



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Ελένη Α. Ιακωβάκη

*Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε
διάφορες κατηγορίες γάλακτος με τη χρήση
μοριακών τεχνικών*

Λάρισα: Σεπτέμβριος 2017

Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορες κατηγορίες γάλακτος με τη χρήση μοριακών τεχνικών

Detection of pathogenic microorganisms in different classes of milk using molecular techniques

Τριμελής Εξεταστικής Επιτροπή

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6-7
ABSTRACT	8
Ευχαριστίες.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	
Γενικά για το γάλα.	
1.1 Εισαγωγή	10
1.2 Γενικές παρατηρήσεις για το γάλα.....	11-13
1.4 Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος.....	14-15
Κεφάλαιο 2 ^ο	
Συστατικά του γάλακτος	
2.1 Κύρια συστατικά του γάλακτος.....	15-17
2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του γάλακτος	17-18
Κεφάλαιο 3 ^ο	
Μικροβιολογία – Μικροχλωρίδα γάλακτος	
3.1 Πηγές μόλυνσης του γάλακτος.....	19-21
3.2 Η μικροχλωρίδα του γάλακτος.....	21-26
3.3 Οι πηγές των μικροοργανισμών στο γάλα	26-28
Κεφάλαιο 4 ^ο	
Παθογόνο μικροβιακό φορτίο του γάλακτος	
4.1 Βακτήρια παθογόνα για τον άνθρωπο.....	28-31
Κεφάλαιο 5 ^ο	
Η Μικροβιολογία και η βιοχημεία του γάλακτος	
5.1 Όρια μικροοργανισμών στο γάλα	31-33
5.2 Ανθυγιεινό – ακατάλληλο γάλα	33-34

Κεφάλαιο 6°

Ποιοτικός έλεγχος - Διαδικασία παραγωγής

6.1 Ποιοτικός έλεγχος	34-35
6.2 Διαδικασία παραγωγής	35-37
6.3 Ποιοτικές αναλύσεις	37-38

Κεφάλαιο 7°

Μοριακοί δείκτες.....	39-40
7.1 Γονίδιο 16S rRNA.....	40-41
7.2 Σκοπός της εργασίας.....	41-42

Κεφάλαιο 8°

Υλικά και μέθοδοι

8.1 Δείγματα.....	42
8.2 Απομόνωση DNA.....	42-43
8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	43-46
8.4 PCR και αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA.....	47
8.5 Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR.....	47
8.6 Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχηση.....	47
8.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	47-48

Κεφάλαιο 9°

Αποτελέσματα

9.1 Απομόνωση DNA	48-49
9.2 Ποσοστά βακτηριακών στελεχών στο παστεριωμένο γάλα.....	49
9.3 Ποσοστά βακτηριακών στελεχών στο ξινόγαλα	51
9.4 Ποσοστά βακτηριακών στελεχών στο μη παστεριωμένο γάλα.....	53
9.5 Γενικές πληροφορίες για τα βακτήρια	55-57
10. Συζήτηση.....	61-65
Παράρτημα πινάκων.....	66-71

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72-79
--------------------	-------

Σύνοψη πινάκων:

Πίνακας (1): Μέση σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών (g/100g).....	11
Πίνακας (2): Όρια μικροοργανισμών στο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα....	32-33
Πίνακας (3): Συγκεντρώσεις αγαρόζης για τον διαχωρισμό διαφόρων μεγεθών DNA.....	44
Πίνακας (4): Αριθμός βακτηριακών στελεχών που ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος, ξινόγαλου και μη παστεριωμένου γάλακτος.....	66
Πίνακας (5): Αριθμός συνολικών αλληλουχιών σε μη παστεριωμένο γάλα, παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα.....	67
Πίνακας (6): Αριθμός reads ανά εκκινητή σε παστεριωμένο γάλα.....	68
Πίνακας (7): Αριθμός reads ανά εκκινητή σε ξινόγαλα.....	69
Πίνακας (8): Αριθμός reads ανά εκκινητή σε μη παστεριωμένο γάλα.....	70
Πίνακας (9): Βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο γένους στο μη παστεριωμένο γάλα.....	71

Σύνοψη διαγραμμάτων:

Διάγραμμα (1): Οι αναλογίες βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο παστεριωμένο γάλα.....	50
Διάγραμμα (2): Οι αναλογίες βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο ξινόγαλα.....	52
Διάγραμμα (3): Οι αναλογίες βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο μη παστεριωμένο γάλα.....	54

Σύνοψη εικόνων:

Εικόνα (4): Συσκευή ηλεκτροφόρησης.....	44
Εικόνα (5): Συσκευή υπεριώδους φωτός.....	44
Εικόνα (6): Προετοιμασία εκμαγείου.....	45
Εικόνα (7): Απομόνωση DNA από δείγματα γάλακτος.....	48

Σύνοψη γραφημάτων:

Γράφημα (1) : Απεικόνιση βακτηριακής σύστασης σε επίπεδο γένους στο παστεριωμένο γάλα, σε μη παστεριωμένο γάλα και στο ξινόγαλα.....	58
Γράφημα (2) : Απεικόνιση βακτηριακής σύστασης σε επίπεδο είδους στο παστεριωμένο γάλα, σε μη παστεριωμένο γάλα και στο ξινόγαλα.....	60

Απόδοση συντομογραφιών και αγγλικών όρων

bp: base pair: ζεύγη βάσεων

DNA: DeoxyriboNucleic Acid: Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

FAO: Food and Agriculture Organization: Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας

Min: minute: λεπτά της ώρας

PCR : Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA: Τυχαίως πολλαπλασιαζόμενα πολυμορφικά τμήματα DNA

Sec: second: δευτερόλεπτα της ώρας

SSR: Simple Sequence Repeats: Απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

USDA: United States Department of Agriculture: Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α

CLA: Conjugated Linoleic Acid: συζευγμένο λινελαϊκό οξύ

Κ.Τ.Π.: Κώδικας Τροφίμων και Ποτών

rRNA: Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ

primer: Εκκινητής

FDA: Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α.: Food and Drug Administration (USA)

U.H.T.: Ultra High Temperature:Υπερ Υψηλή θέρμανση

O.M.X.: Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

ΕΣΥΔ: Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης

LTLT: Low Temperature Long time: Χαμηλή θερμοκρασία μεγάλης διάρκειας

HTST: High Temperature short time: Υψηλή θερμοκρασία μικρής διάρκειας

ESL: Extended Self Life: Παρατεταμένη διάρκεια ζωής

ΣΑΜ: Συνολικός αριθμός μικροβίων

cfu: colony forming unit: μονάδα σχηματισμού αποικιών

ISO: International Organization for Standardization: Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης.

Περίληψη

Το γάλα, η πολύτιμη αυτή τροφή της φύσης, εφοδιάζει τον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, περισσότερο μάλιστα από οποιαδήποτε άλλη τροφή. Για τον λόγο αυτό το γάλα θεωρείται η πιο πλούσια τροφή της φύσης.

Αν εξαιρέσουμε έναν μικρό αριθμό ατόμων τα οποία εκδηλώνουν αλλεργικά συμπτώματα ή ευαισθησία στην κατανάλωση του γάλακτος, ιδιαίτερα του αγελαδινού, το γάλα πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα του καθημερινού διαιτολογίου μας, ιδιαίτερα των παιδιών και των ηλικιωμένων. Αποτελεί την πηγή εφοδιασμού του ανθρώπου με πολλά ουσιώδη συστατικά όπως είναι το ασβέστιο, ο φώσφορος, η βιταμίνη D, η βιταμίνη B2 και, σε μικρότερο βαθμό, στην κάλυψη των ημερησίων αναγκών σε βιταμίνες A και B1.κ.α. Εφοδιάζει επίσης τον οργανισμό μας με πολύτιμες πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και με πολλά βασικά αμινοξέα.

Ωστόσο, επειδή κατά τη διαδικασία της παραγωγής, της μεταφοράς και της συντήρησης του γάλακτος εισβάλλουν σε αυτό διάφοροι μικροοργανισμοί, πολλοί από τους οποίους ενδέχεται να είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο, το νωπό γάλα, προτού δοθεί στην κατανάλωση, πρέπει να υποστεί θερμική επεξεργασία για να καταστεί ακίνδυνο στους καταναλωτές.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές, αξιοποιώντας έναν μοριακό δείκτη, με στόχο την γενετική ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος, παστεριωμένου γάλακτος και ξινογάλακτος. Το γονίδιο 16S rRNA θεωρείται από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Στα τρία δείγματα γάλακτος έγινε ενίσχυση και αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR. Καταληκτικά, επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός των βακτηριακών στελεχών, σε επίπεδο γένους και είδους, που συμμετείχαν στη μικροβιακή χλωρίδα στα τρία δείγματα γάλακτος. Τα αποτελέσματα αλληλούχησης των γονιδιωμάτων έδειξαν πως τα βακτήρια στο παστεριωμένο γάλα ανήκουν κατά πλειοψηφία στα γένη *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus* και στα είδη *Streptococcus thermophilus*, *Pseudomonas hibiscola* και *Lactococcus lactis* αντίστοιχα. Στο ξινόγαλα φαίνεται να αποτελούνται κατά πλειοψηφία από βακτήρια του γένους *Streptococcus* και *Lactococcus* και του είδους *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus chungangensis* και *Lactococcus mesenteroides* αντίστοιχα. Στο μη παστεριωμένο γάλα ανιχνεύθηκαν τα γένη *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Sphingomonas*, *Enhydrobacter*, *Lactococcus* και εννέα γένη σε μικρότερα ποσοστά. Τα κυρίαρχα είδη βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν στο μη παστεριωμένο γάλα είναι *Pseudomonas hibiscola*, *Streptococcus thermophilus*,

Propionibacterium acnes, *Methylobacterium jeotgali*, *Acinetobacter johnsonii*, *Lactococcus curvatus*, *Moraxella osloensis*, *Sphingomonas echinoides*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Lactococcus lactis* και 21 είδη σε μικρότερα ποσοστά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο μη παστεριωμένο γάλα ανιχνεύθηκε πληθώρα βακτηριακών στελεχών εκ των οποίων μερικά είναι παθογόνα ενώ στο παστεριωμένο γάλα και στο ξινόγαλα ανιχνεύθηκαν αρκετά λιγότερα βακτηριακά στελέχη τα οποία είναι ωφέλιμα. Επιλεγμένα στελέχη της εργασίας αυτής θα μπορούσαν να μελετηθούν για τη χρήση τους. Εν κατακλείδι, το γονίδιο 16S rRNA αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση με PCR των βακτηρίων.

ABSTRACT

Milk, this precious food of nature, supplies the body of humans and animals with essential nutrients, more than any other food. For this reason, milk is considered to be the richest food of nature.

If we exclude a small number of people who exhibit allergic symptoms or sensitivity to milk consumption, especially cow's milk, milk should be an integral part of our daily diet, especially for children and the elderly. Milk constitutes the source of human supply with many essential ingredients such as calcium, phosphorus, vitamin D, vitamin B2 and others. It also supplies our organism with valuable proteins of high biological value and many basic amino acids. It also contributes, to a lesser extent, to human daily needs in vitamins A and B1.

However, as milk is produced, transported and maintained, various micro-organisms invade, many of which may be pathogenic to humans, raw milk, before being consumed, must be heat-treated to make it harmless.

In the present work, using molecular techniques and a molecular marker, the genetic identification of bacterial strains isolated from samples of unpasteurized milk, pasteurized milk and sour milk was achieved. The 16S rRNA gene is considered to be the most widely used marker for the identification of bacteria. In the three milk samples amplification and sequencing of the 16S rRNA gene was performed by Multiplex PCR.

Finally, the characterization of bacterial strains at the genus and species level that were present in the microbial flora in the three milk samples was achieved. The genomic sequencing results showed that bacteria in pasteurized milk appear to be predominantly of the genus *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus* and of the species *Streptococcus thermophilus*, *Pseudomonas hibiscola* and *Lactococcus lactis*, respectively.

The sour milk seems to contain mostly bacteria of the genus *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Streptococcus thermophilus* and of the species *Lactococcus lactis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus mesenteroides*, respectively. In non-pasteurized milk the genera *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Sphingomonas*, *Enhydrobacter*, *Lactococcus* and nine more genera were detected in smaller percentages. The dominant species of bacteria detected in non-pasteurized milk are *Pseudomonas hibiscola*, *Streptococcus thermophilus*, *Propionibacterium acnes*, *Methylobacterium jeotgali*, *Acinetobacter johnsonii*, *Lactococcus curvatus*, *Moraxella osloensis*, *Sphingomonas echinoides*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Lactococcus lactis* and twenty species at lower rates. These results lead to the conclusion that a number of bacterial strains, some of which are pathogenic, were detected in non-pasteurized milk, while some beneficial bacterial strains were found in pasteurized milk and sour milk. Selected parts of this paper could be studied for

their use. In conclusion, the 16S rRNA gene was a useful marker for the molecular identification of bacteria.

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας δε θα ήταν εφικτή χωρίς την βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια Σαραφίδου Θεολογία, τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μούτου Αικατερίνη για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, με ένα τόσο σημερινό και ενδιαφέρον θέμα, που άπτεται άμεσα και με το επαγγελματικό μου πεδίο.

Επίσης, την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Σαραφίδου Θεολογία για την υπομονή, την επιστημονική καθοδήγησή της, και τις υποδείξεις κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού.

