέχει 300ml. Οι δύο κωνικές φιάλες αφέθηκαν να επωαστούν για δύο μέρες με ήπια ανάδευση (200rpm) στους 25-30°C. Μετά το πέρας δύο ημερών αφού αναπτύχθηκε ο *S. cerevisiae* στο περιεχόμενο των δύο κωνικών, στη μία από τις δύο κωνικές πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση ώστε να ληφθεί το υπερκείμενο διάλυμα, ενώ στην άλλη δεν έγινε φυγοκέντριση.

Το περιεχόμενο της πρώτης κωνικής φιάλης μοιράστηκε σε σωληνάκια Falcon των 50ml, τόσα ώστε το καθένα να περιέχει από 30ml διαλύματος. Έπειτα όλα τα σωληνάκια φυγοκεντρίθηκαν σε 4500rpm για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε από όλα τα Falcon προστέθηκε σε έναν περιέκτη.

Από τη δεύτερη κωνική λήφθηκε όλο το περιεχόμενο της χωρίς να γίνει φυγοκέντριση περιέχοντας και τα ζωντανά κύτταρα και προστέθηκε και αυτό σε έναν άλλο περιέκτη. Στη συνέχεια οι φράουλες μοιράστηκαν σε τέσσερις μικρότερους περιέκτες. Στον πρώτο περιέκτη οι φράουλες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας χωρίς να δεχτούν κάποια επιπλέον επεξεργασία. Στον δεύτερο περιέκτη οι φράουλες πλύθηκαν με σκέτο νερό από την βρύση. Στον τρίτο περιέκτη, αρχικά πλύθηκαν με νερό από τη βρύση, έπειτα εμβαπτίστηκαν στον περιέκτη με το υπερκείμενο διάλυμα για μισή ώρα και έπειτα τοποθετήθηκαν στον περιέκτη τους. Στον τέταρτο περιέκτη οι φράουλες αρχικά πλύθηκαν με νερό από τη βρύση, έπειτα εμβαπτίστηκαν στον περιέκτη με το διάλυμα που δεν υπέστη φυγοκέντριση για μισή ώρα και έπειτα τοποθετήθηκαν στον περιέκτη τους.

Τέλος οι τέσσερις περιέκτες σφραγίστηκαν με καπάκι, έπειτα τοποθετήθηκαν στο ψυγείο και ξεκίνησε η παρατήρηση τους μέχρι να διαπιστωθεί αλλοίωση σε κάποιο περιέκτη.



Εικόνες 41 & 42: Κωνικές φιάλες για την παρασκευή *Saccharomyces cerevisiae* και φρέσκες φράουλες σε περιέκτες



Εικόνα 43: Εμβάπτιση των φρέσκων φραουλών στα δοχεία με το υπερκείμενο διάλυμα και στο διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα που δεν υπέστη φυγοκέντριση



Εικόνα 44: Φρέσκες φράουλες στους περιέκτες τους έτοιμες για αποθήκευση σε συντήρηση στους 4°C, έπειτα από την επεξεργασία τους



Εικόνα 45: Αλλοιωμένες φράουλες έπειτα από το πέρας 15 ημερών στη συντήρηση στους 4°C

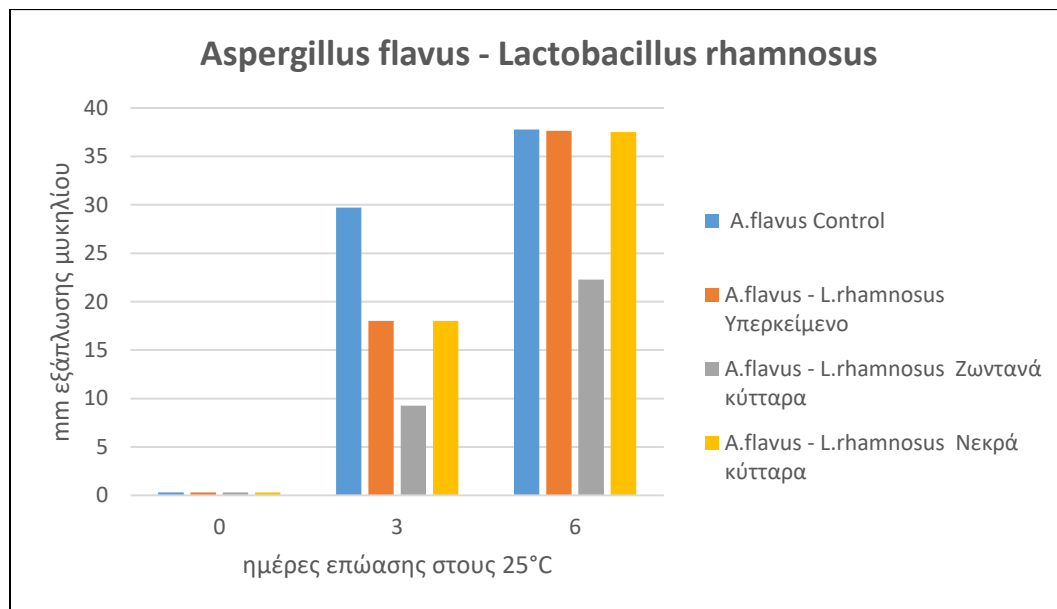


Εικόνα 46: Αλλοιωμένες φράουλες έπειτα από το πέρας 45 ημερών στη συντήρηση στους 4°C

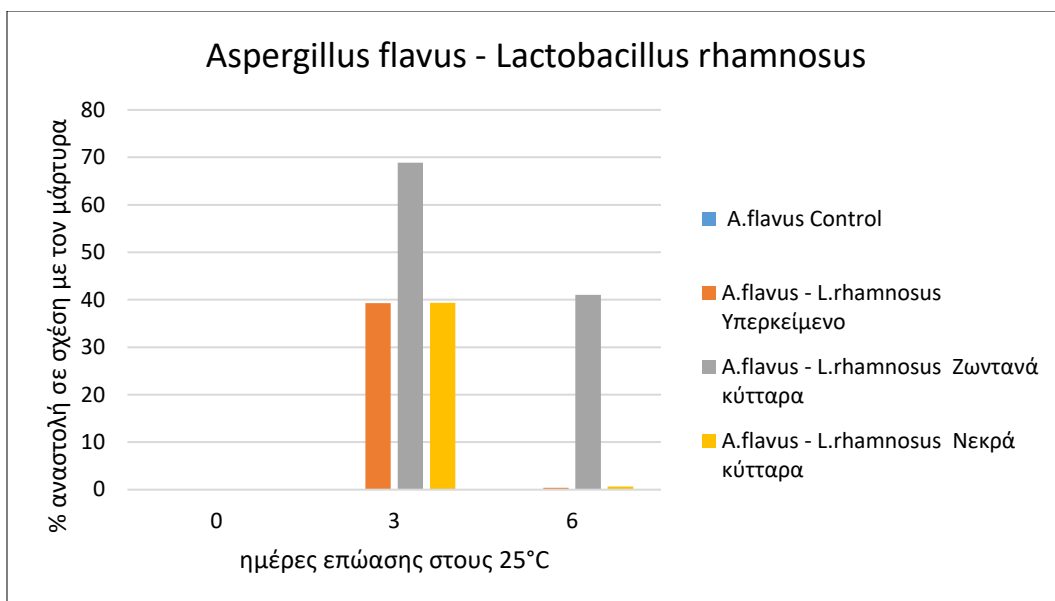
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ&ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, συγκεντρώθηκαν όλα τα αποτελέσματα και οι μετρήσεις που λήφθηκαν και με τη βοήθεια φύλλων excel δημιουργήθηκαν διαγράμματα, για την καλύτερη κατανόηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τα διαγράμματα αυτά βασίστηκαν αποκλειστικά στη μέθοδο μέτρησης ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus*, η οποία είχε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα στόχου από τους προστατευτικούς μικροοργανισμούς. Για τις άλλες δύο μεθόδους, τη μέτρηση ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα και τη μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση, δεν παρατηρήθηκε καμία ανασταλτική δράση στα τρυβλία, επομένως δεν λήφθηκαν υπόψιν.

3.1 Αποτελέσματα για τη μέθοδο μέτρησης ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*



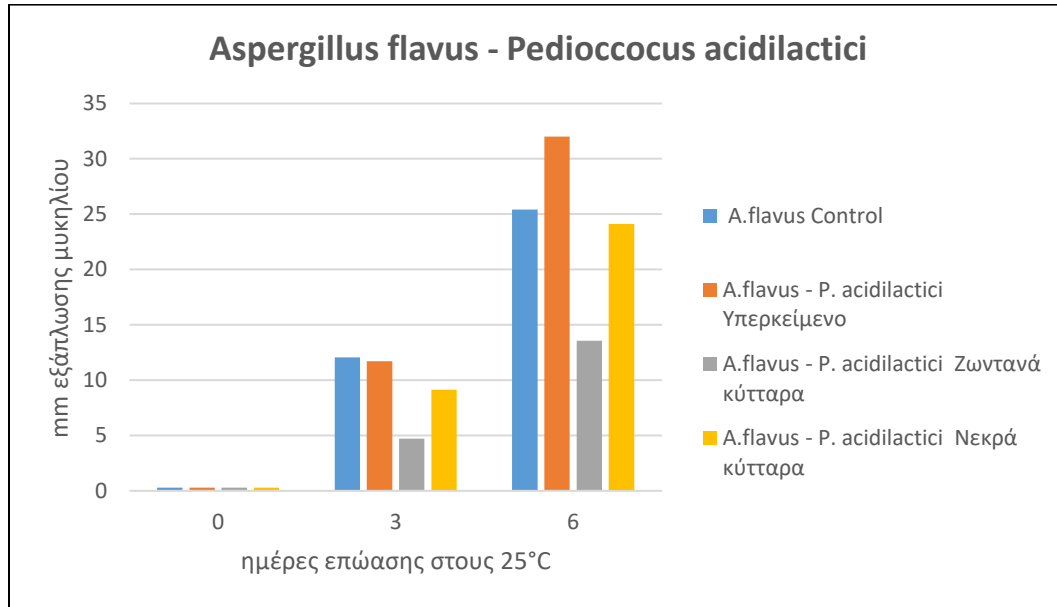
Διάγραμμα 1: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Lactobacillus rhamnosus*.