Ευχαριστώ τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια αλλά και για την ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας στο χώρο του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τον Τσιπουρλιάνο Ανδρέα κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού, καθώς εργαστήκαμε στο πειραματικό μέρος ως ομάδα και καταφέραμε να περατώσουμε αυτό που ξεκινήσαμε.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική στήριξη, για την ατέλειωτη υπομονή και επιμονή με την οποία με περιέβαλλαν σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Λάρισα Σεπτέμβριος 2017

Ελένη Α. Ιακωβάκη

Κεφάλαιο 1^ο

Γενικά για το γάλα

1.1 Εισαγωγή

Το γάλα αποτελεί απαραίτητο στοιχείο της διατροφής του ανθρώπου τόσο στα πρώτα στάδια της ζωής του, όσο και στα επόμενα χρόνια της ζωής του. Επειδή περιέχει λίπος και λακτόζη αποτελεί πλήρη, απλή, φυσική τροφή. Δίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό ενέργεια, πρωτεΐνες και ανόργανα άλατα, τα οποία συνεισφέρουν στα δομικά συστατικά του και περιέχει αρκετή ποσότητα βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την πραγματοποίηση των απαραίτητων βιοχημικών διεργασιών του [1], [120].

Στην Παλαιά Διαθήκη έχουμε πολλές αναφορές για το γάλα. Τα πρώτα ζώα που εξημέρωσε ο άνθρωπος ήταν τα βοοειδή μεταξύ 10.000 με 6000 π.Χ. Στην Ευρώπη τον 13ο αιώνα μ.Χ. κουβαλούσαν γάλα σε ξερή μορφή οι στρατιώτες του Τζέγκις Χάν(Μογγόλου Αυτοκράτορα)ως μεγάλο μέρος της διατροφής τους. Οι πρώτοι άποικοι στο Νέο Κόσμο δεν πήραν μαζί τους βοοειδή, με αποτέλεσμα το ποσοστό θανάτων να είναι πολύ μεγάλο κυρίως από την έλλειψη γάλακτος.

Από τότε οι άποικοι διόρθωσαν το λάθος τους και ακολουθούσαν πάντοτε από αγελάδες. Μέχρι το 1850 οι άνθρωποι γνώριζαν πως το γάλα περιέχει πρωτεΐνες, ασβέστιο, λίπος και σάκχαρα. Οι επιστάμενες επιστημονικές έρευνες που έγιναν τα τελευταία 150 χρόνια αποκάλυψαν μεγάλο αριθμό συστατικών του γάλακτος όπως πρωτεΐνες,ένζυμα,βιταμίνες και μέταλλα [120].

Τα θηλαστικά στην αρχή της ζωής τους χρησιμοποιούν το γάλα τους για την τροφή των νεογέννητων. Ο άνθρωπος σε όλη την διάρκεια της ζωής του χρησιμοποιεί και το γάλα άλλων θηλαστικών, όπως αγελάδων που είναι τα κύρια γαλακτοπαραγωγικά ζώα σήμερα, αλλά και προβάτων, αιγών, βουβαλιών κ.λπ. Το αγελαδινό πλήρες γάλα περιέχει κατά μέσο όρο 3,7% λίπος, 4,7% λακτόζη, 3,2% πρωτεΐνες(καζεΐνη και πρωτεΐνες του ορού)και 0,7% ανόργανα στοιχεία(κυρίως ασβέστιο και φώσφορο). Τα συστατικά αυτά κυρίως προσδιορίζουν τη θρεπτική του αξία. Είναι πολύ καλή πηγή ορισμένων βιταμινών, ιχνοστοιχείων και ενζύμων.

Αρκετές μελέτες μας έδειξαν, ότι το μεγαλύτερο μέρος της βιολογικής αξίας του γάλακτος οφείλεται στις πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν πηγή πεπτιδίων και παρουσιάζουν δράση κατά της υπέρτασης, κατά της θρόμβωσης, κ.ά. Το λίπος του γάλακτος περιέχει συστατικά, όπως το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA), τα οποία προστατεύουν έναντι χρόνιων ασθενειών [1], [120].

1.2 Γενικές παρατηρήσεις για το γάλα

Γάλα, σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών(Κ.Τ.Π. 1998), είναι το απαλλαγμένο πρωτογάλακτος προϊόν, που προέρχεται από την ολοσχερή και χωρίς διακοπή άμελη γαλακτοφόρου ζώου, που είναι υγιές, διαβιώνει και διατρέφεται κάτω από υγιεινούς όρους και δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης [2].

Σύμφωνα με το FAO/WHO (1973):

Γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται μετά από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε και προορίζεται για κατανάλωση σε υγρή μορφή ή για περαιτέρω επεξεργασία [3].

Με τον όρο <<γάλα>> απλώς, χωρίς την συνοδεία επιθετικού προσδιορισμού, νοείται αποκλειστικά το γάλα το οποίο προέρχεται από αγελάδες, είναι νωπό, είναι πλήρες, δεν είναι αφυδατωμένο ή συμπυκνωμένο και δεν περιέχει άλλες ύλες που έχουν προστεθεί απ' έξω [4].

Τα διάφορα είδη γάλακτος διαφέρουν στη σύστασή τους. Τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος είναι το νερό, το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και τα διάφορα άλατα κ.α. [5]. Το γάλα εκτός από αγελάδα μπορεί να προέρχεται και από προβατίνα, κατσίκια κ.α.[4]. Στον Πίνακα(1) φαίνεται η μέση σύσταση των διαφόρων ειδών γάλακτος.

Πίνακας(1): Μέση σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών (g/100g)

(ΜΑΝΤΗΣ 2001)[7]

Είδος γάλακτος	Νερό	Λίπος	Πρωτεΐνες	Λακτόζη	Τέφρα	ΣΥΑΛ	Ολικά στερεά
Γίδινο	87,00	4,25	3,52	4,27	0,86	8,75	13,00
Αγελαδινό	87,2	3,70	3,50	4,90	0,70	9,10	12,80
Πρόβειο	80,71	7,90	5,23	4,81	0,90	11,39	19,29
Ανθρώπινο	87,43	3,75	1,63	6,98	0,21	8,82	12,57

Οι επιμέρους κατηγορίες γαλακτοκομικών προϊόντων καθορίζονται από τις διατάξεις του ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, καθώς και οι επιτρεπτές συνθήκες παραγωγής, συντήρησης και συσκευασίας. Οι βασικές κατηγορίες γάλακτος είναι:

Νωπό Γάλα:

- Το γάλα το οποίο παράγεται από την έκκριση του μαστού εκτρεφόμενων ζώων και το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέρα από τους 40°C. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει το γάλα που προορίζεται για κατανάλωση, το οποίο δεν έχει υποστεί άλλη επεξεργασία εκτός από διήθηση, ψύξη και ομογενοποίηση [2].

Παστεριωμένο Γάλα:

- Το γάλα που έχει υποβληθεί σε θέρμανση, η οποία περιλαμβάνει την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 71,7°C για 15 δευτερόλεπτα ή ισοδύναμο συνδυασμό με το ίδιο αποτέλεσμα) προς καταστροφή του μεγαλύτερου μέρους των παθογόνων μικροοργανισμών [2].

Γάλα U.H.T.:

- Το γάλα που πρέπει να έχει παραχθεί με συνεχή θέρμανση νωπού γάλακτος, για σύντομο χρονικό διάστημα σε υψηλή θερμοκρασία (τουλάχιστον στους 135°C επί τουλάχιστον ένα δευτερόλεπτο), με σκοπό την πλήρη καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών [2].

Γάλα Υψηλής Παστερίωσης:

- Το γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία με έκθεση στους 85°C-127°C για μικρό χρονικό διάστημα. Θανατώνονται όλοι οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί αλλά όχι τα σπόρια, ενώ μετουσιώνονται τα περισσότερα ένζυμα του γάλακτος. Συντηρείται στο ψυγείο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το παστεριωμένο [2].

Γάλα Κατάψυξης:

- Το νωπό γάλα, το οποίο έγινε διατηρήσιμο με αναγνωρισμένη μέθοδο ταχείας κατάψυξης και στη συνέχεια διατηρείται σε θερμοκρασία κατώτερη από -15°C. Το γάλα αυτό διατίθεται στην κατανάλωση μετά από πλήρη απόψυξη [2].

Οξύγαλα ή κοινώς ξινόγαλα

- Είναι το γαλακτομικό προϊόν ζελατινώδους υφής, περιεκτικότητας σε λιπαρά 1.8% το οποίο έχει ευχάριστη όξινη γεύση οφειλόμενη στο γαλακτικό οξύ(0,75%)που προήλθε από οξυγαλακτική ζύμωση του γαλακτοσακχάρου ημιαποβουτυρωμένου αγελαδινού γάλακτος μετά από παστερίωσή του και προσθήκη σ'αυτό καθαρής καλλιέργειας μικροβίων οξυγαλακτικής ζύμωσης(Lactobacillus bulgaricus,κ.α.)και επώαση του μίγματος γάλατος-καλλιέργειας στους -26° C περίπου επί 13 h περίπου [6].

Γάλα Αποβουτυρωμένο:

- Το γάλα που προκύπτει από τη πλήρη αφαίρεση του λίπους από το νωπό γάλα με μηχανική επεξεργασία και χωρίς καμιά προσθήκη και το οποίο περιέχει λιπαρά μέχρι 0,2% [6].

Γάλα Ημιαποβουτυρωμένο:

- Το γάλα από το οποίο έχει αφαιρεθεί μερικώς το λίπος με μηχανικό τρόπο από το νωπό γάλα, ώστε η περιεκτικότητα σε λιπαρά να είναι μεταξύ 1,5%-1,8% [6].

Γάλα Μερικώς Αποβουτυρωμένο:

- Το γάλα που προκύπτει μετά από μερική αφαίρεση του λίπους από το νωπό γάλα με μηχανική επεξεργασία αλλά με λιπαρά περισσότερο του 1,8%, η οποία θα πρέπει να αναγράφεται στην συσκευασία [6].

Γάλα εβαπορέ ή μερικώς συμπυκνωμένο ή γάλα αφυδατωμένο:

- Το γάλα που προκύπτει μετά από τη συμπύκνωση του νωπού γάλακτος δηλαδή αφαίρεση του νερού, μέχρι του μισού του αρχικού όγκου και πρέπει να περιέχει % λιπαρά διπλάσια του αντίστοιχου νωπού γάλατος [6].

Γάλα συμπυκνωμένο:

- Το γάλα που προκύπτει από τη συμπύκνωση του νωπού γάλατος, μέχρι του ενός τρίτου του αρχικού όγκου και πρέπει να περιέχει 8% λιπαρά τουλάχιστον [6].

Γάλα σακχαρούχο:

- Το γάλα στο οποίο έχει προστεθεί καλαμοσάκχαρο ή δεξτρόζη ή και τα δύο και είναι αφυδατωμένο ή συμπυκνωμένο ή ξηρό γάλα [6].

1.3 Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος

Οι κυριότερες φυσικές ιδιότητες του γάλακτος, είναι οι εξής [8], [9]:

Οσμή και γεύση: Λόγω της λακτόζης η οσμή είναι ιδιαίτερη με γεύση ευχάριστη, ελαφρά υπόγλυκη. Όταν το γάλα παραμείνει χωρίς ψύξη με την πάροδο του χρόνου αποκτά όξινη γεύση που οφείλεται στα προϊόντα διασπάσεως της λακτόζης και κυρίως στο γαλακτικό οξύ. Τη διάσπαση προκαλούν τα μικρόβια που περιέχει [10].

Χρώμα: Ανάλογα με το είδος του ζώου, τη φυλή και την ύπαρξη χρωστικών (καροτίνη, ριβοφλαβίνη, και άλλα) το γάλα έχει λευκοκίτρινο χρωματισμό ή κυανόλευκο. Το λευκό χρώμα στο γάλα είναι αποτέλεσμα της διάθλασης του φωτός που προκαλείται από τα λιποσφαιρίδια και τα κolloειδή τεμάχια του φωσφοροκαζεϊνικού ασβεστίου που περιέχει, ενώ οι λιποδιαλυτές χρωστικές, καροτίνη και ξανθοφύλλη δίνουν το κίτρινο χρώμα στο γάλα [10].

Οξύτητα: Το γάλα όταν αρμέγεται είναι ελαφρά όξινο γεγονός που οφείλεται στο CO₂ που περιέχει και στα συστατικά του καζεΐνη, αλβουμίνη, φωσφορικές και κιτρικές ενώσεις. Η οξύτητα αυτή καλείται αρχική οξύτητα του γάλακτος. Στο στάδιο αυτό το κανονικό γάλα δεν περιέχει περισσότερο από 0,002% γαλακτικό οξύ. Το pH κανονικού φρέσκου γάλακτος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 6,60 και 6,75. Τιμές μεγαλύτερες του 6,75 υποδηλώνουν πιθανή προσβολή του ζώου από μαστίτιδα ενώ μικρότερες του 6,5 δείχνουν αλλοίωση του γάλακτος από βακτήρια ή προσθήκη πρωτογάλακτος. Η οξύτητα αυτή με την πάροδο του χρόνου μεγαλώνει λόγω ζύμωσης της λακτόζης και παραγωγής γαλακτικού και άλλων οργανικών οξέων [11].

Ρυθμιστική ικανότητα: Το φωσφορικό και το κιτρικό ασβέστιο που περιέχει το γάλα του προσδίδουν ρυθμιστικές ικανότητες. Λόγω απώλειας του CO₂, η θέρμανση του γάλακτος προκαλεί μικρή άνοδο του pH. Η ρυθμιστική ικανότητα του μειώνεται, λόγω καθίζησης του καζεϊνικού ασβεστίου, με παράλληλη απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου. Η παραγωγή μυρμηκικού και οξικού οξέος από τη μερική διάσπαση της λακτόζης προκαλεί μείωση του pH, σε θέρμανση όμως πάνω από τους 100^o C.

Δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh): Το γάλα που έχει αρμεχτεί πρόσφατα έχει θετικό Eh που κυμαίνεται από +200 και +300 mVolts και αυτό οφείλεται στο διαλυμένο οξυγόνο που περιέχει. Έχουμε αρνητικό Eh όταν η άμελη γίνει σε συνθήκες κενού

και θετικό E_h όταν το δείγμα εκτεθεί στον αέρα. Η θέρμανση προκαλεί πτώση του E_h, γεγονός που οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης του O₂ και στην μετουσίωση ορισμένων πρωτεϊνών και ιδιαίτερα της β-γαλακτοσφαιρίνης [10].

Πυκνότητα – Ειδικό βάρος: Η πυκνότητα του γάλακτος μεταβάλλεται με τη χρονική στιγμή της αμέλξεως. Στο νωπό γάλα η πυκνότητα είναι χαμηλή αμέσως μετά την άμελη έπειτα αυξάνει και παραμένει σταθερή μερικές ώρες μετά την άμελη. Εξαιτίας αυτού επικράτησε το ειδικό βάρος(ε.β.)του γάλακτος να μετρείται στη θερμοκρασία των 15° ή 20° C [11]. Το ειδικό βάρος των επιμέρους συστατικών του γάλακτος διαμορφώνουν το ειδικό βάρος του γάλακτος. Το ειδικό βάρος του γάλακτος αγελάδας κυμαίνεται από 1,028-1,033. Η αύξηση ή μείωση του ειδικού βάρους κατά 0,0035 επέρχεται από την αύξηση ή μείωση του ΣΥΑΛ(στερεού υπολείμματος άνευ λίπους) κατά 10%.

Ιξώδες: Η αντίσταση που προβάλλει το γάλα κατά τη ροή του καλείται ιξώδες και επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση και τη διασπορά των κολλοειδών συστατικών του(μικκυλίων καζεΐνης), καθώς και από τον αριθμό των λιποσφαιρίων. Η αύξηση του ιξώδες επέρχεται με την ομογενοποίηση λόγω της αύξησης του αριθμού των λιποσφαιρίων. Η θερμοκρασία επηρεάζει το ιξώδες και είναι μεγαλύτερο σε χαμηλές θερμοκρασίες [10].

Κεφάλαιο 2°

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

2.1 Κύρια συστατικά του γάλακτος

Το γάλα είναι σημαντική πηγή πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας, βιταμινών του συμπλέγματος Β και ανόργανων συστατικών(ασβεστίου, ιωδίου και φωσφόρου).

Τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος είναι τα εξής [13]:

Λακτόζη: Είναι το κυριότερο και το χαρακτηριστικότερο σάκχαρο του γάλακτος. Είναι πηγή ενέργειας. Στη φύση το βρίσκουμε σε αξιόλογα ποσά μόνο στο γάλα. Η περιεκτικότητα της στο γάλα της αγελάδας κυμαίνεται από 2,7% έως 5,2%. Από όλα τα είδη γάλακτος το πλουσιότερο σε λακτόζη είναι της γυναίκας. Η λακτόζη στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντική γιατί ελέγχει τις ζυμώσεις σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, προσδίδει θρεπτική αξία στο γάλα και τα προϊόντα του και η γεύση πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων επηρεάζεται από αυτή. Η λακτόζη βοηθάει στην αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών που προκαλούνται από ανεπιθύμητα βακτήρια. Επιπλέον, η λακτόζη ενισχύει την απορρόφηση του ασβεστίου και ίσως του φωσφόρου και του μαγνησίου. Σε μικρό ποσοστό του πληθυσμού με δυσανεξία στη λακτόζη η κατανάλωση γάλακτος αποτελεί πρόβλημα που αποδίδεται στην ανεπάρκεια του πεπτικού συστήματος

στο ένζυμο λακτάση(β-γαλακτοζιδάση). Δεν υπάρχει πρόβλημα στην κατανάλωση γιαουρτιού και τυριών. Η γαλακτοζαιμία έχει σχέση με την κατανάλωση λακτόζης, ένα σπάνιο γενετικό ελάττωμα [28].

Ανόργανα συστατικά: Βρίσκονται στο γάλα κυρίως με τη μορφή αλάτων και μεταλλικών στοιχείων. Τα άλατα του γάλακτος, έχουν ιδιαίτερη σημασία γιατί μερικά από τα συστατικά του, ιδιαίτερα το ασβέστιο και ο φώσφορος, έχουν σπουδαία σημασία για την διατροφή του ανθρώπου δεδομένου ότι, οι συνηθισμένες τροφές είναι φτωχές σε αυτά και οι ανάγκες του οργανισμού είναι μεγάλες. Για τα άτομα που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης, το γάλα θεωρείται θαυμάσια πηγή αυτών των στοιχείων, γιατί αποτελούν σημαντικό παράγοντα για τη σωστή διάπλαση του σκελετού. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε χλώριο, είναι κριτήριο για τη διαπίστωση προσβολών από μαστίτιδα. Επίσης σημαντική πηγή μαγνησίου, καλίου και ιχνοστοιχείων, όπως ο ψευδάργυρος. Το γάλα όμως είναι φτωχό σε χαλκό και κυρίως σίδηρο [28], [14], [15].

Πρωτεΐνες: Η περιεκτικότητα του αγελαδινού γάλακτος σε πρωτεΐνες, κυμαίνεται από 3,3 g/100ml έως 3,9 g/100ml με μέσο όρο, περίπου 3,5 g/100ml. Οι κυριότερες πρωτεΐνες του γάλακτος είναι:

Καζεΐνες: Σε θερμοκρασία 20° C και PH 4,6 οι καζεΐνες είναι αδιάλυτες ενώ οι πρωτεΐνες ορού είναι διαλυτές στο PH αυτό. Έχουν σημαντική βιολογική αξία γιατί περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την διατροφή του ανθρώπου. Η πεπτικότητα τους είναι πολύ υψηλή [19].

Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος: Είναι διαλυτές στο νερό και μετά την πήξη του γάλακτος, τις βρίσκουμε στον ορό. Θεωρούνται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη των παιδιών, εξαιτίας της περιεκτικότητας σε λυσίνη και θρυπτοφάνη [20]. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι πλούσιες σε λυσίνη, σε αντίθεση με τις φυτικές πρωτεΐνες [16]. Το αγελαδινό γάλα είναι πιο πολύ δύσπεπτο από το ανθρώπινο, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς του σε καζεΐνη και φωσφορικό ασβέστιο. Μερικοί άνθρωποι και κυρίως τα βρέφη παρουσιάζουν αλλεργικές αντιδράσεις στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος (0,1-0,5% του πληθυσμού) [18].

Λίπος: Η περιεκτικότητα του αγελαδινού γάλακτος σε λίπος, κυμαίνεται σε ευρέα όρια(από 2,5% έως 6%)και είναι το πιο ευμετάβλητο συστατικό του γάλακτος. Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών(Κ.Τ.Π. 1998), αποδέχεται ως μικρότερη τιμή το 3,5%. Το 98% του λίπους, αποτελείται από τριγλυκερίδια. Βρίσκουμε και άλλα λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια, τα διγλυκερίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το λίπος του γάλακτος έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε χαμηλού βάρους λιπαρά οξέα, φωσφατίδια και βιταμίνες σε σύγκριση με άλλα λίπη [21].

Το λίπος του γάλακτος είναι πηγή ενέργειας και είναι φορέας των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K. Επηρεάζει την υφή και τα οργανοληπτικά συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων και συμβάλλει στην διαμόρφωση του αρώματος.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν βακτηριοστατικές ιδιότητες κυρίως κατά των βακτηρίων της σήψευς. Η παρουσία φωσφατιδίων στο γάλα έχει μεγάλη σημασία λόγω της μεγάλης θρεπτικής αξίας [10].

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα του γάλακτος συμβάλλουν γενικά στην αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, όμως διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δράση αυτή. Το λαουρικό, το μυριστικό και το παλμιτικό, αυξάνουν τη συνολική αλλά και τη χαμηλής ποιότητας LDL χοληστερόλη. Το βουτυρικό, καπροϊκό, καπρυλικό και καπρινικό έχουν ουδέτερη επίδραση [17]. Το καπροϊκό, καπρυλικό και καπρικό απορροφώνται γρήγορα από το πεπτικό σύστημα και θεωρείται ότι παίζουν θετικό ρόλο στη μείωση του σωματικού βάρους και της γλυκόζης του αίματος. Το ελαϊκό οξύ είναι το μοναδικό μονοακόρεστο του λίπους του γάλακτος [18].

Βιταμίνες: Τις βιταμίνες δεν μπορεί να τις συνθέσει ο οργανισμός οι οποίες όμως είναι απαραίτητες σε μικρές ποσότητες για την κανονική αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού. Το γάλα περιέχει όλες σχεδόν τις βιταμίνες, άλλες σε ικανοποιητική ποσότητα και άλλες σε ίχνη. Η βιταμίνη Α είναι αναγκαία για την κανονική λειτουργία του νευρικού συστήματος και των αδένων, ενώ η έλλειψη της οδηγεί σε διακοπή της αναπτύξεως, η βιταμίνη D ρυθμίζει την απόθεση ασβεστίου και φωσφορικού οξέος, ενώ έλλειψη της προκαλεί την ασθένεια ραχίτιδα. Η βιταμίνη Ε είναι η βιταμίνη της αναπαραγωγής, ενώ η απουσία αυτής προκαλεί στειρότητα, είναι αναγκαία για την κανονική λειτουργία του νευρικού συστήματος και προστατεύει ή υποβοηθάει τη δράση της βιταμίνης Α. Η βιταμίνη Κ δρα καταλυτικά για το σχηματισμό της προθρομβίνης στο ήπαρ, την μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και διευθύνει την πήξη του αίματος, η έλλειψη της οδηγεί σε αιμορραγία [11]. Το γάλα θεωρείται καλή πηγή για τη βιταμίνη Α και για αρκετές βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, νιασίνη και παντοθενικό οξύ). Δεν είναι όμως καλή πηγή βιταμινών C, D και E, ενώ η συγκέντρωση ορισμένων βιταμινών μειώνεται από την επεξεργασία και την συντήρηση του γάλακτος [12]. Η βιταμίνη C είναι αρκετά ευαίσθητη στη θέρμανση, ειδικά παρουσία οξυγόνου και ορισμένων μετάλλων. Οι απώλειες της βιταμίνης C κυμαίνονται από 5-20% κατά την παστερίωση του γάλακτος [12].

2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του γάλακτος

Η σύσταση του γάλακτος δεν είναι σταθερή αλλά υπάρχουν παράγοντες που την επηρεάζουν. Οι πιο σημαντικοί είναι οι εξής:

1. Η φυλή του ζώου: Παρατηρούμαι σημαντικές διαφορές στην σύσταση του γάλακτος όταν παράγεται από διαφορετικές φυλές αγελάδων. Περισσότερο φαίνονται οι διαφορές αυτές στην περιεκτικότητα του λίπους. Λόγω των διαφορών

αυτών οι φυλές των ζώων χωρίζονται σε γαλακτοπαραγωγικές, σε κρεατοπαραγωγικές και σε φυλές μικτών αποδόσεων [22], [41].

2. Η ατομικότητα του ζώου: Ζώα της ίδιας γενεάς στις ίδιες συνθήκες σταβλισμού και διατροφής παράγουν διαφορετική ποσότητα και ποιότητα γάλακτος. Οι διαφορές αυτές είναι γενετικής προέλευσης [22].

3. Η διατροφή των ζώων: Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η επίδραση της διατροφής των ζώων στην ποιότητα και στην ποσότητα του γάλακτος, γιατί η διατροφή των ζώων επαναλαμβάνεται καθημερινά και ο παραγωγός μπορεί να την ελέγξει. Η μειωμένη διατροφή έχει επίδραση μόνο στην ποσότητα του γάλακτος και όχι στην σύστασή του, εκτός από τις βιταμίνες οι οποίες σπανίζουν στο γάλα των υποσιτιζόμενων ζώων [22], [41].

4. Το κλίμα: Η γαλακτοπαραγωγή ευνοείται νωρίς το φθινόπωρο και την άνοιξη αλλά το καλοκαίρι λόγω της ζέστης και της μειωμένης χλωράς νομής ελαττώνεται. Τα ζώα τα οποία ζουν σε υγρά κλίματα παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα γάλακτος από εκείνα που ζουν σε ξηρά κλίματα [41].

5. Η γαλακτική περίοδος: Είναι το διάστημα από τον τοκετό έως την στείρευση, κατά την οποία αλλάζει σημαντικά η σύσταση του γάλακτος. Στην αρχή αυτής η ποσότητα του γάλακτος είναι μεγάλη, κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου αυξομειώνεται, ενώ στο τέλος της ελαττώνεται. Κατά τις πρώτες εβδομάδες του τοκετού, η απόδοση των αγελάδων αυξάνει, την μεγαλύτερη τιμή την αποκτά ένα μήνα περίπου μετά και στη συνέχεια ελαττώνεται μέχρι το τέλος της γαλακτικής περιόδου [41].

6. Οι ασθένειες των μαστών: Κυρίως οι μαστίτιδες επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση του γάλακτος που παράγουν. Μη κανονικό γάλα παράγεται από τις κλινικές μαστίτιδες [41].

7. Ο τρόπος αρμέγματος: Ο μαστός πρέπει να αδειάζει τελείως κατά την άμεψη. Πρέπει να γίνονται δύο αμέλξεις το 24ωρο. Όταν γίνονται τρεις έχουμε περισσότερο γάλα. Στην αρχή της αμέλξεως το γάλα είναι φτωχότερο σε λίπος. Το γάλα της απογευματινής αμέλξεως είναι πλουσιότερο σε λίπος από εκείνο της πρωινής. Η αλλαγή των ωρών αμέλξεως επιδρά στην ποσότητα του γάλακτος. Κατά την διάρκεια της άλμεξης αυξάνει η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος [22].