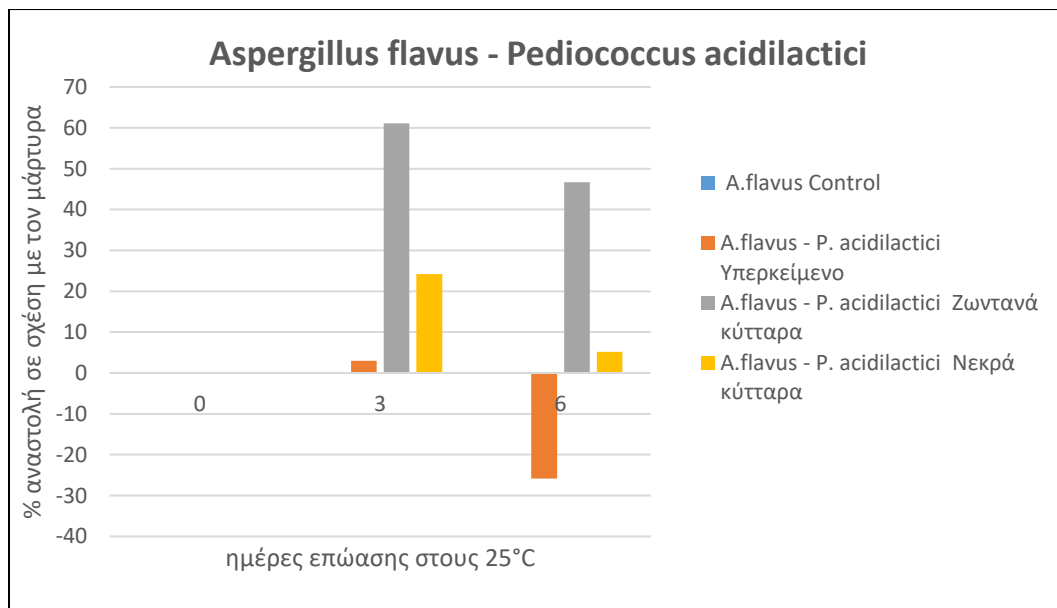
Διάγραμμα 2: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Lactobacillus rhamnosus*, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

Στο **Διάγραμμα 1**, φαίνεται η εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα υπό την παρουσία του κάθε αντιμικροβιακού διαλύματος του προστατευτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus rhamnosus*. Σε σχέση με τον μάρτυρα του *Aspergillus flavus*, παρατηρήθηκε ότι την τρίτη μέρα, η μικρότερη εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα στόχου, ήταν στο τρυβλίο που είχε προστεθεί το διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα του *L. rhamnosus* και αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της παραγωγής οξέων όπως το οξικό οξύ, διακετυλίου, βακτηριοσινών και άλλων ουσιών σύμφωνα με την έρευνα του Schwenninger et al., 2011. Το ίδιο καλή ανασταλτική δράση συνέχισε να έχει μέχρι και την έκτη μέρα επώασης, ενώ παρατηρήθηκε ότι τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, το υπερκείμενο και το διάλυμα με τα νεκρά κύτταρα, δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus*, ούτε την τρίτη, ούτε την έκτη μέρα της επώασης. Στο **Διάγραμμα 2**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Όπως προέκυψε ότι στο **Διάγραμμα 1**, την καλύτερη ανασταλτική δράση είχε το τρυβλίο με τα ζωντανά κύτταρα του *L. Rhamnosus*, έτσι και στο **Διάγραμμα 2**, είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του *Aspergillus flavus*. Το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον

μάρτυρα για τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν σημαντικά μικρότερο. Επίσης, παρατηρείται ότι με το πέρας των ημερών μειώνεται το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για όλα τα αντιμικροβιακά διαλύματα.



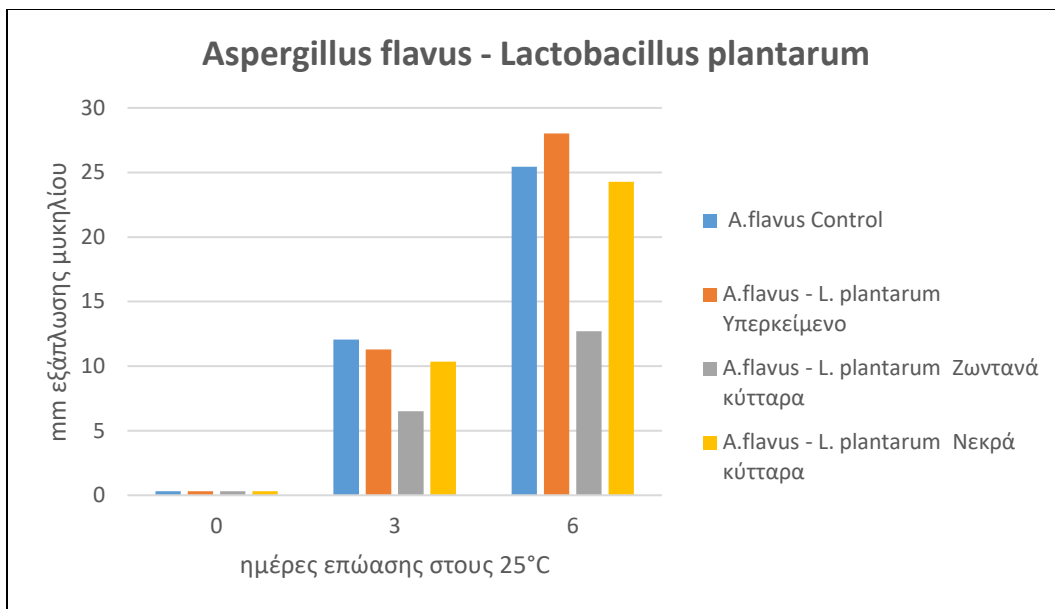
Διάγραμμα 3: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασής του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Pediococcus acidilactici*.



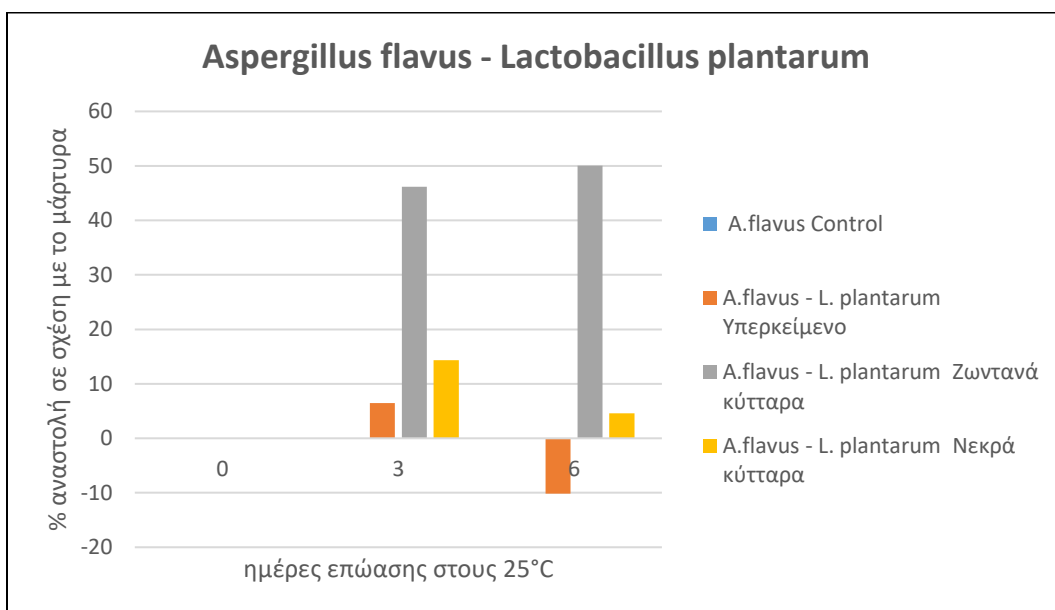
Διάγραμμα 4: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου

αντιμικροβιακού διαλύματος του *Pediococcus acidilactici*, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρείς και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

Στο **Διάγραμμα 3**, φαίνεται η εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα υπό την παρουσία του κάθε αντιμικροβιακού διαλύματος του προστατευτικού μικροοργανισμού *Pediococcus acidilactici*. Σε σχέση με τον μάρτυρα του *Aspergillus flavus*, παρατηρήθηκε ότι την τρίτη μέρα, η μικρότερη εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα στόχου, ήταν στο τρυβλίο που είχε προστεθεί το διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα του *Pediococcus acidilactici* και αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της παραγωγής οξέων όπως το οξικό οξύ, διακετυλίου, πεδιοσινών και άλλων ουσιών σύμφωνα με την έρευνα του Schwenninger et al., 2011. Το ίδιο καλή ανασταλτική δράση συνέχισε να έχει μέχρι και την έκτη μέρα επώασης, ενώ παρατηρήθηκε ότι τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, το υπερκείμενο και το διάλυμα με τα νεκρά κύτταρα, δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus*, ούτε την τρίτη, ούτε την έκτη μέρα της επώασης. Στο **Διάγραμμα 4**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Όπως προέκυψε ότι στο **Διάγραμμα 3**, την καλύτερη ανασταλτική δράση είχε το τρυβλίο με τα ζωντανά κύτταρα του *Pediococcus acidilactici*, έτσι και στο **Διάγραμμα 4**, είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του *Aspergillus flavus*. Το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν σημαντικά μικρότερο. Επίσης, παρατηρείται ότι με το πέρασ των ημερών μειώνεται το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για όλα τα αντιμικροβιακά διαλύματα.