8. Η ηλικία του ζώου: Οι αγελάδες από 6-8 έτη έχουν την μεγαλύτερη απόδοση.

9. Η υγιεινή κατάσταση του ζώου: Οποιαδήποτε διαταραχή και ασθένεια έχουν σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητας του γάλακτος και γενικά της ποιότητάς του [22].

10. Η εργασία: Παράγεται λιγότερο γάλα από τα ζώα που εργάζονται.

11. Οι ορμόνες: Η ποσότητα του γάλακτος επηρεάζεται από τις ορμόνες όπως τα οιστρογόνα που προκαλούν την μείωσή του, η θυροξίνη προκαλεί αύξηση στην ποσότητα και στο λίπος του γάλακτος ενώ η προλακτίνη προκαλεί αύξηση της ποσότητας και μειώνει την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος [22].

Κεφάλαιο 3^ο Μικροβιολογία – Μικροχλωρίδα γάλακτος

3.1 ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα το οποίο προέρχεται από υγιή ζώα, δεν περιέχει μικροοργανισμούς κατά την έκκρισή του από τα αδενικά κύτταρα του μαστού. Όταν συγκεντρώνεται στον γαλακτοφόρο κόλπο αποκτά έναν ελάχιστο αριθμό βακτηρίων το οποίο κυμαίνεται από 500 έως 1000/ml, και ανήκουν επί το πλείστον στα γένη *Streptococcus* και *Micrococcus*. Όταν διαπιστωθούν μαστίτιδες αλλάζει η μικροβιακή χλωρίδα. Η επιμόλυνση του γάλακτος γίνεται μετά την έξοδό του από τον μαστό από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι προέρχονται από τα κόπρανα του ζώου, το τρίχωμά του, τα σκεύη και γενικά το περιβάλλον. Παρατηρούμαι μεγάλη ποικιλία στον αριθμό και το είδος των μικροοργανισμών η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν κατά την άμεληση, τη συλλογή και τη συντήρηση του γάλακτος [23].

Η προέλευση των μικροοργανισμών στο γάλα εξαρτάται από τρεις κατηγορίες:

- Από την χλωρίδα του εσωτερικού μαστού
- Από την χλωρίδα του εξωτερικού μαστού και το περιβάλλον του
- Από την χλωρίδα του αρμέγματος και του χειρισμού

ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

1. Ο μαστός του ζώου

- Οι συνθήκες καθαριότητας που επικρατούν κατά την διάρκεια της άμελησης καθορίζουν τους διάφορους μικροοργανισμούς(από 1000 έως 5000 μικροοργανισμοί/ml), που υπάρχουν στο γάλα.
- Το είδος των μικροοργανισμών αυξάνεται από τις ελαφριές μαστίτιδες ενώ δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών.
- Οι πρώτες σταγόνες γάλακτος κατά την διάρκεια της άμελησης περιέχουν μέχρι και 5000 μικροοργανισμοί/ml.
- Όταν το ζώο φθάσει σε μεγάλη ηλικία ο μαστός χάνει την αντοχή του στις επιμολύνσεις. Τα χέρια του αρμεκτή, τα θήλαστρα που δεν έχουν καθαριστεί σωστά μολύνουν τον μαστό κατά την άμεληση. Έτσι, δημιουργείται ευνοϊκό περιβάλλον στο εσωτερικό του μαστού για την

ανάπτυξη των βακτηρίων και τα οποία μεταφέρονται στο γάλα κατά την διάρκεια του αρμέγματος [23], [24].

2. Το σώμα του ζώου

- Ο μαστός εξωτερικά θα πρέπει να είναι καθαρός και υγιής όπως και η καθαριότητα των ζώων να είναι μεγάλη γιατί είναι πηγές μόλυνσης του γάλακτος.
- Ο λεπτομερής καθαρισμός της εξωτερικής επιφάνειας του μαστού έχει μεγάλη σημασία.
- Η μόλυνση η οποία προέρχεται από τον εξωτερικό μαστό κυμαίνεται από 50000 – 300000 μικροοργανισμοί/ml.
- Σημαντική επίσης είναι η ποσότητα των μικροοργανισμών γιατί περιλαμβάνει σπόρια αναερόβιων βακτηρίων(Clostridium) [23].

3. Το περιβάλλον του βουστασίου

- Ο αερισμός του βουστασίου.
- Το έδαφος και το λίπασμα.
- Η σκόνη που προέρχεται από τις τροφές και την κοπριά.
- Τα άχυρα.
- Η μη σωστή ανανέωση της στρωμνής.
- Οι μικροοργανισμοί , οι οποίοι προέρχονται από το περιβάλλον κατά ένα ποσοστό (10 %) είναι θερμοανθεκτικοί [23].

4. Ο αμελκτής και τα χέρια του

- Ο αμελκτής έρχεται σε άμεση επαφή με το γάλα. Ο βαθμός μόλυνσης εξαρτάται από το πόσο έχει κατανοήσει τα θέματα υγιεινής και τον σωστό τρόπο καθαρισμού.
- Άτομα που είναι φορείς βακτηρίων(π.χ. σαλμονέλας)ή πάσχουν από μεταδοτικά λοιμώδη νοσήματα αποκλείονται από την άμελξη [23].

5. Το χρησιμοποιούμενο νερό

- Σημαντικό ρόλο έχει η ποιότητα του χρησιμοποιούμενου νερού που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, γιατί έχει αποδεχθεί ότι από αυτό προέρχονται, όταν δεν είναι καθαρό, μεγάλος αριθμός κολοβακτηριδίων και ψυχρόφιλων βακτηρίων [23], [24].

6. Τα σκεύη αμέλξεως και τα δοχεία συγκεντρώσεως του γάλακτος

- Είναι βασικές πηγές μόλυνσης γιατί έρχονται σε άμεση επαφή με το γάλα κατά την διατήρηση και μεταφορά του.
- Ο καλός καθαρισμός των αμελκτικών μηχανών και η συντήρησή τους κατέχουν σημαντικό ρόλο στις πηγές μόλυνσης, και κυρίως εξαρτάται από την εκπαίδευση των παραγωγών.
- Ιδιαίτερη προσοχή στη συχνότητα καθαρισμού, στον χρόνο επαφής του απορρυπαντικού και το είδος, την θερμοκρασία του νερού και στην κατάσταση των φθαρτών εξαρτημάτων (λάστιχα , συνδέσεις κ.α.) [23], [24].

7. Τα έντομα

- Ο στάβλος έχει συνήθως έναν μεγάλο αριθμό μυγών και πολλές φορές μερικές όταν πέφτουν στο γάλα προκαλούν μόλυνση. Ο αριθμός των μικροοργανισμών που μεταφέρει κάθε μύγα είναι αρκετά μεγάλος. Για το λόγο αυτό απαιτείται κυρίως στο χώρο άμελης απεντόμωση και σε όλους τους χώρους της μονάδας [24].

8. Ψύξη του γάλακτος

- Το γάλα είναι μία σημαντική τροφή για τους μικροοργανισμούς. Για να περιοριστεί η μικροβιακή δραστηριότητα στο ελάχιστο θα πρέπει να γίνεται κατευθείαν ψύξη σε χαμηλή θερμοκρασία όσο το δυνατόν πιο άμεσα μετά την άμελη [23], [24].

3.2 Η μικροχλωρίδα του γάλακτος

Στο γάλα συναντάμε πολλούς και διάφορους μικροοργανισμούς. Αρκετοί από αυτούς συμμετέχουν σε ζυμώσεις του γάλακτος ενώ άλλοι είναι ανεπιθύμητοι και μερικοί είναι επικίνδυνοι για την υγεία του καταναλωτή [22].

Οι μικροοργανισμοί που συναντάμε στο γάλα, συνήθως είναι τα βακτήρια ενώ λιγότερο βρίσκουμε ζύμες, μύκητες και ιούς [22].

Έτσι τα βακτήρια που συναντώνται στο γάλα είναι τα παρακάτω:

1) Οικογένεια *Micrococcaceae*

1α) Το γένος *Staphylococcus*

Είναι Gram θετικοί κόκκοι, ακίνητοι, θετικοί στην καταλάση, αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι και ασπορογόνοι. Ανθεκτικοί στην επίδραση της ξηρασίας, του ατμοσφαιρικού αέρα και στη θερμοκρασία. Μπορεί να διατηρηθούν στη σκόνη για εβδομάδες ή μήνες και σε αντικείμενα αρκεί να μην είναι σε άμεση επαφή με ηλιακή ακτινοβολία [32].

Οι κυριότεροι για το γάλα είναι:

Ο *Staphylococcus aureus* παθογόνος, προκαλεί αιμόλυση και παράγει τοξίνες οι οποίες μένουν σταθερές με την παστερίωση ενώ ο *Staphylococcus aureus* καταστρέφεται.

Ο *Staphylococcus albus* είναι υπεύθυνος για μαστίτιδες στα ζώα.

Ο *Staphylococcus intermedius*

Ο *Staphylococcus epidermidis* ως συμβιωτικός μικροοργανισμός στο βλεννογόνο και στο δέρμα των ανθρώπων και των ζώων.

Ο *Staphylococcus saprophyticus*

Ο *Staphylococcus hyicus*

1β) Το γένος *Micrococcus*

Είναι συνήθως αερόβιοι, ζυμώνουν την γλυκόζη με οξειδωτικό τρόπο. Δεν είναι παθογόνοι και αποτελούν μέρος της συνηθισμένης χλωρίδας του γάλακτος. Κατά τη ζύμωση δεν προκαλούν παρά μόνο μικρή πτώση του pH με αποτέλεσμα να μην δημιουργούν σοβαρά προβλήματα τόσο στην συντήρηση όσο και στην επεξεργασία του γάλακτος [32]. Τα είδη που συναντάμε συνήθως στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι:

Ο *Micrococcus luteus*

Ο *Micrococcus varians*

Ο *Micrococcus prodigiosus* ο οποίος προκαλεί πήξη του γάλακτος.

Ο *Micrococcus freudenreichii*

2) Οικογένεια *Streptococaceae*

Το γένος *Streptococcus*

Οι περισσότεροι είναι προαιρετικά αναερόβια, βρίσκονται στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα στο σώμα του ανθρώπου και των ζώων και αρκετά είδη είναι παθογόνα. Έχουν μεγάλες θρεπτικές απαιτήσεις και παράγουν γαλακτικό οξύ[32].

Οι κυριότεροι είναι οι εξής:

Ο *Streptococcus lactis* προκαλεί την φυσιολογική οξίνιση του γάλακτος και λαμβάνει ενεργό μέρος στην ωρίμανση των τυριών. Παρουσία αντιβιοτικών αναστέλλεται η δράση του. Με το γαλακτικό οξύ που παράγει παρεμποδίζει την ανάπτυξη άλλων ανεπιθύμητων ή παθογόνων βακτηρίων.

Ο *Streptococcus cremoris* αντέχει στην θέρμανση και αναπτύσσεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία(15° C). Κατάλληλος για την παρασκευή τυριού και βουτύρου.

Ο *Streptococcus pyogenes* είναι ο στρεπτόκκοκος που προσβάλλει τον άνθρωπο με αναπνευστικές κυρίως λοιμώξεις. Με την παστερίωση καταστρέφεται.

Ο *Streptococcus thermophilus* προκαλεί ταχεία πήξη του γάλακτος. Παρουσία πενικιλίνης αναστέλλεται η δράση της και εμφανίζει ευαισθησία στα αντιβιοτικά.

Ο *Streptococcus zooepidemicus* προσβάλλει κυρίως τα ζώα, όχι όμως τον άνθρωπο [33].

Ο *Streptococcus agalactiae* προκαλεί μαστίτιδες στις αγελάδες. Είναι προαιρετικώς αναερόβιος. Τα στελέχη του επιβιώνουν στην παστερίωση [31].

Ο *Streptococcus bovis* ο οποίος βρέθηκε στο πεπτικό σύστημα των αγελάδων επίσης και στα κόπρανα του ανθρώπου. Όταν τον βρούμε στο γάλα επηρεάζει την καζεΐνη.

Ο *Streptococcus faecalis* βρίσκεται στα εκκρίματα των αγελάδων και η παρουσία του δηλώνει πρόσφατη μόλυνση από κοπριά. Τον βρίσκουμε σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου αδρανούν οι λοιποί στρεπτόκοκκοι.

Ο *Streptococcus uberis* θεωρείται υπεύθυνος για μια συγκεκριμένη μαστίτιδα και βρέθηκε στα κόπρανα της αγελάδας.

Ο *Streptococcus liquefaciens* ο οποίος είναι υπεύθυνος για την δημιουργία πεπτόνης στο γάλα και μπορεί να είναι η αιτία της πικρής γεύσης του τυριού. Το βρίσκουμε στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων και στα προϊόντα του γάλακτος.

Ο *Streptococcus durans* το βρίσκουμε στον εντερικό σωλήνα και σπάνια στα προϊόντα του γάλακτος [33].

3) Οικογένεια *Mycobacteriaceae*

Περιλαμβάνονται τα μυκοβακτήρια που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα και προκαλούν την φυματίωση. Τα κυριότερα είναι:

Ο *Mycobacterium tuberculosis*

Ο *Mycobacterium bovis*

Ο *Mycobacterium avium*

Ο *Mycobacterium paratuberculosis*

4) Οικογένεια *Bacillaceae*

4α) Το γένος *Bacillus*

Έχει μεγάλο ενδιαφέρον για την τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Είναι μεγάλοι βάκιλοι, θετικοί κατά Gram και φέρουν σπόρους. Αερόβιοι και θετικοί στην καταλάση. Τα βρίσκουμε στο έδαφος αλλά και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που μεταφέρονται με τον αέρα, τις τροφές και το νερό [32].

Ο *Bacillus anthracis*

Ο *Bacillus cereus* ο οποίος παράγει τοξίνες και προκαλεί δηλητηριάσεις και μάλιστα με πολύ μικρό αριθμό βακτηρίων. Επιπλέον αποτελεί αιτία της γλυκείας πήξεως του παστεριωμένου γάλακτος και της πικρής γεύσης της κρέμας. Βρίσκουμε σπόρια του στο γάλα UHT.

Ο *Bacillus subtilis* προκαλεί την ιξώδη υφή του νωπού και παστεριωμένου γάλακτος και την γλυκεία πήξη. Σε πολύ λίγες περιπτώσεις είναι παθογόνος για τον άνθρωπο [33].

Ο *Bacillus stearothermophilus* αναπτύσσεται κυρίως στα κονσερβοποιημένα προϊόντα στα οποία προκαλεί ανούσια γεύση. Χρησιμοποιείται στο προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο γάλα λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του σ' αυτό.

Ο *Bacillus coagulans* το βρίσκουμε στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα και στο γάλα εβαπορέ [32].

4β) Το γένος *Clostridium*

Τα βρίσκουμε στα κόπρανα των ζώων και του ανθρώπου και ζουν στο έδαφος. Μολύνουν το γάλα, τις τροφές και τα κόπρανα. Πολλά είδη είναι εξαιρετικά αναερόβια και προκαλούν σοβαρά προβλήματα στα τυριά και το κονσερβοποιημένο γάλα. Τα κυριότερα είναι:

Ο *Clostridium perfringens* το βρίσκουμε παντού στη φύση και προκαλεί πήξη στο γάλα. Μολύνει τα τρόφιμα και υπάρχει στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων.

Ο *Clostridium botulinum* Οι σπόροι του απαντώνται στο έδαφος και συνήθως δεν το βρίσκουμε στο έντερο των ζώων.

Ο *Clostridium sporogenes* δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και αναπτύσσεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και προκαλεί πήξη του γάλακτος.

Ο *Clostridium putrefaciens* δημιουργεί πήξη και οξίνιση.

Ο *Clostridium butyricum* θεωρείται βλαβερός στην παρασκευή σκληρών τυριών και όταν αναπτύσσεται στο γάλα παράγει οξύ και προκαλεί την πήξη του, δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο [31, 32].

5) Οικογένεια *Pseudomonadaceae*

5α) Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που προέρχονται κυρίως από το νερό και το έδαφος, γι' αυτό και αποτελούν μέρος της ψυχρότροφης χλωρίδας του γάλακτος. Καταστρέφονται με την παστερίωση [33].

Ο *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί μαστίτιδα στα ζώα.

Ο *Pseudomonas fluorescens* είναι εξαιρετικά αερόβιο.

5β) Το γένος *Brucella*

Περιλαμβάνει είδη που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Ορισμένα από το γένος αυτό προκαλούν την ασθένεια βρουκέλλωση στον άνθρωπο [31].

Η *Brucella abortus* παθογόνο για τις αγελάδες προκαλεί αποβολές και ταυτόχρονα μειώνει την απόδοση του γάλακτος. Μπορεί να προσβάλει τον άνθρωπο με μελιταίο πυρετό. Καταστρέφεται στη θερμοκρασία παστερίωσης.

Η *Brucella melitensis* προκαλεί τον μελιταίο πυρετό, την βρουκέλλωση και προσβάλει ιδιαίτερα τα πρόβατα και τις κατσίκες και λιγότερο τις αγελάδες και τον άνθρωπο.

Η *Brucella suis* μπορεί να προσβάλλει τον άνθρωπο και τα ζώα [33].

5γ) Το γένος *Alcaligenes* τα είδη του γένους είναι εξαιρετικά αερόβια [32].

6) Οικογένεια *Enterobacteriaceae*

Οι μικροοργανισμοί αυτής της οικογένειας δημιουργούν τα πιο πολλά προβλήματα στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη μόλυνσης του γάλακτος. Είναι αρνητικά κατά Gram και είναι αερόβια ή μερικώς αναερόβια. Τα περισσότερα τα βρίσκουμε στο πεπτικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου. Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C, οι οποίοι με την παστερίωση καταστρέφονται [32].

Τα κυριότερα είναι:

Η *Escherichia coli* υπάρχει στο πεπτικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων, η παρουσία της στο γάλα μαρτυρεί μόλυνση από τα κόπρανα. Έχει άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως 37° C. Αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης του γάλακτος. Προκαλεί γαστρεντερίτιδες.

Η *Cloaca aerogenes* αντέχει περισσότερο στη θερμοκρασία από την *Escherichia coli*. Προκαλεί διόγκωση των τυριών και των συσκευασιών που περιέχουν γάλα, λόγω των παραγόμενων αερίων. Η άριστη θερμοκρασία αναπτύξεώς της είναι 30° C.

Οι μικροοργανισμοί αυτής της οικογένειας διακρίνονται σ' αυτούς που ζυμώνουν την λακτόζη, οι οποίοι ονομάζονται και κολοβακτηριοειδή όπως η *Escherichia*, ο *Enterobacter*, ο *Aerobacter* κ.α., και σε αυτούς που δεν ζυμώνουν την λακτόζη όπως η *Shigella* και η *Salmonella* [33].

Τα εντεροβακτήρια, συνδέονται με την προσβολή του ανθρώπου από μεταδοτικές αρρώστιες. Έτσι η *Salmonella* προκαλεί τον τύφο στον άνθρωπο, επειδή οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ξεκινούν από την στοματική κοιλότητα περνούν στη συνέχεια στα έντερα και καταλήγουν στο γάλα. Είναι δυνατόν να έχουμε μια πρώτη προσβολή στα ζώα ή τα φυτά και μια δεύτερη στον άνθρωπο [31]. Η *Escherichia coli* και το *Aerobacter aerogenes* δεν δίνουν καλά αρώματα στα προϊόντα του γάλακτος. Για να διασφαλίσουμε την δημόσια υγεία είναι υποχρεωτική η παστερίωση [31].

7) Οικογένεια *Bacteriaceae*

Τα κυριότερα είδη είναι τα εξής:

Ο *Bacterium linens* είναι θετικός κατά Gram αερόβιος. Βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό και στην τροφή. Αναπτύσσεται στην επιφάνεια τυριών και συμβάλλει στην ωρίμανση τυριών. Το βρίσκουμε επίσης στο γάλα και το βούτυρο.

Ο *Bacterium erythrogenys* είναι θετικός κατά Gram και αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μαλακών τυριών [32].

8) Οικογένεια *Lactobacillaceae*

Τα είδη της οικογένεια αυτής χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία του γάλακτος. Είναι θετικοί κατά Gram. Διακρίνονται σε γαλακτικά βακτήρια τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ και σε εκείνα τα οποία παράλληλα με το γαλακτικό οξύ παράγουν οξικό οξύ, γλυκερόλη, αιθανόλη, διοξείδιο το άνθρακα. Έτσι τα είδη που έχουν σημασία είναι *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*. Το πιο ενδιαφέρον γένος όμως είναι το *Lactobacillus* που περιλαμβάνει βάκιλοι θετικοί κατά Gram, αρνητικοί στη καταλάση και αναερόβιοι ή ελαφρώς αναερόβιοι [32].

Ο *Lactobacillus casei*

Παράγει γαλακτικό οξύ έως 1,5% το οποίο μπορεί να δράσει κατά της *Escherichia coli* και του *Clostridium botulinum*.

Ο *Lactobacillus helveticus*

Ο *Lactobacillus bulgaricus* χρησιμοποιείται μαζί με τον *Streptococcus thermophilus* για την παρασκευή της γιαούρτης.

Ο *Lactobacillus lactis* είναι ο πιο διαδεδομένος στο γάλα και τα προϊόντα του.

Ο *Lactobacillus acidophilus* το βρίσκουμε στο πεπτικό σωλήνα των ζώων, με άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως 37° C. Χρησιμοποιείται με άλλα βακτήρια για την παρασκευή γιαούρτης και οξυγάλακτος.

Ο *Lactobacillus plantarum*, απομονώνεται από το τυρί, το βούτυρο και το γάλα.

Ο *Lactobacillus brevis* είναι πολύ διαδεδομένος στα γαλακτοκομικά προϊόντα και στις φυτικές ουσίες. Έχει άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως 30° C.

Ο *Lactobacillus buchneri*

Ο *Lactobacillus ferment* [32].

9) Οικογένεια *Corynebacteriaceae*

Τα περισσότερα είδη είναι παθογόνα στον άνθρωπο και στα ζώα [32].

Ο *Corynebacteriaceae pyogenes* αναπτύσσεται στα ζώα όταν πάσχουν από μαστίτιδα.

Ο *Corynebacteriaceae diphtheriae* είναι παθογόνος μικροοργανισμός και προκαλεί στον άνθρωπο την ασθένεια διφθερίτιδα.

Ο *Corynebacteriaceae bovis* δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και επιφέρει την τάγγιση της κρέμας.

Ο *Corynebacteriaceae lactium* τον βρίσκουμε στο γάλα και στα προϊόντα του.

3.3 Οι πηγές των μικροοργανισμών στο γάλα

Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών κυρίως τα βακτήρια και έπειτα οι μύκητες και οι ζύμες ευνοούνται σε μεγάλο βαθμό από το γάλα το οποίο αποτελεί πολύ καλό υπόστρωμα για αυτούς. Ο τρόπος μόλυνσης προσδιορίζει την μικροβιακή χλωρίδα, η σύστασή της οποίας διαφέρει αρκετά. Μόνο κάτω από εξαιρετικές συνθήκες υγιεινής μπορεί να παραχθεί γάλα σχεδόν

απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς γιατί εντός του μαστού περιέχονται κάποιοι μικροοργανισμοί. Ο ίδιος ο άνθρωπος μολύνει το γάλα με τις συνήθειές του κατά την διαδικασία συλλογής και του περιβάλλον τους. Υπάρχει άμεση αντιστοίχιση της υγείας του ζώου με τα είδη των μικροοργανισμών που παρατηρούνται στο γάλα. Η ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών έχει σαν αποτέλεσμα την γρήγορη αλλοίωση της σύστασης του γάλακτος.

Μπορεί να έχουμε μολύνσεις κατά την δημιουργία του γάλακτος στον μαστό. Οι μολύνσεις αυτές είναι οι εξής:

A) Αιματογενείς, όταν εισέρχονται στο γάλα μέσω του αίματος οι μικροοργανισμοί, ως επί το πλείστον βακτήρια (όπως το *Brucella abortus* και το *Mycobacterium tuberculosis*).

Η βρουκέλλωση ή μελιταίος πυρετός είναι ένα νόσημα, που προκαλείται από το γένος των Gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων *Brucella*. Τα στελέχη του βακτηριδίου όταν προσβάλουν τον άνθρωπο, προκαλούν υψηλό πυρετό, εφίδρωση, ανορεξία, αίσθημα κόπωσης και αρθραλγία. Με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων κυρίως γάλακτος που δεν έχουν παστεριωθεί και γαλακτοκομικών προϊόντων που δεν υποβλήθηκαν σε παστερίωση και ωρίμανση μπορούν να μεταδώσουν στον άνθρωπο την βρουκέλλωση των βοοειδών. Η βρουκέλλωση των αιγών και των προβάτων η οποία οφείλεται σε άλλου είδους βρουκέλλα, την *Brucella melitensis* δεν εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα στην προσβολή του ανθρώπου.

Η φυματίωση είναι ένα νόσημα που προκαλείται από το βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis* το οποίο εισέρχεται στον οργανισμό, από το αναπνευστικό σύστημα με την εισπνοή μικροβίων ή από το πεπτικό σύστημα. Επίσης προέρχεται από ζώα που έχουν προσβληθεί από φυματίωση εξαιτίας των τροφίμων στα οποία έχει επικαθήσει το μικρόβιο ή περιέχουν το μικρόβιο όπως για παράδειγμα το μη παστεριωμένο γάλα και το κρέας. Σήμερα, με την ανάπτυξη της επιστήμης, η φυματίωση έχει καταπολεμηθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό και στα περισσότερα κράτη, δεν υπολογίζεται σαν επικίνδυνη αρρώστια. Η φυματίωση πριν από τον πόλεμο, ερχόταν πρώτη σε θνησιμότητα, σήμερα όμως έρχεται τελευταία.

B) Εξωτερικές μολύνσεις, όπως στον αγωγό της θηλής, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εισέρχονται στη θηλή από το εξωτερικό περιβάλλον, όταν βρίσκουν καλές συνθήκες αναπτύσσονται. Έτσι δεν είναι δυνατή η είσοδος των μικροοργανισμών στο μαστό από τον γαλακτοφόρο κόλπο που απλώνεται μέσω της θηλής γιατί φέρει στο κάτω άκρο του σφικτήρα. Με τις πρώτες ροές του γάλακτος οι περισσότεροι μικροοργανισμοί απομακρύνονται και στις ροές αυτές υπάρχουν από 50.000 έως 100.000 μικροοργανισμοί ανά cm^3 , σε σχέση με τις ροές στις οποίες υπάρχουν 500 μικροοργανισμοί ανά cm^3 στο τέλος της άμελης. Οπότε πρέπει να

απομακρύνεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος και τη στρωμνή το γάλα της πρώτης άμελης γιατί οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό και δημιουργούν καινούργια πηγή μόλυνσης. Συγχρόνως, όσο αυξάνεται ο χρόνος μεταξύ δύο αμέλεων τόσο αυξάνεται και ο αριθμός των μικροοργανισμών του λαμβανομένου γάλακτος.