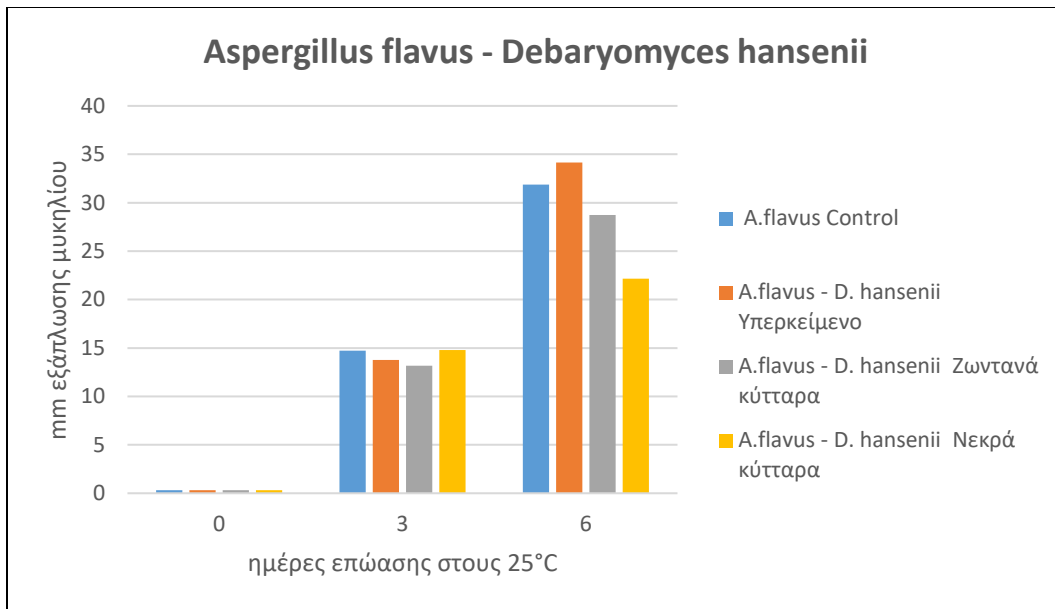


Διάγραμμα 5: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Lactobacillus plantarum*.

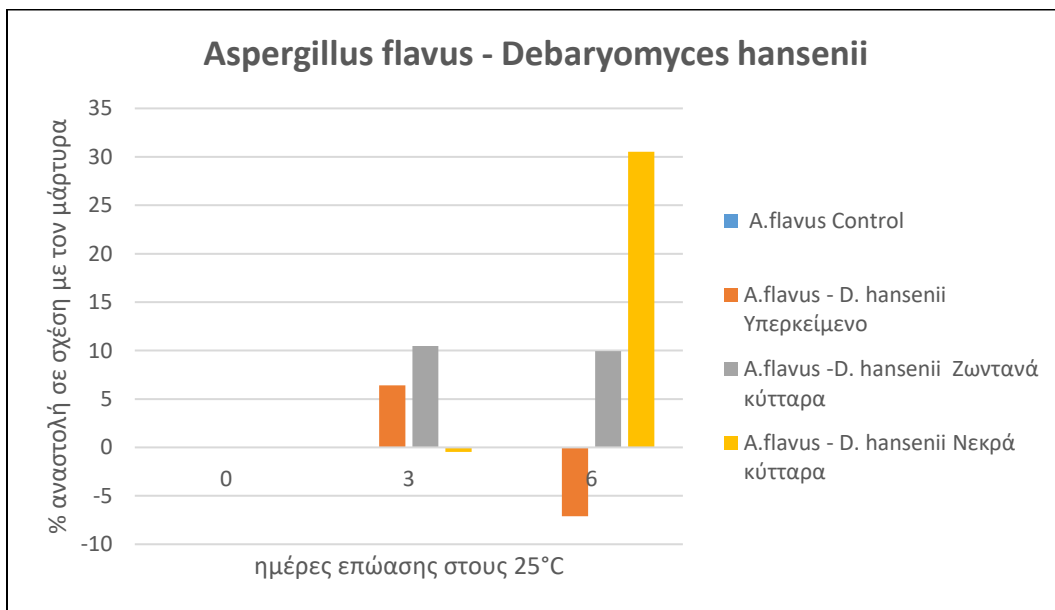


Διάγραμμα 6: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Lactobacillus plantarum*, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

Στο **Διάγραμμα 5**, φαίνεται η εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα υπό την παρουσία του κάθε αντιμικροβιακού διαλύματος του προστατευτικού μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum*. Σε σχέση με τον μάρτυρα του *Aspergillus flavus*, παρατηρήθηκε ότι την τρίτη μέρα, η μικρότερη εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα στόχου, ήταν στο τρυβλίο που είχε προστεθεί το διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα του *Lactobacillus plantarum*. Το ίδιο καλή ανασταλτική δράση συνέχισε να έχει μέχρι και την έκτη μέρα επώασης, ενώ παρατηρήθηκε ότι τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, το υπερκείμενο και το διάλυμα με τα νεκρά κύτταρα, δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus*, ούτε την τρίτη, ούτε την έκτη μέρα της επώασης. Στο **Διάγραμμα 6**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Όπως προέκυψε ότι στο **Διάγραμμα 5**, την καλύτερη ανασταλτική δράση είχε το τρυβλίο με τα ζωντανά κύτταρα του *Lactobacillus plantarum*, έτσι και στο **Διάγραμμα 6**, είχε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του *Aspergillus flavus*. Το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν σημαντικά μικρότερο. Επίσης, παρατηρείται ότι με το πέρας των ημερών μειώνεται το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για τα αντιμικροβιακά διαλύματα των νεκρών κυττάρων και του υπερκείμενου διαλύματος, ενώ αυξάνεται για το αντιμικροβιακό διάλυμα των ζωντανών κυττάρων. Σύμφωνα με τους Stroim et al., (2002) εντοπίστηκε ένα στέλεχος του *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 από σιλό χόρτου που παρουσίασε ισχυρές αντιμυκητιασικές ιδιότητες αναστέλλοντας αποτελεσματικά την ανάπτυξη των *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Kluyveromyces marxianus* χωρίς τη χρήση χημικών ή βιολογικών πρόσθετων. Συγκεκριμένα αναγνωρίστηκε το 3-φαινυλογαλακτικό οξύ ως τη βασική αντιμυκητιακή ένωση που απομονώθηκε από τον *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 και επίσης άλλες δύο ενώσεις είναι το cyclo(L-Phe-L-Pro) και το cyclo(L-Phe trans-4-OH-L-Pro), οι οποίες παρουσίασαν ανασταλτικές δράσεις. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις κατά του *Aspergillus fumigatus* και του *Penicillium roqueforti* ήταν 20 g/l και 7,5 g/l για το cyclo(L-Phe-L-Pro) και το 3-φαινυλογαλακτικό οξύ, αντίστοιχα (Stroim et. al., 2002).

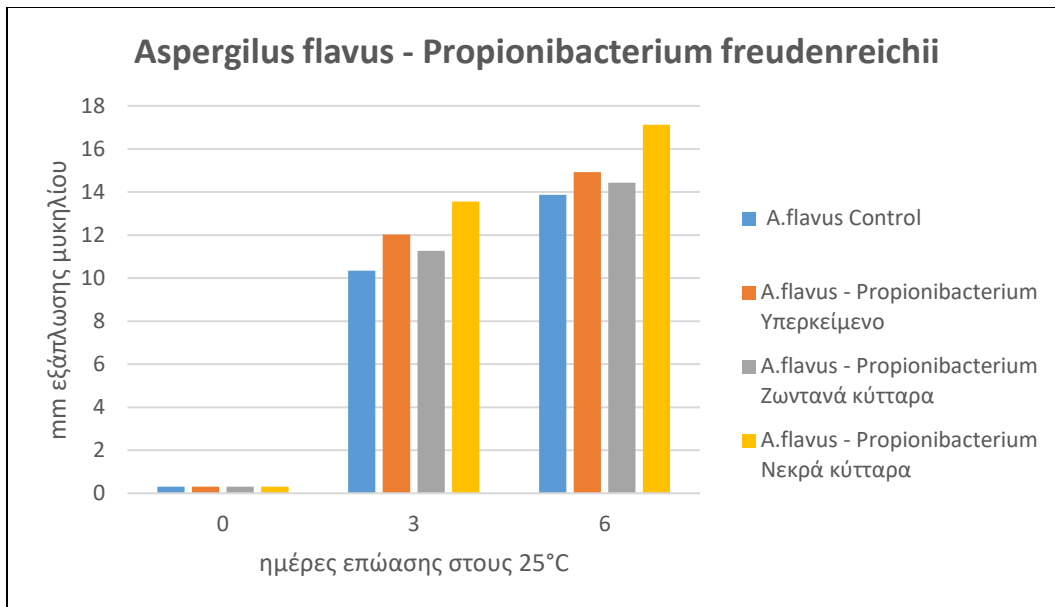


Διάγραμμα 7: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Debaryomyces hansenii*.

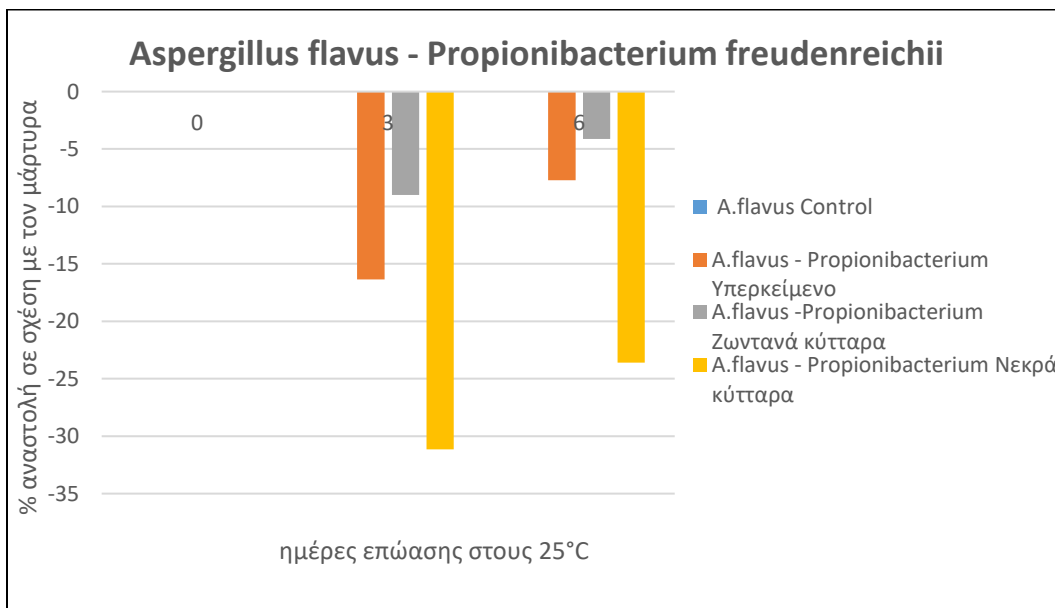


Διάγραμμα 8: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Debaryomyces hansenii*, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 7** φαίνεται ότι η μικρότερη εξάπλωση του μυκηλίου του *A. flavus* συνέβη υπό την παρουσία των αντιμικροβιακών διαλυμάτων των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων, ενώ υπό την παρουσία του υπερκείμενου διαλύματος η εξάπλωση είναι μεγαλύτερη. Σύμφωνα με μία έρευνα παρατηρήθηκαν ότι οι μηχανισμοί δράσης του *Debaryomyces hansenii* έναντι των παθογόνων μυκήτων είναι η ικανότητα προσκόλλησης του *D. hansenii*, η οποία σχετίζεται με την υψηλή υδροφοβικότητα της επιφάνειάς του και την παρουσία αρωματικών αλκοολών που επηρεάζουν την ικανότητα προσκόλλησής του στο κύτταρο του μύκητα. Επίσης ένας ακόμη μηχανισμός δράσης είναι η έκκριση πτητικών ενώσεων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως ανταγωνιστικός μηχανισμός των ζυμομυκήτων. Τέλος, η παραγωγή ενζύμων όπως η πρωτεάση, η χιτινάση και η γλυκανάση από τον *D. hansenii* μεσολαβούν στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος του φυτοπαθογόνου μύκητα *Penicillium italicum* όπως διαπιστώθηκε από τον (Hernández-Montiel et al., 2018). Ωστόσο, στο **Διάγραμμα 7** η εκτεταμένη εξάπλωση του *A. flavus* υπό την παρουσία του υπερκείμενου αντιμικροβιακού διαλύματος δεν φαίνεται να ευνοείται με τους παραπάνω μηχανισμούς δράσης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία θρεπτικών συστατικών στο υπερκείμενο και άλλων ενζύμων και πτητικών ενώσεων που δεν καταναλώθηκαν από τον *D. hansenii* και αξιοποιήθηκαν τελικά από τον *A. flavus* με συνέπεια την εκτεταμένη ανάπτυξη του μυκηλίου. Στο **Διάγραμμα 8**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του *Aspergillus flavus* σε σχέση με τον μάρτυρα, το είχε το αντιμικροβιακό διάλυμα των νεκρών κυττάρων, ενώ για τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν σημαντικά μικρότερο. Επίσης, παρατηρείται ότι με το πέρασ των ημερών αυξήθηκε το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για το αντιμικροβιακό διάλυμα των νεκρών κυττάρων, μειώθηκε για το υπερκείμενο διάλυμα ενώ για το αντιμικροβιακό διάλυμα των ζωντανών κυττάρων, παρέμεινε σταθερό.

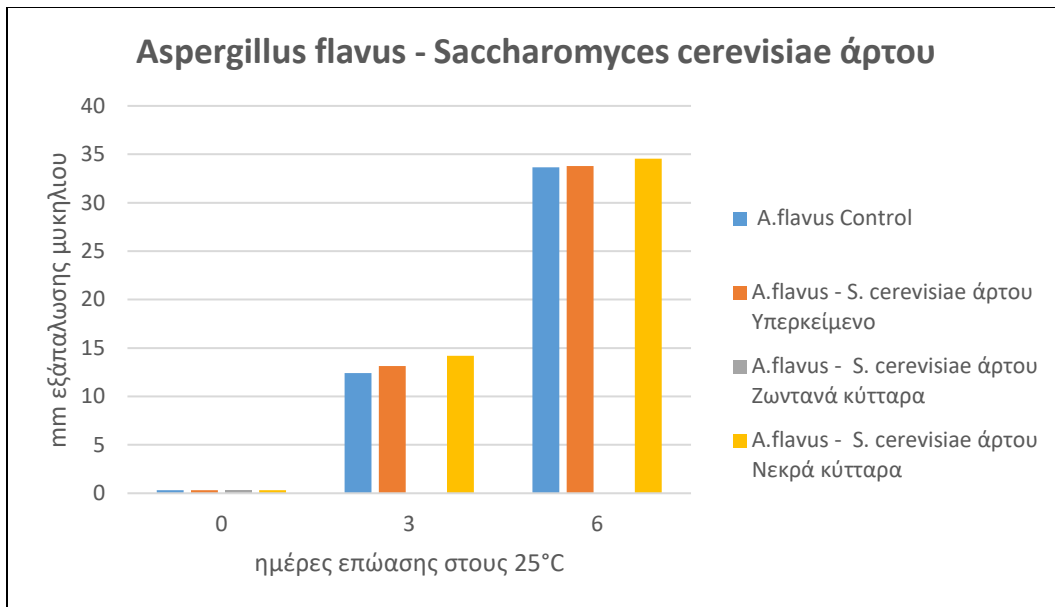


Διάγραμμα 9: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Propionibacterium freudenreichii*.

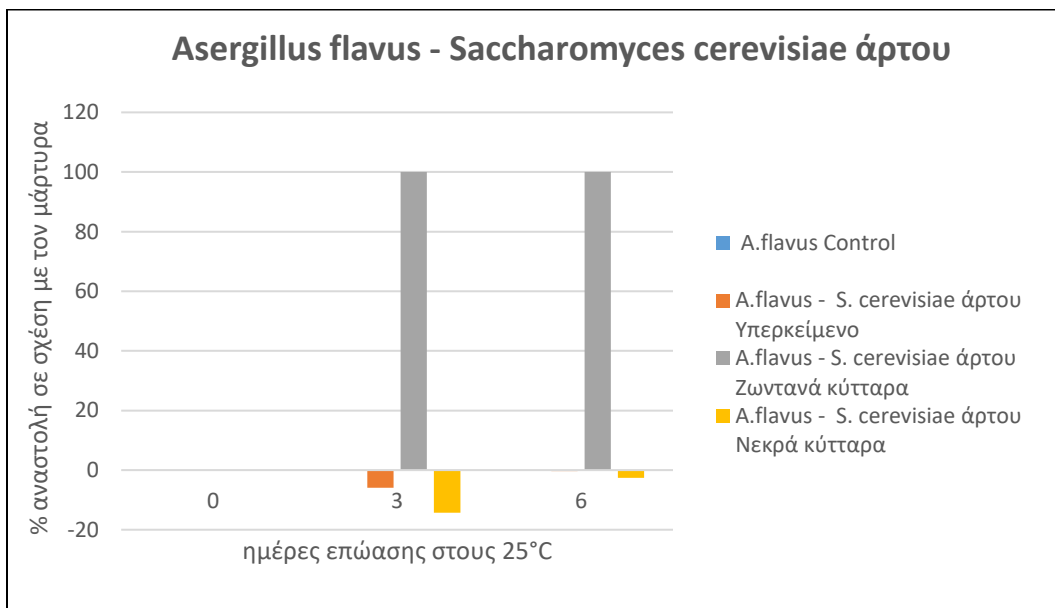


Διάγραμμα 10: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Propionibacterium freudenreichii*, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