Γ) Τους πηγές μόλυνσης οι οποίες κατά την διάρκεια ή μετά την άμελη επιδρούν σε μεγάλο βαθμό την μικροβιακή κατάσταση του γάλακτος. Για να έχουμε όσο το δυνατό πιο καθαρό γάλα θα πρέπει να δοθούν σωστές οδηγίες στο προσωπικό που κάνει την άμελη και ταυτόχρονα να τηρούν τους κανόνες καθαριότητας και υγιεινής οι παραγωγοί. Κατά την άμελη γίνονται οι περισσότερες μολύνσεις και πραγματοποιούνται διαμέσω του αέρος, της τροφής, της στρωμνής κτλ.

Να μην παραβλέπουμε ότι τα συστατικά όπως αλάτι, ζάχαρη, μπαχαρικά, ενισχυτικά γεύσεων, σταθεροποιητές κτλ. τα οποία μπορεί να περιέχονται στα τελικά προϊόντα μπορούν να προσθέσουν τους δικούς τους μικροοργανισμούς στο γάλα [25], [26], [27], [28], [29], [30].

Κεφάλαιο 4^ο

ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΚΑΘΙΣΤΑ ΤΟ ΓΑΛΑ ΑΝΘΥΓΙΕΙΝΟ - ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.

Στο γάλα συναντάμε παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο και τα για ζώα τα οποία μπορούν να προέρχονται από το ίδιο το ζώο, το οποίο μας έδωσε το γάλα, από τον άνθρωπο ο οποίος συμμετείχε στην επεξεργασία του γάλακτος και από το περιβάλλον (νερό, έδαφος, σκεύη, κ.λ.π.). Τα βακτήρια αυτά μπορεί να προκαλέσουν αρκετές ασθένειες όπως είναι οι βρουκέλλες, το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, Λιστέρια, κ.λ.π. [22].

4.1 Βακτήρια παθογόνα για τον άνθρωπο

1. *Bacillus anthracis*: Ο κίνδυνος υπάρχει μόνο όταν το γάλα επιμολυνθεί με το βάκιλο και όταν παρουσιάζονται κρούσματα στην εκτροφή από την ασθένεια του άνθρακα. Όταν το γάλα έχει πάρα πολύ αλλοιωθεί από άποψη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ώστε να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί τότε μόνο γίνεται η απέκκριση του *Bacillus anthracis* από το γάλα των ανθρακόπληκτων ζώων [32]. Οι βλαστικές μορφές του βακίλου θανατώνονται με την παστερίωση. Οι σπόροι του όμως δεν καταστρέφονται και ζουν για αρκετά χρόνια στο έδαφος [22].

2. *Mycobacterium bovis* και *Mycobacterium tuberculosis*: Τα βοοειδή όταν πάσχουν από φυματίωση του μαστού, με το γάλα εκκρίνουν τον βάκιλο σε ποσοστό πάνω από 90%. Ο άνθρωπος όταν πάσχει από φυματίωση μπορεί να μολύνει το γάλα μετά την άμελη [34].

3. *Brucella sp.*: Τα κυριότερα είδη βρουκελλών που προσβάλλουν τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα είναι τα εξής: η *Brucella melitensis*, η *Brucella abortus*, η *Brucella suis*. Η μόλυνση του ανθρώπου γίνεται κυρίως με το γάλα και κατά δεύτερο λόγο από το δέρμα. Το γάλα μολύνεται από τον μολυσμένο μαστό, ή από το αίμα, ή από εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος, και τα έντομα. Το ωμό γάλα μεταφέρει τις βρουκέλλες στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα νωπά τυριά και βούτυρα είναι περισσότερο επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Η παστερίωση του γάλακτος είναι η μόνη μέθοδος για την προστασία της υγείας από μολύνσεις με βρουκέλλες [23], [32].

4. *Listeria*: Στα βοοειδή συνήθως προκαλεί μαστίτιδες και αποβολές. Η *Listeria monocytogenes* πολλαπλασιάζεται αργά σε θερμοκρασία 3 - 7° C άρα έχει την δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί στο γάλα που συντηρείται σε ψύξη. Συγχρόνως το βακτήριο αυτό εμφανίζει αξιοσημείωτη αντοχή στη θερμότητα και η θανάτωσή του κατά την παστερίωση μπορεί να είναι δύσκολη εάν ο πληθυσμός του είναι αρκετά μεγάλος. Στον άνθρωπο παρατηρείται προσβολή του νευρικού συστήματος(μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα), αποβολές, σηψαιμία. Η πρόληψη της βασίζεται στη καλή παστερίωση του γάλακτος και στην ατομική υγιεινή [22], [32].

5. *Salmonella*: Τα κυριότερα είδη της σαλμονέλας είναι τα εξής: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A,B*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella virchow*, *Salmonella newbrumswick* [34]. Οι περισσότεροι ορότυποι των σαλμονελών μπορούν να φθάσουν στο γάλα έμμεσα από τα κόπρανα των ζώων, το περιβάλλον του στάβλου(έντομα, σκόνη, κ.λπ.)ή από το νερό. Η μόλυνση είναι συχνή στους ορότυπους εκείνους που βρίσκονται στο έντερο των ίδιων των γαλακτοπαραγωγικών ζώων. Οι σαλμονέλες καταστρέφονται κατά την διάρκεια της παστερίωσης του γάλακτος [32].

6. *Leptospira*: Αρκετοί ορότυποι του γένους *Leptospira*, μολύνουν τα βοοειδή και τα έχουμε ανιχνεύσει στον μαστό. Αλλά και χωρίς να ανιχνεύεται στο μαστό το βακτήριο παρουσιάζεται στο γάλα των μολυσμένων ζώων [32]. Δεν υπάρχουν αποδείξεις μέχρι σήμερα για τη μετάδοση των λεπτοσπειρών στον άνθρωπο με το γάλα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το γάλα περιέχει ένα θερμοάντοχο παράγοντα που καταστέλλει και λύει της λεπτόσπειρες [34].

7. *Pasteurella*: Τα σπουδαιότερα παθογόνα είδη για τα ζώα είναι: Η *Pasteurella multocida* και η *Pasteurella haemolytica* και εκκρίνονται με το γάλα της αγελάδας όταν αυτές ασθενούν από μαστίτιδες που οφείλονται σε παστερέλλες. Η παστερίωση του γάλακτος είναι η βάση της πρόληψης [22] ,[34].

8. *Yersinia enterocolitica*: Ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών. Το βρίσκουμε στο εντερικό σύστημα των ζώων εξαιτίας του οποίου δημιουργεί μόλυνση στο γάλα. Προκαλεί συνήθως γαστρεντερίτιδες στον άνθρωπο. Καταστρέφεται με την παστερίωση [23], [34].

9. *Shigella sonnei*: Υπεύθυνοι για την μόλυνση είναι τα έντομα, τα σκεύη, το νερό και γενικά το μολυσμένο από τον άνθρωπο περιβάλλον. Ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωσή τους είναι περισσότερο στο βρασμένο γάλα παρά σε ωμό επειδή απουσιάζουν άλλα ανταγωνιστικά βακτήρια. Η παστερίωση του γάλακτος είναι τα μέτρα πρόληψης [32].

10. *Escherichia coli*: Παράγουν εντεροτοξίνη. Περισσότερο στα παιδιά και στους ενήλικες προκαλούν γαστρεντερίτιδες. Τα βρίσκουμε σε μεγάλο αριθμό στο γάλα τόσο υγιών ζώων, όσο και αυτών που πάσχουν από κολιβακιλλική μαστίτιδα [32], [34].

11. *Streptococcus*: Τα σπουδαιότερα παθογόνα είδη είναι: ***Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae***. Στον άνθρωπο ο *Streptococcus pyogenes* προκαλεί λοιμώξεις(ερυσίπελας, οστρακιάς, σηπτική κυνάγχη). Το γάλα μολύνεται κυρίως από τους ασθενείς ή φορείς ανθρώπων. Η σωστή παστερίωση καταστρέφει του στρεπτόκοκκους αλλά ο *Streptococcus agalactiae* παρουσιάζει θερμοάντοχα στελέχη που έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν [22], [34].

12. *Staphylococcus aureus*: Η μόλυνση του γάλακτος προέρχεται από το μολυσμένο μαστό του ζώου ή από τους ανθρώπους και το περιβάλλον. Οι σταφυλόκοκκοι έχουν μεγάλη σημασία στην υγιεινή του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων γιατί τα εντεροτοξινογόνα στελέχη του έχουν σαν αποτέλεσμα να προκαλούν τροφικές τοξινώσεις. Η παραγωγή της εντεροτοξίνης στο γάλα, πριν από την παστερίωσης είναι η σπουδαιότερη αιτία των κρουσμάτων σταφυλοκοκκικής τροφικής τοξινώσεως από το τυρί φέτα [31]. Οπότε αν παραχθούν στο γάλα μεταφέρονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα ανεξάρτητα από την τεχνολογία παρασκευής τους [23], [34].

13. *Clostridium botulinum*: Μπορεί το γάλα να μολυνθεί από το *Clostridium botulinum* από τα σπόρια του τα οποία υπάρχουν στο περιβάλλον και συγκεκριμένα στο χώμα και στην σκόνη. Οι σπόροι αντιστέκονται στην παστερίωση [22].

14. *Bacillus cereus*: Τα σπόρια του μολύνουν το γάλα με αποτέλεσμα να δημιουργούν τροφικές δηλητηριάσεις στους ανθρώπους και μαστίτιδες στις αγελάδες [34].

15. *Clostridium perfringens*: Οι σπόροι του ζουν επί πολλά έτη στην σκόνη, στις μονάδες ζώων και στις βιομηχανίες γάλακτος. Το *Clostridium perfringens* μολύνει το γάλα δια μέσω των κοπράνων των ζώων, τη σκόνη και τα έντομα. Μπορεί να αναπτυχθεί σε παστεριωμένο γάλα όταν η θερμοκρασία που συντηρείται είναι πάνω από 15° C. Η ανάπτυξη του βακτηρίου προκαλεί σπογγώδες πήγμα στο γάλα [23], [32].

16. *Corynebacterium diphtheriae*: Η μόλυνση του γάλακτος μπορεί να γίνει από τους ανθρώπους με το φτάρνισμα ή το βήχα ή και από τα δάχτυλά του. Αναπτύσσεται στις συνηθισμένες θερμοκρασίες. Η παστερίωση θανατώνει το βακτήριο [22], [32].

15. *Pseudomonas pseudomallei*: Προκαλεί σοβαρή ασθένεια στον άνθρωπο την μελιοείδωση, η οποία ενδημεί στην Άπω Ανατολή. Στα ζώα η ασθένεια παρουσιάζεται με μορφή χρόνιων αποστημάτων ή φλεγμονών του μαστού, των αρθρώσεων, του πνεύμονα. Καταστρέφεται με την παστερίωση και με την σφαγή των ασθενών ζώων [34].

16. *Streptobacillus moniliformis*: Προκαλεί σοβαρή ασθένεια στον άνθρωπο η οποία μπορεί να μεταδοθεί με το γάλα του άρρωστου ζώου κυρίως με την κατανάλωση γάλακτος αγελάδας μη παστεριωμένου [34].

Κεφάλαιο 5°

Η ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

5.1 Όρια μικροοργανισμών στο γάλα

Κυρίαρχο ρόλο στην υποβάθμιση των γαλακτομικών προϊόντων αποτελούν μερικοί μικροοργανισμοί. Οι Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης μας δίνουν κάποια όρια ώστε να επιτρέπουν την ύπαρξη κάποιων μικροοργανισμών στο γάλα και στα προϊόντα που προέρχονται από το γάλα. Ακόμη μας δίνουν και τις μεθόδους προσδιορισμού αυτών των μικροοργανισμών σύμφωνα με το ISO. Οπότε έχουμε τον παρακάτω πίνακα (2):

Προϊόν	Μικροοργανισμός	Μέγιστο όριο μικροοργανισμών	Ελάχιστο όριο μικροοργανισμών	Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο εφαρμογής της μεθόδου
Παστεριωμένο γάλα και υγρά γαλακ/κα προϊόντα	Enterobacteriaceae	5 cfu * / ml	<1 cfu / ml	ISO 21528 -1	Τέλος διαδικασίας παρασκευής
Τυριά από ορό γάλακτος ή γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία	E.coli	1000 cfu / gr	100 cfu / gr	ISO 16649-1 ή 2	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής τη στιγμή που αναμένεται ο μέγιστος αριθμός E.coli
Τυριά από νωπό γάλα	Σταφυλόκοκκοι θετικοί σε πηκτάση	10 ⁵ cfu.gr	10 ⁴ cfu/gr	EN/ISO 6888-2	Κατά τη διάρκεια διαδικασίας παρασκευής τη στιγμή που αναμένεται ο μέγιστος αριθμός Σταφυλόκοκκων
Τυρί από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία μικρότερη από αυτή της παστερίωσης	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	1000 cfu / gr	100 cfu / gr	EN/ISO 6888-1 ή 2	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής τη στιγμή που αναμένεται ο μεγαλύτερος αριθμός Σταφυλόκοκκων
Μη ωριμασμένα μαλακά τυριά (νωπά τυριά) από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	Σταφυλόκοκκοι θετικοί σε πηκτάση	100 cfu / gr	10 cfu / gr	EN/ISO 6888-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής

<p>Τρόφιμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i> (γάλα, γαλακ/κα) εκτός από αυτά που προορίζονται για βρέφη</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i></p>	<p>100 cfu / gr</p>	<p>Απουσία σε 25 gr</p>	<p>EN/ISO 11290 -2,-1</p>	<p>Το ελάχιστο όριο θα πρέπει να ισχύει πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης που το παράγει. Το μέγιστο όριο θα πρέπει να ισχύει για τα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους.</p>
<p>Τυρί, βούτυρο, κρέμα από νωπό γάλα ή γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη της παστερίωσης</p>	<p><i>Salmonella</i></p>	<p>Απουσία σε 25 gr</p>	<p>Απουσία σε 25 gr</p>	<p>EN/ISO 6579</p>	<p>Σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους</p>

*Όπου cfu / ml ή gr είναι μονάδα σχηματισμού αποικιών από βακτήρια.

Πίνακας (2): Όρια μικροοργανισμών στο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. [35],[36]

5.2 Ανθυγιεινό - ακατάλληλο γάλα

Το γάλα είναι ανθυγιεινό όταν:

- Περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην ανθρώπινη υγεία [23].
- Περιέχει τοξίνες μικροοργανισμών ή δηλητήρια φυτικής προέλευσης ή διάφορες τοξικές χημικές ουσίες, οι οποίες υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά που η συνεχής λήψη τους από τον άνθρωπο εγκυμονεί χρόνιας μορφής κινδύνους της

υγείας του [23].

- Παρουσιάζει αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να είναι μόνο ακατάλληλο χωρίς να είναι ανθυγιεινό [23].

Κεφάλαιο 6^ο

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ - ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Όταν υπάρχουν οι σωστές συνθήκες από πλευράς καθαριότητας και υγιεινής τόσο στο χώρο όπου ζουν τα ζώα όσο και στο χώρο όπου γίνεται η άμελη, παράγεται χωρίς αμφιβολία καλής ποιότητας γάλα. Επίσης κατευθείαν μετά την άμελη πρέπει να είναι κατάλληλη η συντήρησή του ώστε να εξασφαλίσουμε καλής ποιότητας γάλα. Όταν η επεξεργασία γίνεται μακριά από την κτηνοτροφική μονάδα, η συλλογή και η μεταφορά του σε μονάδες επεξεργασίας γάλακτος, είναι σημαντικές για την καλή ποιότητα του γάλακτος.

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να είναι υπό έλεγχο με μικρή ή χωρίς ψύξη όταν η συλλογή γάλακτος γίνεται σε κοντινά αγροκτήματα και το γάλα συλλέγεται κάθε μέρα ή ακόμη και δύο φορές τη μέρα. Αυτό επιτυγχάνεται γιατί οι αποστάσεις είναι κοντινές από τις μονάδες επεξεργασίας.

Επειδή τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και μεγαλύτερα εργοστάσια με αποτέλεσμα την μεταφορά του γάλακτος σε απομακρυσμένα σημεία, με αύξηση της παραγωγής, με βελτίωση των προϊόντων και με μείωση του κόστους, αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα να εφαρμόσουμε μέτρα και πρακτικές για να εξασφαλίσουμε την μη υποβάθμιση της ποιότητας του γάλακτος. Έτσι, το γάλα παραλαμβάνεται από ειδικό ψυγείο-βυτιοφόρο όχημα με τη χρήση των παγολεκανών αμέσως από το αγρόκτημα.

6.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Οι Καν. (ΕΚ) 853, 854 & 882/2004 καθορίζουν τους ελέγχους για τα κριτήρια του νωπού γάλακτος και τα οποία γίνονται όχι μόνο στο πλαίσιο του αυτοελέγχου αλλά και στο πλαίσιο ενός εθνικού ή περιφερειακού προγράμματος ελέγχου.

Θεωρούνται αυτοελεγχόμενες οι βιομηχανίες που διαθέτουν δικό τους αναγνωρισμένο εργαστήριο ή συνεργάζονται με αναγνωρισμένο ιδιωτικό εργαστήριο. Όσα εργαστήρια τα οποία είναι διαπιστευμένα από το Εθνικό

Συμβούλιο Διαπίστευσης(ΕΣΥΔ)κατά ISO 17025:2005 σε αντίστοιχες μεθόδους ποιοτικού ελέγχου του νωπού γάλακτος, έχουν καταχωρηθεί στα αναγνωρισμένα εργαστήρια αυτο-ελέγχου του φορέα.

Για τον έλεγχο της ποιότητας του νωπού γάλακτος από τα ΕΕΠΓ γίνονται τα εξής:

1. Ο έλεγχος της Ο.Μ.Χ.
2. Ο έλεγχος της Χημικής Σύστασης:
 - Η περιεκτικότητά του σε λίπος
 - Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες
 - Η περιεκτικότητά του σε λακτόζη
 - Η περιεκτικότητά σε Σ.Υ.Α.Λ.
3. Ο προσδιορισμός του σημείου πήξεως του
4. Ο έλεγχος των σωματικών κυττάρων του
5. Η ανίχνευση παρουσίας αντιμικροβιακών παραγόντων
6. Η ανίχνευση παρουσίας γίδινου γάλακτος στο πρόβειο

6.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Εφαρμόζονται οι εξής διεργασίες στο νωπό γάλα από τότε που το παραλαμβάνει το εργοστάσιο μέχρι έως ότου φθάσει στον αγοραστή:

- Με την διαύγαση ή με την διήθηση καθαρίζεται το γάλα. Ο καθαρισμός του γάλακτος γίνεται με φυγοκέντρηση και επίσης πραγματοποιείται απόσπηση και απομάκρυνση των σωματικών κυττάρων.
- Η τυποποίηση να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα κύρια συστατικά του(πιο πολύ το λίπος), να γίνεται σύμφωνα με τη νομοθεσία ώστε να έχουμε τις σωστές προδιαγραφές της χημικής σύστασης(όπως γάλα άπαχο ή μειωμένης λιποπεριεκτικότητας).
- Η ομογενοποίηση, έτσι ώστε στην επιφάνεια του γάλακτος να μην υπάρχει διαχωρισμός του λίπους και η εμφάνιση του γάλακτος να είναι ομοιογενή.

Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος με στόχο την απαλλαγή του γάλακτος από παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς για να είναι κατάλληλο όταν φθάσει στους καταναλωτές. Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος ξεκίνησε στα τέλη του 19ου αιώνα και ο κύριος λόγος ήταν η καταστροφή του μικροοργανισμού *Mycobacterium tuberculosis*, ο οποίος προκαλεί την φυματίωση, ασθένεια υπεύθυνη για πολλούς θανάτους εκείνη την εποχή. Μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, οι περισσότερες χώρες άρχισαν να δείχνουν μεγάλο ενδιαφέρον για την παστερίωση του γάλακτος με σκοπό να μειωθούν οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία οι οποίοι είχαν σχέση με την κατανάλωση του γάλακτος. Κατά τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών(2009)«Θερμικά επεξεργασμένο γάλα» χαρακτηρίζεται το γάλα που είναι κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση και παράγεται με θερμική επεξεργασία άμεσα και αποκλειστικά από το νωπό γάλα και το οποίο έχει τη μορφή γάλακτος παστεριωμένου και γάλακτος μακράς διάρκειας(αποστειρωμένου ή υπερ-υψηλής θέρμανσης - Ultra High Temperature). «Θερμική επεξεργασία» είναι η οποιαδήποτε επεξεργασία με θέρμανση και έχει σαν αποτέλεσμα, αμέσως μετά την εφαρμογή της, αρνητική αντίδραση στη δοκιμασία φωσφατάσης. Ανάλογα, λοιπόν, με τη θερμική επεξεργασία που ακολουθείται, το γάλα κατατάσσεται στις εξής κατηγορίες: Παστεριωμένο γάλα, που είναι το γάλα στο οποίο έχει εφαρμοστεί η τεχνική της παστερίωσης. Έχουμε δυο ισοδύναμους τρόπους θερμικής επεξεργασίας για την παστερίωση του γάλακτος .

1. η εφαρμογή χαμηλής θερμοκρασίας(63° C)για μακρό χρονικό διάστημα (LTLT, Low Temperature Long Time)περίπου 30 λεπτών η οποία πραγματοποιείται σε δεξαμενές με διπλά τοιχώματα , και
2. η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας(71,7° C)για βραχύ χρονικό διάστημα περίπου 15 δευτερολέπτων(HTST, High Temperature Short Time), η οποία πραγματοποιείται συνήθως σε πλακοειδείς εναλλάκτες θερμότητας.

Οι βιομηχανίες, που παράγουν παστεριωμένο γάλα, περισσότερο διαλέγουν τη δεύτερη μέθοδο παστερίωσης γιατί είναι εξοπλισμένα με τους πλακοειδείς εναλλάκτες, που είναι αναγκαίοι για την παστερίωση αυτή. Μπορούμε να εφαρμόσουμε και διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας για την παστερίωση του γάλακτος, πρέπει όμως να έχουμε ισοδύναμο αποτέλεσμα.

Στο παστεριωμένο γάλα πρέπει να γίνεται γρήγορη ψύξη σε θερμοκρασία όχι πάνω από 6° C, από την στιγμή της διακίνησής του και μέχρι την στιγμή της κατανάλωσής του, λόγω της περιορισμένης διάρκειας ζωής του. Η ποιότητα της πρώτης ύλης(το μικροβιακό φορτίο και τα σωματικά κύτταρα)και η χημική σύσταση(όπως μέταλλα και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα)και ο τρόπος επεξεργασίας

της πρώτης ύλης(συλλογή, θερμική επεξεργασία, θερμοκρασία αποθήκευσης, έκθεση στο φως, είδος συσκευασίας, επιμολύνσεις μετά την παστερίωση από μέταλλα και μικροοργανισμούς, κ.ά.)παράγοντες που καθορίζουν την διάρκεια ζωής του νωπού γάλακτος.

Ο κώδικας Τροφίμων και Ποτών(2009), επιτρέπει την παραγωγή παστεριωμένου γάλακτος, με την ένδειξη «υψηλής παστερίωσης». Το γάλα υψηλής παστερίωσης διατηρείται στο ψυγείο για πολύ περισσότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με το παστεριωμένο και είναι γνωστό με την ονομασία Παρατεταμένης Διάρκειας Ζωής(Extended Self Life ESL). Εφαρμόζονται κυρίως θερμοκρασίες περίπου στους 100° C για την θερμική επεξεργασία με διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας και χρόνου θέρμανσης. Με αποτέλεσμα να θανατώνονται όλοι οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί αλλά όχι τα σπόρια τους, ενώ τα πιο πολλά ένζυμα του γάλακτος μετουσιώνονται. Παρατηρούμαι μερικές επιδράσεις στα συστατικά του γάλακτος. Μέρος των πρωτεϊνών του ορού μετουσιώνονται, η θρεπτική του αξία(σε σχέση με κάποιες βιταμίνες)ελαττώνεται και μερικές αλλαγές παρουσιάζονται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, όπως ελαφριά γεύση. Στο γάλα μακράς διάρκειας εφαρμόζουμε εάν θέλουμε την θερμική επεξεργασία με την κλασική μέθοδο αποστείρωσης(π.χ. 115-125°C για 20-30 λεπτά)αλλιώς εφαρμόζουμε τη μέθοδο της υπερ-υψηλής θέρμανσης(Ultra High Temperature-UHT)στην οποία η θέρμανσή του θα πρέπει να είναι η ελάχιστη θερμοκρασία στους 135°C για 1 τουλάχιστον δευτερόλεπτο που έχει σαν σκοπό την καταστροφή όλων των υπολειπομένων μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Για να έχουμε όσο το δυνατό ελάχιστες χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές αλλαγές, το γάλα συσκευάζεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε αδιαφανή δοχεία. Αυτό εξασφαλίζει την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του από το παστεριωμένο γάλα. Οι ανωτέρω συνδυασμοί θερμοκρασίας και χρόνου του γάλακτος έχουν σαν αποτέλεσμα τη θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Επιδρούν όμως στη φυσικοχημική σταθερότητα, το χρώμα και τη γεύση του όπως και στην θρεπτική αξία του. Μερικές αλλαγές είναι αντιστρεπτές και μερικές όχι. Οι αλλαγές αυτές είναι λιγότερες όταν εφαρμόζεται η μέθοδος UHT, γι' αυτό το λόγο την διαλέγουμε έναντι της κλασικής αποστείρωσης [36], [37], [38], [39], [40], [121].

6.3 ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

α) Μικροβιολογικές:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα: Ο πληθυσμός των αερόβιων και προαιρετικών αναερόβιων βακτηρίων με τη χρήση ορισμένου υποστρώματος, και σε

συγκεκριμένη θερμοκρασία(30° C)και χρόνο επώασης, έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν και να δώσουν από μία ορατή μονάδα σχηματισμού αποικιών(colonyformingunit ή cfu)και ονομάζεται «ολική μεσόφιλη χλωρίδα»(ΟΜΧ)ή συνολικός αριθμός μικροβίων(ΣΑΜ), στο γάλα και τα τρόφιμα. Η αρίθμηση γίνεται συνήθως με την πρότυπη μέθοδο αριθμήσεως σε τριβλία(Standard Plate Count)αλλά μπορεί να γίνει και με περισσότερες από μία μεθόδους.

- Στο αγελαδινό γάλα γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων. Έχουμε σταθερό αριθμό σωματικών κυττάρων σε ένα υγιή μαστό, εκτός από τις πρώτες εβδομάδες μετά τον τοκετό. Κατά την μόλυνση του μαστού, το ανοσοποιητικό σύστημα της αγελάδας ενεργοποιείται και ο μεγαλώνει ο αριθμός των σωματικών κυττάρων [42].

β) Ανίχνευση Αντιβιοτικών:

Με την μεγάλη χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών και συνήθως των μαστίτιδων στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα και η χρήση τους ως προσθετικά στις ζωοτροφές έχει δημιουργήσει παγκόσμια, την εμφάνιση κατάλοιπων των ουσιών αυτών στο γάλα. Στα παραγωγικά ζώα χορηγούνται αντιμικροβιακές ουσίες, νόμιμα ή παράνομα, οι οποίες κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί για τοξική δράση σε πειραματόζωα. Έχουμε αρκετά παραδείγματα όπως η χλωραμφενικόλη, η οποία δρα στον μυελό των οστών και προκαλεί σε ευαίσθητα άτομα απλαστική αναιμία, τα νιτροφουράνια που ενοχοποιούνται για καρκινογόνο δράση και σουλφαμεθαζίνη που ενοχοποιείται για καρκινογόνο και τερατογόνο δράση.