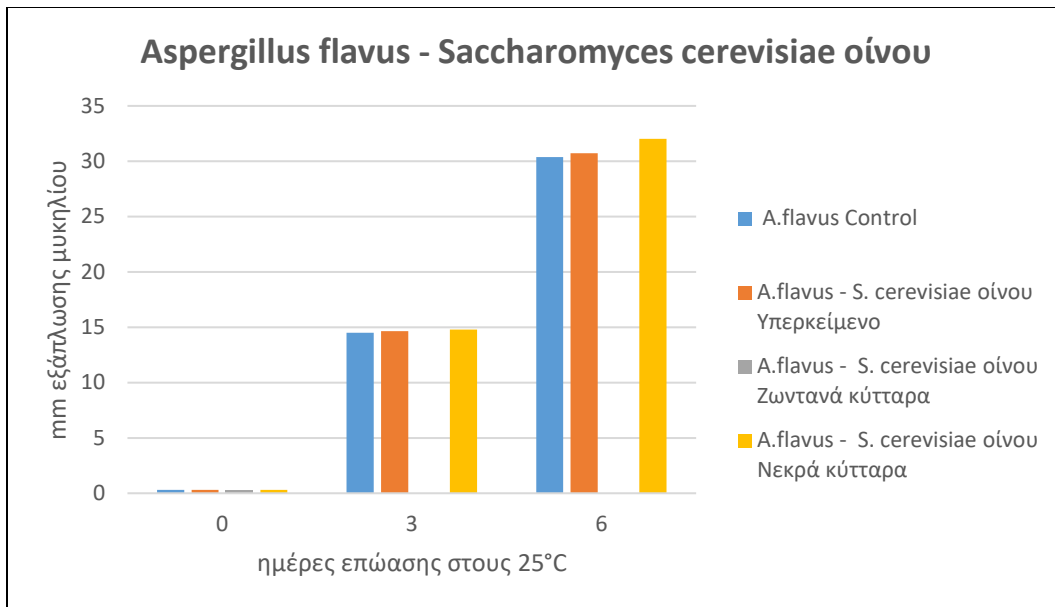
Παρατηρείται ότι τα νεκρά κύτταρα του *Propionibacterium freudenreichii* διεγείρουν την εξάπλωση του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*. Το ίδιο συμβαίνει και σε μία έρευνα όπου τα βακτήρια προπιονικού οξέος (*Propionibacterium freudenreichii*) αυξάνουν το ρυθμό ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα αυτό συμβαίνει, καθώς αυτά τα βακτήρια παράγουν προπιονικό οξύ και εξωμεταβολίτες που ανήκουν στα θρεπτικά συστατικά, όπως βιταμίνες του συμπλέγματος Β, αμινοξέα και ελεύθερα νουκλεοτίδια, οι οποίες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, θερμοδιαλυτές και ευνοούν την ανάπτυξη της ζύμης (Hugenholtz & Smid, 2002). Επίσης όταν ο αντιμικροβιακός παράγοντας, το προπιονικό νάτριο, βρίσκεται στο μέσο σε συγκέντρωση 1,5% δεν παρεμβαίνει στην ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ όταν βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,2% αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του *B. subtilis* (Kaur, 1986). Ακόμα σε μία άλλη έρευνα φαίνεται ότι τα βακτήρια προπιονικού οξέος διεγείρουν την ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών όπως τα bifidobacteria (Isawa et al., 2002). Επιπλέον τα προπιονικά άλατα που παράγονται από τα βακτήρια προπιονικού οξέος (*P. Shermanii*) διεγείρουν την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium roqueforti* (Suhr & Nielsen, 2004). Συνεπώς και στο συγκεκριμένο πείραμα το *Propionibacterium freudenreichii* παρήγαγε εξωμεταβολίτες και προπιονικό οξύ, τα οποία ευνόησαν την ανάπτυξη του μύκητα-στόχου *Aspergillus flavus*. Όσον αφορά τα ζωντανά κύτταρα του *Propionibacterium freudenreichii* φαίνεται ότι είναι τα μοναδικά κύτταρα στο **Διάγραμμα 9** που βοηθούν στη μείωση της εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*. Σύμφωνα με τους Gwiazdowska et al., 2008 παρατηρήθηκε ότι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες του *Propionibacterium freudenreichii* έχουν αντιμυκητιασική δράση και συγκεκριμένα οι ισχυρότερες επιδράσεις βρέθηκαν σε καλλιέργειες προπιονιβακτηρίων που περιείχαν ζωντανά κύτταρα και όχι σε καλλιέργειες υπερκείμενων χωρίς κύτταρα. Συγκεκριμένα το *Propionibacterium freudenreichii* μπορεί να αναστείλει ένα εύρος μικροοργανισμών από ζύμες, μούχλες, *Bacillus spp.* παράγοντας οργανικά οξέα όπως προπιονικό οξύ, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και το διακετύλιο (Schwenninger et al., 2011). Στο **Διάγραμμα 10**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για όλα τα αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν αρνητικό, δηλαδή δεν υπήρξε καμία ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα στόχου.



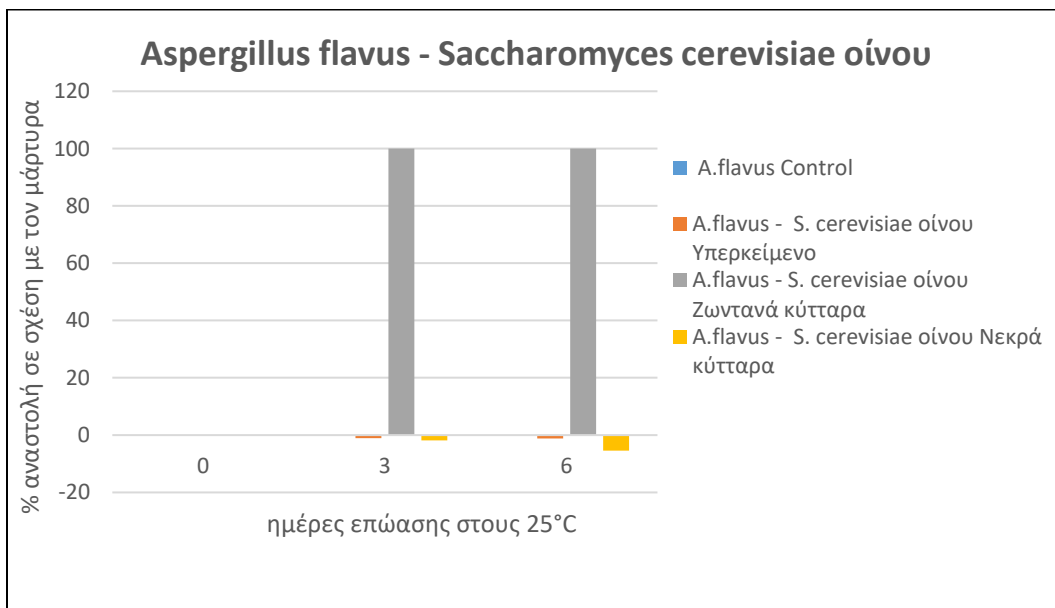
Διάγραμμα 11: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασής του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου.



Διάγραμμα 12: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.



Διάγραμμα 13: Χιλιοστά εξάπλωσης του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασής του στους 25°C, παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου.



Διάγραμμα 14: % αναστολή του μύκητα *Aspergillus flavus* παρουσία του αντίστοιχου αντιμικροβιακού διαλύματος του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου, σε σχέση με τον μάρτυρα στις μηδέν, τρεις και έξι ημέρες επώασης του στους 25°C.

Στα **Διαγράμματα 11** και **13**, φαίνεται η εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα υπό την παρουσία του κάθε αντιμικροβιακού διαλύματος του προστατευτικού μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* άρτου και οίνου. Σε σχέση με τον μάρτυρα του *Aspergillus flavus*, παρατηρήθηκε ότι και την τρίτη και την έκτη μέρα, υπήρξε πλήρης αναστολή του μυκηλίου του μύκητα στόχου στο τρυβλίο που είχε προστεθεί το διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου και οίνου αντίστοιχα. Σύμφωνα με μία έρευνα φαίνεται ότι επιτεύχθηκε μέγιστη αναστολή του *Aspergillus flavus* Z103 από ζωντανά κύτταρα των *Saccharomyces cerevisiae* EBF101 και *S. cerevisiae* 117 με 85 και 83% αντίστοιχα (Abdel et al., 2019). Συγκεκριμένα η ανταγωνιστική ικανότητα του *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να σχετίζεται με τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά και χώρο, την άμεση επαφή και την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (Lima et al., 2013). Η έκκριση υδρολυτικών ενζύμων από τα εξεταζόμενα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* όπως η χιτινάση αλλά και η β-γλυκανάση φαίνεται ότι διαθέτουν αντιμυκητιασική δράση. Σύμφωνα με μία άλλη έρευνα προκύπτει ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* εκκρίνει αντιμικροβιακά πεπτίδια που προέρχονται από το γλυκολυτικό ένζυμο γλυκεραλδεϋδη 3 φωσφορική αφυδρογονάση (GAPDH) και είναι δραστικά έναντι ζυμομυκήτων και βακτηρίων. Ένα από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, είναι η σακχαρομυκίνη που εκκρίνεται από το *S. cerevisiae* και η δραστηριότητα του οποίου εξαρτάται από τη συζευγμένη δράση πεπτιδίων που προέρχονται από την GAPDH (Branco et al., 2017). Παρατηρήθηκε ότι τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, το υπερκείμενο και το διάλυμα με τα νεκρά κύτταρα, δεν ανέστειλαν καθόλου την ανάπτυξη του μύκητα *A. flavus*, ούτε την τρίτη, ούτε την έκτη μέρα της επώασης. Στα **Διαγράμματα 12** και **14**, απεικονίζεται το ποσοστό της αναστολής του *A. flavus*, την πρώτη, την τρίτη και την έκτη μέρα της επώασης του στους 25°C. Όπως προέκυψε ότι στο **Διάγραμμα 11** και **13**, την καλύτερη ανασταλτική δράση είχε το τρυβλίο με τα ζωντανά κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* άρτου και οίνου αντίστοιχα, έτσι και στα **Διαγράμματα 12** και **14**, είχε το μέγιστο ποσοστό αναστολής του *Aspergillus flavus*. Το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για τα άλλα δύο αντιμικροβιακά διαλύματα, ήταν αρνητικό, δηλαδή μηδενικό. Επίσης, παρατηρείται ότι με το πέρας των ημερών δεν μεταβάλλεται το ποσοστό αναστολής σε σχέση με τον μάρτυρα για το αντιμικροβιακό διάλυμα των ζωντανών κυττάρων.

Πίνακας 8: Αντιμυκητιακά βιοσυντηρητικά με βάση το *Lactobacillus spp.* και το *Propionibacterium spp.* (Schwenninger et al., 2011).

Table 2.2 Commercialized antifungal biopreservatives based on <i>Lactobacillus</i> spp. (<i>L.</i>) and <i>Propionibacterium</i> spp. (<i>P.</i>)				
Biopreservative	Strain(s)	Inhibitory spectrum	Inhibitory mechanism	Application range
Protective cultures (live bacteria)				
HOLDBAC™ YM-B ^a	<i>L. rhamnosus</i> LC705 <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> JS	Yeasts, moulds (<i>Rhodotorula</i> , <i>rubra</i> , <i>Pichia quilermondii</i>) <i>Bacillus</i> spp.	Propionic and acetic acids Diacetyl 2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid	Fresh fermented dairy products (yoghurt, sour cream, quark, cottage cheese)
HOLDBAC™ YM-C ^a	<i>L. paracasei</i> SM20 <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> JS	Yeasts, moulds (<i>Candida</i> spp., <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>)	Propionic and acetic acids Succinic acid 2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid 3-Phenyllactic acid	Fresh fermented dairy products (yoghurt, sour cream, quark, cottage cheese)
Feedtech® Silage F300 ^b	<i>L. plantarum</i> MiLab 393 <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Yeasts, moulds <i>Clostridium</i> spp.	3-Phenyllactic acid Cyclic dipeptides Nisin (bacteriocin)	Silage
Heat treated ferment (inactivated bacteria)				
Microgard™ ^a	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Yeasts and moulds Gram-negative bacteria (<i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i>)	Organic acids (propionic, acetic, and lactic acids)	Bakery products and fillings; dairy products such as cheese; low pH dressings and sauces; processed meat products; chilled, pasteurised ready-to-eat meals; soups

Στον παραπάνω Πίνακα 8, φαίνονται οι προστατευτικές καλλιέργειες ζωντανών και νεκρών κυττάρων διάφορων μικροοργανισμών, οι μικροοργανισμοί στόχοι τους οποίους αναστέλλουν, οι μηχανισμοί δράσης τους και η εφαρμογή που έχουν σε ένα εύρος τροφίμων.

3.2 Αποτελέσματα για την in vivo δοκιμή της αντιμικροβιακής δράσης του

Saccharomyces cerevisiae οίνου σε φρέσκες φράουλες

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της συντήρησης 4 δειγμάτων από 10 τεμάχια φράουλας, το οποία εμβapτίστηκαν σε αντιμικροβιακό διάλυμα με υγρή καλλιέργεια κυττάρων *S. cerevisiae*, ή μόνο με υπερκείμενο διάλυμα (χωρίς κύτταρα) *S. cerevisiae*, ή νερό βρύσης, σε σχέση με μη πλυμένα δείγματα φράουλας (μάρτυρας).

Πίνακας 9: Συντήρηση δειγμάτων φράουλας με ή χωρίς επεξεργασίες με αντιμικροβιακά διαλύματα *S. cerevisiae* για διάστημα ενάμισι μήνα στους 4°C και παρακολούθηση των αλλοιώσεων που υπέστησαν.

Περιέκτες με φράουλες	Ημέρα 0	Ημέρα 15	Ημέρα 45
Φράουλες χωρίς πλύσιμο (μάρτυρας)	Καμία αλλοίωση	1/10 φράουλες αλλοιώθηκαν	4/10 φράουλες αλλοιώθηκαν
Φράουλες πλυμένες με σκέτο νερό	Καμία αλλοίωση	4/10 φράουλες αλλοιώθηκαν	10/10 φράουλες αλλοιώθηκαν
Φράουλες πλυμένες με νερό και εμβαπτισμένες σε διάλυμα με ζωντανά κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> οίνου χωρίς φυγοκέντριση	Καμία αλλοίωση	0/10 φράουλες αλλοιώθηκαν	3/10 φράουλες αλλοιώθηκαν
Φράουλες πλυμένες με νερό και εμβαπτισμένες σε υπερκείμενο διάλυμα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> οίνου έπειτα από φυγοκέντριση	Καμία αλλοίωση	3/10 φράουλες αλλοιώθηκαν	10/10 φράουλες αλλοιώθηκαν

Μετά το πέρας δεκαπέντε ημερών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος στους περιέκτες με τις φράουλες για την παρατήρηση πιθανής αλλοίωσης. Οι περιέκτες ανοίχτηκαν και διαπιστώθηκε ότι, οι φράουλες που είχαν εμβαπτιστεί τόσο στο υπερκείμενο διάλυμα του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οίνου, που προέκυψε έπειτα από φυγοκέντριση, όσο και στο διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα χωρίς φυγοκέντριση, είχαν αναπτύξει μια μυρωδιά αλκοόλης, που οφείλεται στην αλκοολική ζύμωση του *Saccharomyces cerevisiae*. Η μυρωδιά ήταν πιο έντονη στον περιέκτη με τις φράουλες που είχαν εμβαπτιστεί στο διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα. Παρατηρήθηκαν ελάχιστες αλλοιώσεις στους περιέκτες με τις φράουλες. Την εντονότερη αλλοίωση παρουσίασαν οι περιέκτες με τις φράουλες που ήταν πλυμένες με σκέτο νερό και με τις φράουλες οι οποίες εμβαπτίστηκαν στο υπερκείμενο διάλυμα του *Saccharomyces cerevisiae*, έπειτα από φυγοκέντριση.

Έπειτα από επιπλέον τριάντα ημέρες στη συντήρηση, οι περιέκτες ξανά ανοίχτηκαν, όπου και διαπιστώθηκε ότι οι φράουλες είχαν αλλοιωθεί. Η μέθοδος αυτή είναι ποσοτική και το αποτέλεσμα της αλλοίωσης εκφράστηκε στις δέκα φράουλες, οι οποίες αποτελούσαν τον

κάθε περιέκτη. Με βάση την **Εικόνα 46**, παρατηρήθηκε ότι οι φράουλες με τη μικρότερη αλλοίωση ήταν εκείνες που είχαν εμβαπτιστεί στο διάλυμα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου με τα ζωντανά κύτταρα. Οι αμέσως καλύτερα διατηρημένες φράουλες ήταν εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας και δεν υπέστησαν καμία επιπλέον επεξεργασία, ωστόσο στον περιέκτη του παρατηρήθηκε και αρκετή ποσότητα υγρού διαλύματος που προήλθε από αυτές. Όσο για τις φράουλες που είχαν εμβαπτιστεί στο υπερκείμενο διάλυμα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου που προέκυψε έπειτα από φυγοκέντριση και για τις φράουλες που είχαν υποστεί μόνο πλύσιμο, παρατηρήθηκε πλήρης αλλοίωση καθώς είχαν αναπτυχθεί σε όλες εμφανείς μυκηλιακές υφές. Την 45^η μέρα, οι φράουλες από όλους τους περιέκτες είχαν πιο έντονο σκούρο χρώμα και μαλακή υφή. Στις φράουλες που είχαν αλλοιωθεί πλήρως, δεν ήταν εμφανές το χρώμα εξαιτίας των πυκνών μυκηλιακών υφών που είχαν αναπτυχθεί. Στον περιέκτη με τις φράουλες που λειτούργησε ως μάρτυρας, το χρώμα ήταν πιο κοντά στο χρώμα που είχαν αρχικά, ωστόσο η υφή ήταν αρκετά μαλακή και δεν φαινόταν τόσο συνεκτική. Τέλος, στον περιέκτη με τις φράουλες που είχαν εμβαπτιστεί στο διάλυμα με τα ζωντανά κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου, το χρώμα δεν μεταβλήθηκε ιδιαίτερα και η υφή σε κάποιες φράουλες ήταν ελαφρώς πιο μαλακή. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καθόλου υγρό στον περιέκτη και σε γενικές γραμμές, είχαν την καλύτερη και πιο αποδεκτή εικόνα σε σχέση με τις φράουλες από τους υπόλοιπους περιέκτες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας και έπειτα από τον σχολιασμό αυτών των αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι ο μικροοργανισμός με την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* άρτου και οίνου. Πιο συγκεκριμένα με τη χρήση ιζήματος ζωντανών κυττάρων από καλλιέργεια του *S. cerevisiae* άρτου και οίνου και με τη μέθοδο μέτρησης ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*, φάνηκε ότι υπήρξε πλήρης αναστολή του μύκητα-στόχου *Aspergillus flavus*, ενώ το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα των νεκρών κυττάρων δεν είχαν τόσο καλή, έως και καθόλου, ανασταλτική δράση σε καμία από τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Οι υπόλοιποι προστατευτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, είχαν μικρή έως και καθόλου ανασταλτική δράση στο μύκητα-στόχο με τη μέθοδο μέτρησης ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *Aspergillus flavus*, ενώ κανένας προστατευτικός μικροοργανισμός δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση σε καμία από τις υπόλοιπες δύο μεθόδους (μέτρηση ζώνης αναστολής σε στερεό υπόστρωμα και μέτρηση ζώνης αναστολής με διασταυρούμενη επίστρωση). Η ελάχιστη αυτή αντιμικροβιακή τους δράση παρατηρήθηκε στα τρυβλία με το ίζημα των ζωντανών κυττάρων. Έπειτα από όλες τις πειραματικές δοκιμές και με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, επιβεβαιώθηκε ότι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη διαπίστωση της αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα, ήταν η μέτρηση ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus* και το πιο αποτελεσματικό αντιμικροβιακό διάλυμα για αυτή την μέθοδο ήταν το ίζημα των ζωντανών κυττάρων του κάθε προστατευτικού μικροοργανισμού.

Σχετικά με το πείραμα που πραγματοποιήθηκε *in vivo* στις φράουλες, μετά το πέρας ενάμισι μήνα, διαπιστώθηκε ότι ο περιέκτης με τις φράουλες που πλύθηκαν πρώτα με νερό και έπειτα εμβαπίστηκαν στον περιέκτη με τα ζωντανά κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου, διατηρήθηκε καλύτερα σε σύγκριση με τους υπόλοιπους περιέκτες και δεν σημειώθηκε σημαντική αλλοίωση. Συνεπώς, το διάλυμα του *Saccharomyces cerevisiae* οίνου που περιείχε τα ζωντανά κύτταρα, είχε την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση.

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τόσο στην in vitro μέθοδο μέτρησης ζώνης εξάπλωσης του μυκηλίου του *A. flavus*, όσο και στην in vivo διαδικασία με τις φράουλες, ο πιο αποτελεσματικός προστατευτικός μικροοργανισμός που είχε την μέγιστη ανασταλτική δράση έναντι στην ανάπτυξη του μύκητα στόχου *Aspergillus flavus*, ήταν ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* άρτου και οίνου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Abbaszadeh, S., Tavakoli, R., Sharifzadeh, A., & Shokri, H. (2015). Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Journal de mycologie medicale*, 25(4), 263–267.
- Abdel-Kareem, M. M., Rasmey, A. M., & Zohri, A. A. (2019). The action mechanism and biocontrol potentiality of novel isolates of *Saccharomyces cerevisiae* against the aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Letters in applied microbiology*, 68(2), 104-111.
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raeisi, S. N., Ghorbani-HasanSaraei, A., & Nasiraii, L. R. (2020). Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 178, 50-58.
- Al-Emran, H. M., Moon, J. F., Miah, M. L., Meghla, N. S., Reuben, R. C., Uddin, M. J., Ibnat, H., Sarkar, S. L., Roy, P. C., Rahman, M. S., Alam, A. S. M. R. U., Islam, O. K., & Jahid, I. K. (2022). Genomic analysis and in vivo efficacy of *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to prevent hyperglycemia, hypercholesterolemia and gastrointestinal infections. *Scientific reports*, 12(1), 20429.
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49(1), 107-133.
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 182-188.
- Bastard, P., Hsiao, K. C., Zhang, Q., Choin, J., Best, E., Chen, J., ... Casanova, J. (2022). A loss-of-function IFNAR1 allele in Polynesia underlies severe viral diseases in homozygotes. *The Journal of Experimental Medicine*, 219.
- Berg, J. S., Ahmerkamp, S., Pjevac, P., Hausmann, B., Milucka, J., & Kuypers, M. (2022). How low can they go? Aerobic respiration by microorganisms under apparent anoxia. *FEMS Microbiology Reviews*, 46.

- Bhukya, B., Banoth, S., & Anthappagudem, A. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as potential probiotic: strategies for isolation and selection. In *Applied Microbiology and Bioengineering* (pp. 71-85). Academic Press.
- Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M. G., Caldeira, J., Arneborg, N., ... & Albergaria, H. (2017). Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 159-171.
- Breuer, U. and Harms, H. (2006), *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23: 415-437.
- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., & Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of food protection*, 70(9), 2148-2154.
- Capurso, Lucio MD (2019), Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review.
- Chau, N. T. T., Yen, N. N., Le, N. T. T., Ly, P., & Thien, L. (2023). Isolation, Selection, and Cultivation of Antagonistic Lactic Acid Bacteria Against Postharvest Pathogenic Fungi in Grapes. *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*.
- Chrissian, C., Camacho, E., Fu, M., Prados-Rosales, R. C., Chatterjee, S., Cordero, R. J. B., ... Stark, R. (2020). Melanin deposition in two *Cryptococcus* species depends on cell-wall composition and flexibility. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Cojkic, A., Hansson, I., Johannisson, A., Axner, E., & Morrell, J. (2023). Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. *Veterinary Research Communications*, 48, 39-48.
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., & Oliveira, C. A. F. D. (2013). Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food control*, 31(1), 80-83.
- Costa, N., Silveira, L. R., Amaral, E. P., Pereira, G. C., Paula, D., Vieira, É. N. R., ... & Ramos, A. M. (2023). Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, in vitro release behavior, storage stability and physicochemical properties. *Food Research International*, 164.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A

biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12), 1468-1481.

- Dagnas, S., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of food protection*, 76(3), 538-551.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria– Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21(4), 370-380.
- Dantigny, P., Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1-3), 187-196.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Radoi, F., Bensoussan, M., & Zwietering, M. (2005). Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 261-269.
- de Oliveira, A. P., dos Santos, G. A., Nomura, C. S., & Naozuka, J. (2019). Elemental chemical composition of products derived from kefir fermented milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 86-90.
- de Paiva, I. M., da Silva Steinberg, R., Lula, I. S., de Souza-Fagundes, E. M., de Oliveira Mendes, T., Bell, M. J. V., ... & Neumann, E. (2016). *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha glucans that are potentially suitable for food applications. *LWT-food science and technology*, 72, 390-398.
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J. C., & Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3237–3242.
- Dragomiretskiy, K., & Zosso, D. (2014). Variational Mode Decomposition. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 62, 531-544
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., ... & Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA journal*, 18(5), e06113.

- El Halouat, A., & Debevere, J. M. (1997). Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 41-48.
- Emwas, A., Szczepski, K., Al-Younis, I., Lachowicz, J., & Jaremko, M. (2022). Fluxomics - New Metabolomics Approaches to Monitor Metabolic Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International journal of food microbiology*, 33(1), 85-102.
- Frank J. Carr, Don Chill & Nino Maida (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28:4, 281-370, DOI: 10.1080/1040-840291046759
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 217–234.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González-Jaén, M. T., & Vázquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International journal of food microbiology*, 151(1), 113-118.
- Goczał, J., & Beutel, R. (2023). Beetle elytra: evolution, modifications and biological functions. *Biology Letters*, 19.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food protection*, 58(12), 1395-1404.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. *Journal of food protection*, 58(12), 1389-1394.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sala, D., Sanchis, V., & Marín, S. (2002). Combined effects of weak acid preservatives, pH, and water activity on growth of *Eurotium* species on a sponge cake. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 39-46.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2005). Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). *International journal of food microbiology*, 101(2), 161-168.

- Gwiazdowska, D., Czaczyk, K., Filipiak, M., & Gwiazdowski, R. (2008). Effects of *Propionibacterium* on the growth and mycotoxin production by some species of *Fusarium* and *Alternaria*. *Polish Journal of Microbiology*, 57(3), 205-212.
- Hassoun, A., Aït-Kaddour, A., Abu-Mahfouz, A., Rathod, N., Bader, F., Barba, F. J., ... & Regenstein, J. (2022). The fourth industrial revolution in the food industry—Part I: Industry 4.0 technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6), 1677-1692.
- Herdian, H., Istiqomah, L., Damayanti, E., Suryani, A. E., Anggraeni, A. S., Rosyada, N., & Susilowati, A. (2018). Isolation of cellulolytic lactic-acid bacteria from Mentok (*Anas moschata*) gastro-intestinal tract. *Tropical Animal Science Journal*, 41(3), 200-206.
- Rabah, H., Carmo, F. L. R. D., & Jan, G. (2017). Dairy propionibacteria: versatile probiotics. *Microorganisms*, 5(2), 24.
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin research*, 30, 71-78.
- Hua, S. S. T., Parfitt, D. E., Sarreal, S. B. L., Lee, B. G., & Wood, D. F. (2018). First report of an atypical new *Aspergillus parasiticus* isolates with nucleotide insertion in aflR gene resembling to *A. sojae*. *Mycotoxin research*, 34, 151-157.
- Huang, Y., Chapman, B., Wilson, M., & Hocking, A. D. (2009). Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 179-185.
- Hugenholtz, J., & Smid, E. J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, 13(5), 497-507.
- Hummels, K. R., Berry, S. P., Li, Z., Taguchi, A., Min, J. K., Walker, S., Marks, D., & Bernhardt, T. (2023). Coordination of bacterial cell wall and outer membrane biosynthesis. *Nature*, 615, 300-304.

- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods*, 10(12), 3131.
- Isawa, K., HoJo, K., YoDA, N., KAMiYAMA, T., Makino, S., Saito, M., ... & Sato, Y. (2002). Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(3), 679-681.
- Jonsmoen, U. L., Malyshev, D., Berg, R., Dahlberg, T., Aspholm, M., & Andersson, M. (2023). Endospore pili: Flexible, stiff, and sticky nanofibers. *Biophysical Journal*, 122, 2696-2706.
- Jurášková, D., Ribeiro, S., & Silva, C. C. G. (2022). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods*, 11.
- Kaur P. (1986). Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *The Journal of applied bacteriology*, 60(6), 513–516.
- Kendrick, B. (2017). *The fifth kingdom*. Hackett Publishing.
- Kim, S., Lee, S., Jo, I. H., Seo, J., Yoo, Y., & Kim, J. H. (2022). Influence of growth temperature on dielectric strength of Al₂O₃ thin films prepared via atomic layer deposition at low temperature. *Scientific Reports*, 12.
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8: 713-722.
- Konopelski, P., & Mogilnicka, I. (2022). Biological Effects of Indole-3-Propionic Acid, a Gut Microbiota-Derived Metabolite, and Its Precursor Tryptophan in Mammals' Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.
- Kostov, G., Denkova-Kostova, R., Shopska, V., Goranov, B., & Denkova, Z. (2022). Microbial Growth of *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Bulgaricus* B1 In a Complex Nutrient Medium (MRS-Broth). *European Conference on Modelling and Simulation*.
- Kullar, R., Goldstein, E., Johnson, S., & Mcfarland, L. (2023). *Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review*. *Microorganisms*, 11.
- Kumar, S., Mollo, A., Kahne, D., & Ruiz, N. (2022). The Bacterial Cell Wall: From Lipid II Flipping to Polymerization. *Chemical Reviews*.
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 315-322.

- Lambert, A. W., & Weinberg, R. (2021). Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 21, 325-338.
- Liaud, N., Giniés, C., Navarro, D., Fabre, N., Crapart, S., Gimbert, I. H., ... & Sigoillot, J. C. (2014). Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1, 1-10.
- Lima, J. R., Gondim, D. M., Oliveira, J. T. A., Oliveira, F. S., Gonçalves, L. R., & Viana, F. M. (2013). Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 58-64.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142.
- Mannaa, M., & Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240-254.
- Matthews, K. R., Kniel, K. E., & Montville, T. J. (2017). *Food microbiology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Medina-Córdova, N., Rosales-Mendoza, S., Hernández-Montiel, L. G., & Angulo, C. (2018). The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*, 121, 216-222.
- Miescher Schwenninger, S., & Meile, L. (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(2), 229-237.
- Møller, C. O. D. A., Freire, L., Rosim, R. E., Margalho, L. P., Balthazar, C. F., Franco, L. T., ... & Oliveira, C. A. F. D. (2021). Effect of lactic acid bacteria strains on the growth and aflatoxin production potential of *Aspergillus parasiticus*, and their ability to bind aflatoxin B1, ochratoxin A, and zearalenone in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 12, 655386.
- Motarjemi, Y. (2013). *Encyclopedia of food safety*. Academic Press.
- Navarrete, C., Estrada, M., & Martínez, J. L. (2022). *Debaryomyces hansenii*: an old acquaintance for a fresh start in the era of the green biotechnology. *World journal of microbiology & biotechnology*, 38(6), 99.
- Nikolić, M., Nikolić, A., Savić, I., Petrović, T., Stanković, S., Jauković, M., & Bagi, F. (2018). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates originated from wheat. *Genetika*, 50(1), 143-152.

- Nikolić, M., Savić, I., Nikolić, A., Jauković, M., Kandić, V., Stevanović, M., & Stanković, S. (2021). Toxigenic species *Aspergillus parasiticus* originating from Maize Kernels grown in Serbia. *Toxins*, 13(12), 847.
- Nwakanma, C., & Unachukwu, M. (2017). Molds. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 133-148). Woodhead Publishing.
- Palmer, J., & Foster, K. (2022). Bacterial species rarely work together. *Science*, 376, 581-582.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Perrone, G., & Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic fungi: Methods and protocols*, 33-49.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., & Pócsi, I. (2015). Mycotoxins–prevention and decontamination by yeasts. *Journal of basic microbiology*, 55(7), 805-818.
- Pfliegler, W.P., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2015), Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.*, 55: 805-818.
- Piotrowska, M., & Masek, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. *Toxins*, 7(4), 1151-1162.
- Piscon, B., Esposito, E. P., Fichtman, B., Samburski, G., Efremushkin, L., Amselem, S., ... Gal-Mor, O. (2023). The Effect of Outer Space and Other Environmental Cues on Bacterial Conjugation. *Microbiology Spectrum*.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.
- Plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp. (Black mold). In *Postharvest decay* (pp. 267-286). Academic Press.
- Plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp. (Black mold). In *Postharvest decay* (pp. 267-286). Academic Press.
- Podgórska-Kryszczuk I. (2023). Biological Control of *Aspergillus flavus* by the Yeast *Aureobasidium pullulans* In Vitro and on Tomato Fruit. *Plants* (Basel, Switzerland), 12(2), 236.
- Pohland, A. E., & Trucksess, M. W. (2001). Mycotoxin method evaluation: An introduction. *Mycotoxin protocols*, 3-10.

- Ramos-Moreno L, Ruiz-Pérez F, Rodríguez-Castro E, Ramos J. *Debaryomyces hansenii* Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*. 2021; 9(7):1512.
- Rodovalho, V.D., Rodrigues, D.L., Jan, G., Loir, Y.L., Azevedo, V.A., & Guédon, É. (2021). *Propionibacterium freudenreichii*: General Characteristics and Probiotic Traits. *Prebiotics and Probiotics - From Food to Health [Working Title]*.
- Rybczyńska-Tkaczyk, K., Grenda, A., Jakubczyk, A., Kiersnowska, K., & Bik-Małodzińska, M. (2023). Natural Compounds with Antimicrobial Properties in Cosmetics. *Pathogens*.
- Saleh, I., & Goktepe, I. (2019). The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and chemical toxicology*, 129, 301-311.
- Samanta, I. (2015). General Characteristics of Fungi. *Veterinary Mycology*, 3-8.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. M. (2005). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International journal of food microbiology*, 105(1), 35-52.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Frisvad, J. (2014). Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78(1), 141-173.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 426-435.
- Schwenninger, S. M., Meile, L., & Lacroix, C. (2011). Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation. In *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* (pp. 27-62). Woodhead Publishing.
- Senanayake, D., Torley, P., Chandrapala, J., & Terefe, N. S. (2023). Microbial Fermentation for Improving the Sensory, Nutritional and Functional Attributes of Legumes. *Fermentation*.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14.

- Sharma, S., Sharma, N., & Kaushal, N. (2023). Utilization of novel bacteriocin synthesized silver nanoparticles (AgNPs) for their application in antimicrobial packaging for preservation of tomato fruit. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7.
- Simkin, A., Kapoor, L., George, C., Doss, P., Hofmann, T. A., Lawson, T., & Ramamoorthy, S. (2022). The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta. *Photosynthesis Research*, 152.
- Singh, K., & Kumari, A. (2022). *Mycotoxins and Mycotoxicoses* (pp. 129-136). Singapore: Springer.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C., Bohlooly-Y, M., ... & Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341, 569-573.
- Sobanski, T., Suraweera, A., Burgess, J., Richard, I. R., Cheong, C. M., Dave, K., ... O'Byrne, K. J. (2023). The fructose-bisphosphate, Aldolase A (ALDOA), facilitates DNA-PKcs and ATM kinase activity to regulate DNA double-strand break repair.
- Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., & Archer, D. B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International journal of food microbiology*, 136(1), 37-43.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., & Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4322-4327.
- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International journal of food microbiology*, 95(1), 67-78.
- Sun, W.-Y., Xue, B., Liu, Y.-X., Zhang, R.-K., Li, R.-C., Xin, W., ... Fan, Z.-C. (2021). *Chlamydomonas* LZTFL1 mediates phototaxis via controlling BBosome recruitment to the basal body and its reassembly at the ciliary tip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D., ... Zorzet, A. (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO

priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318-327.

- Taheur, F. B., Fedhila, K., Chaieb, K., Kouidhi, B., Bakhrouf, A., & Abrunhosa, L. (2017). Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International journal of food microbiology*, 251, 1-7.
- Taheur, F. B., Mansour, C., & Chaieb, K. (2020). Inhibitory effect of kefir on *Aspergillus* growth and mycotoxin production. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 5, 1-8.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., & Gelderblom, W. C. (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3-9.
- Touliabah, H., El-sheekh, M., Ismail, M., & El-Kassas, H. (2022). A Review of Microalgae- and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. *Molecules*, 27.
- Troller, J. (2012). *Water activity and food*. Elsevier.
- Veld, J. H. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of Food microbiology*, 33(1), 1-18.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T. N., & Panneerselvam, P. (2011). Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biological Control*, 57(3), 215-221.
- Vytrásová, J., Příbáňová, P., & Marvanova, L. (2002). Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 91-96.
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
- Worrall, L., Majewski, D. D., & Strynadka, N. (2023). Structural Insights into Type III Secretion Systems of the Bacterial Flagellum and Injectisome. *Annual Review of Microbiology*, 77, 669-698.

- Yang, X., Lan, W., & Sun, X. (2023). Antibacterial and antioxidant properties of phenolic acid grafted chitosan and its application in food preservation: A review. *Food Chemistry*, 428.
- Zhang, Y., Carter, J. W., Lervik, A., Brooks, N., Seddon, J., & Bresme, F. (2016). Structural organization of sterol molecules in DPPC bilayers: a coarse-grained molecular dynamics investigation. *Soft Matter*, 12(7), 2108-17.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G., Gänzle, M., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Rastall, R., Díez-Municio, M., Forssten, S., Hamaker, B., Meynier, A., Moreno, F. J., ... & Wiese, M. (2022). Structure and function of non-digestible carbohydrates in the gut microbiome. *Beneficial microbes*, 13(2), 95-168.
- Raza, T., Qadir, M. F., Khan, K. S., Eash, N. S., Yousuf, M., Chatterjee, S., ... & Oetting, J. N. (2023). Unrevealing the potential of microbes in decomposition of organic matter and release of carbon in the ecosystem. *Journal of Environmental Management*, 344, 118529.
- Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S. (2016). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), S6-S10.
- Abdulgawad, I. I. (2016). Fermentation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) wastes using *Lactobacillus plantarum* for the production of lactic acid and fertilizer. *Int J Waste Resour*, 6(253), 2.
- Izuddin, W. I., Loh, T., Foo, H., Samsudin, A., & Humam, A. M. (2019). Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Scientific Reports*, 9.
- Franz, C. M., Endo, A., Abriouel, H., Reenen, C. A. V., Gálvez, A., & Dicks, L. M. (2014). The genus *Pediococcus*. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*, 359-376.

- Harju, J., van Teeseling, M. C., & Broedersz, C. P. (2024). Loop-extruders alter bacterial chromosome topology to direct entropic forces for segregation. *Nature Communications*, 15(1), 4618.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Τσουμαχίδου Σ., (2016). Διδακτορική Διατριβή: Αξιοποίηση φωτοκαταλυτικών μεθόδων για επεξεργασία και επαναχρησιμοποίηση γκρίζου νερού, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας
- Αθηνά Θ. Μαυρίδου et. al. (2012). Γενική Μικροβιολογία, Broken Hill Publishers
- Γιαβάσης, Ι. (2020). Παρουσιάσεις μαθήματος Γενική Μικροβιολογία: Μυκητολογία, 153-154, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής.
- Γιαλλελή Α. Ι. (2015). Διδακτορική Διατριβή: Ψυχρή παστερίωση υγρών τροφίμων με μικρο - και νανο- σωληνωτή κυτταρίνη, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας
- Γ. Αγγελής (2017) Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία, UNIBOOKS
- Ντάβου, Σ. (2021). Βιογεωχημικές διεργασίες παράκτιων υδατικών συστημάτων.
- Παπαδημητρίου, Μ. (2021). Μεταπτυχιακή Εργασία: Επίδραση γενότυπου και αζωτούχου λίπανσης στη συσσώρευση και ανακατανομή αζώτου και ξηράς ουσίας στο μαλακό σιτάρι, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης. Σχολή Επιστημών Γεωπονίας και Δασολογίας. Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης
- Παυλοπούλου, Χ. (2021). Πτυχιακή Εργασία: Οι Μύκητες *Aspergillus* και *Penicillium* στις Αλλοιώσεις Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
- Λάζου Π. (2021). Διερεύνηση του φάσματος των πολυμορφισμών των μεταφορέων πουρινών-πυριμιδινών σε συμβιωτικά και παθογόνα βακτήρια, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής

Ιστοσελίδες

- <https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/lactobacillus/lactobacillus-rhamnosus/lactobacillus-rhamnosus-igg>
- <https://www.sciencephoto.com/media/886814/view/lactobacillus-rhamnosus-bacteria-sem>
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Fungus>