Μετά τη χρήση του αντιβιοτικού το γάλα δε θα πρέπει να παραδίδεται αμέσως στη βιομηχανία πριν περάσει ένας ορισμένος χρόνος αναμονής ανάλογα με το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε. Όταν προορίζεται για την παραγωγή γιαούρτης και τυροκομικών προϊόντων διενεργείται και έλεγχος της μικροβιακής καλλιέργειας, ιδιαίτερα αυτών που εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, το γάλα που περιέχει αντιβιοτικά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή γιαούρτης και τυριού λόγω της μη φυσιολογικής πήξης, του ακατάλληλου ιξώδους, της μη φυσιολογικής γεύσης και πολλές φορές της αλλοίωσης του τελικού προϊόντος. Άρα κάθε γαλακτοβιομηχανία, πρέπει να εφαρμόζει τουλάχιστον μία φορά τον μήνα συγκεκριμένη μέθοδο ανίχνευσης αντιβιοτικών στο γάλα, για κάθε παραγωγό [42].

Κεφάλαιο 7^ο

Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για την μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών [43].

Οι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα [44]:

- Παρουσία πολυμορφισμού(όσο το δυνατόν περισσότερων αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχα αλληλόμορφα.
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας.
- Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα έκφρασης των γονιδίων.
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- Ανεξαρτησία μεταξύ της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου των φυτών.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ.

Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες:

- Την περιοχή του DNA που πρόκειται να «καλύψουν».
- και την τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης.

Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- Το επίπεδο της διαφοροποίησης.
- Τη φύση της πληροφορίας, η οποία πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με το επιστημονικό ερώτημα.
- Κάποια πρακτικά κριτήρια, τα οποία έχουν να κάνουν κυρίως με τον εξοπλισμό του εκάστοτε εργαστηρίου και την εμπειρία του ερευνητή.

Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(Polymerase Chain Reaction – PCR)αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον in vitro πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες, που χρησιμοποιήθηκαν από τους επιστήμονες ήταν αρχικά οι δείκτες Πολυμορφισμού Μεγέθους Περιοριστικού Θραύσματος(RFLP) [45]. Πρόκειται για μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα. Η ικανότητα των μορίων DNA να παραμένουν σταθερά στη

θερμική επεξεργασία, η παρουσία τους σε κάθε κύτταρο, η ειδική για κάθε είδος αλληλουχία νουκλεοτιδίων, τα έχουν προωθήσει τελευταία στην κορυφή των αναλύσεων ταυτοποίησης ειδών.

Ακολούθησαν το 1990 οι δείκτες Τυχαίου Πολλαπλασιασμού Πολυμορφικού DNA(RAPD) [46]. Πρόκειται για μοριακούς δείκτες που βασίζονται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό, με τη βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνήθως 8-10 βάσεις). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες όπως οι ISSRs, AFLPs, IFLPs. Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι SSRs, SCARs, MAS και άλλοι, βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών.

Τα πλεονεκτήματα του DNA ως μοριακού δείκτη είναι:

- α) Είναι γενικά πιο πολυμορφικό.
- β) Είναι πιο σταθερό, οπότε πιο εύκολο στη συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων αλλά και πιο ανθεκτικό όταν πρόκειται για αναλύσεις επεξεργασμένων κρεάτων.
- γ) Ειδικά, μετά την ανάπτυξη της μεθόδου της PCR [47] και τη δυνατότητα πλέον, της ενίσχυσης και πολλαπλασιασμού μέσω της PCR, ειδικών ακολουθιών-στόχων DNA με καθορισμένους εκκινητές, μπορεί να γίνει ανάλυση, ακόμα και σε δείγματα που υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα DNA προς ανίχνευση. Επιπλέον, η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την ενσωμάτωση και υβριδισμό εσωτερικού ανιχνευτή [48].

7.1. ΓΟΝΙΔΙΟ 16S rRNA

Σε μοριακό επίπεδο, τα rRNA γονίδια αποτελούν τους πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες για την ταυτοποίηση των βακτηρίων [49], εκ των οποίων τη μεγαλύτερη εφαρμογή στις φυλογενετικές αναλύσεις τους εμφανίζει το γονίδιο 16S rRNA [50], [51], [52], [53].

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης του 16S rRNA ως μοριακού δείκτη συγκαταλέγονται τα ακόλουθα:

- Είναι καθολικό γονίδιο και απαντάται σε όλους τους προκαρυωτικούς οργανισμούς [54], [55].
- Η δευτεροταγής δομή του είναι ιδιαίτερα συντηρημένη εξαιτίας του σημαντικού λειτουργικού του ρόλου κατά την πρωτεϊνσύνθεση [55],[56].
- Η πρωτοταγής δομή του αποτελεί ένα μωσαϊκό εξελικτικά συντηρημένων και μεταβλητών περιοχών [54].
- Το μήκος του (~1500 bp) παρέχει έναν συνδυασμό πολλών γενετικών χαρακτήρων και επιτρέπει τη στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων.

- Αποτελεί ένα σημαντικό μοριακό χρονόμετρο αποτυπώνοντας το συνολικό ποσοστό των εξελικτικών αλλαγών [55].

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθώς και η ευκολία απομόνωσης και αλληλούχισης του [55],[56] συνετέλεσαν στη δημιουργία μιας ολοένα αυξανόμενης βάσης δεδομένων 20 μερικών ή ολικών αλληλουχιών 16S rRNA πολυάριθμων οργανισμών, η οποία, με την σειρά της, ανατροφοδοτεί τη φυλογενετική έρευνα.

Οι Stackebrandt & Goebel(1994)[58] αναφέρουν ότι ομοιότητα της τάξης του 97% και άνω στις ολικές 16S rRNA αλληλουχίες των οργανισμών υποδηλώνει όμοια είδη, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ομοιότητας για το επίπεδο του γένους ανέρχεται στο 95% [59]. Η διατύπωση αυτή των Stackebrandt & Goebel(1994)[58] έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα άλλων ερευνητών οι οποίοι αναφέρουν τη συχνά αναποτελεσματική χρήση του 16S rRNA στις φυλογενετικές αναλύσεις βακτηρίων στο επίπεδο του είδους [60], [61], [62]. Πιο πρόσφατα, οι Strackebrandt & Ebers (2006)[63] και οι Meier-Kolthoff *et al.*(2013)[64] προτείνουν μια πιο υψηλή τιμή οριοθέτησης των προκαρυωτικών ειδών της τάξης του 98,7 έως 99% και 98,2 έως 99% ομοιότητας αντιστοίχως, μετά την επιθεώρηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού από πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία. Η πλέον πρόσφατη και ολοκληρωμένη αναθεώρηση είναι αυτή των Kim *et al.*(2014)[51], οι οποίοι οριοθετούν το κατώφλι του είδους σε τιμές ομοιότητας της τάξης του 98,65%. Απαραίτητη προϋπόθεση της επιτυχούς ταξινόμησης αποτελεί η υψηλή ποιότητα των αλληλουχιών καθώς και η ύπαρξη ολόκληρης της ακολουθίας 16S rRNA [65].

Σε κάθε περίπτωση, το 16S rRNA έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην οριοθέτηση των νέων ταξα και την ταυτοποίηση των απομονωμένων στελεχών [59] αποτελώντας ένα αδιαμφισβήτητο ισχυρό ταξινομικό εργαλείο στο επίπεδο του γένους καθώς και σε υψηλότερα ταξινομικά επίπεδα [57], [58], [66].

7.2 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των βακτηρίων που απομονώθηκαν από μη παστεριωμένο γάλα, παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα. Η εργασία αυτή αποτελεί προσπάθεια χαρακτηρισμού της μικροβιακής χλωρίδας σε διάφορες κατηγορίες γάλακτος με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

Με σκοπό τον καλύτερο και αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των ειδών επιλέχθηκε ο μοριακός δείκτης 16S rRNA, ο οποίος θεωρείται ο πιο αξιόπιστος για φυλογενετική ανάλυση.

Στη συγκεκριμένη εργασία, λοιπόν, έγιναν αναλύσεις οι οποίες μας έδωσαν την σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας στις κατηγορίες γάλακτος.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, βγαίνουν κάποια συμπεράσματα σχετικά με τα ποσοστά των μικροβιακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο παστεριωμένο, ξινόγαλα και μη παστεριωμένο γάλα.

Κεφάλαιο 8^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τρία δείγματα γάλα. Για την απομόνωση ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν 2 ml από κάθε δείγμα .

- Παστεριωμένο
- Μη παστεριωμένο
- Ξινόγαλα

8.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από το γάλα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Παίρνουμε δείγμα 1 ml γάλα και το τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.
2. Για την απομάκρυνση του υγρού από τα δείγματα γάλακτος αναδεύουμε στο vortex και το φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το υγρό και κρατάμε μόνο το ίζημα.
3. Παίρνουμε δείγμα 1 ml γάλα και το τοποθετούμε στα φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.
4. Για την απομάκρυνση του υγρού από τα δείγματα γάλακτος αναδεύουμε στο vortex και το φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το υγρό και κρατάμε μόνο το ίζημα.
4. Προσθέτουμε 180 μl Genomic Digestion Buffer και 20 μl πρωτεϊνάση K. Αναδεύουμε σε vortex στις 2.500 στροφές μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
4. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55ο C για περίπου 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.
5. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2 ml.
6. Προσθέτουμε 20 μl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200 μl Genomic Lysis Binding Buffer και αναδεύουμε στο vortex.
8. Προσθέτουμε 200 μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε στο vortex.
9. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά erpendorf με στήλες διαχωρισμού.
10. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 1 λεπτό.

11. Αλλάζουμε τις στήλες σε καθαρό erpendorf και προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.
12. Αδειάζουμε τα σωληνάρια erpendorf από το υγρό και προσθέτουμε 500 μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό erpendorf και προσθέτουμε 50 μl Elution Buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
15. Απομακρύνουμε την στήλη και έχουμε έτοιμο το δείγμα του DNA.
16. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μια διαδικασία διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που απαντάται σε φύκια. Διαλυτοποιείται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει καθώς ψύχεται, πήκτωμα. Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό μέσο είναι η στατική φάση και αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών(επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες, σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής. Από τους πόρους αυτούς θα κινηθούν τα τμήματα των θραυσμάτων του DNA στην ηλεκτροφόρηση από την κάθοδο προς την άνοδο(Εικ. 4).

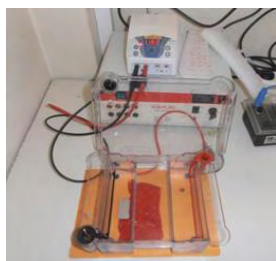
Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε μία φάση. Μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης διαχωρίζει τα τμήματα DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους(πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης καθώς μεταβάλετε η τριβή τους με την στατική φάση και άρα μεταβάλετε η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος[67].

Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωσης που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει υπό την επίδραση του υπεριώδους φωτός(Εικ. 5). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δε γίνεται να είναι πολύ υψηλή γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα κυριότερα ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE(Tris acetate EDTA) και το TBE(Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν. Επίσης Το TAE έχει μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα και εξαντλείται εύκολα σε παρατεταμένες ηλεκτροφορήσεις.



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 5: Συσκευή υπερϊώδους

Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί (Πίνακας 3). Χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται στον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης στην ανάλυση μορίων μικρού μεγέθους [68].

Αγαρόζη (% w/v)	DNA μέγεθος (kb)
0,3	5-60
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
2,0	0.1-2

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις αγαρόζης για τον διαχωρισμό διαφόρων μεγεθών DNA

Για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X

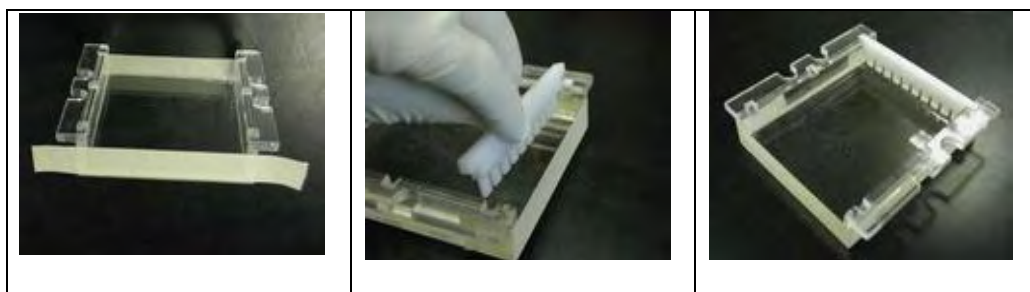
Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή(Εικ. 6).




Εικόνα 6: Προετοιμασία εκμαγείου

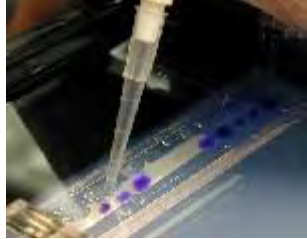
2. Προετοιμασία της πηκτής. Σε κωνική φιάλη ζυγίσαμε 1g αγαρόζης και προσθέσαμε 50ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται περιοδικά ανάδευση του διαλύματος μέχρι να γίνει διαυγές.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει στους 55° - 60°C.
5. Προστίθενται 5μl βρωμιούχου αιθιδίου(10mg/ml).

<p>6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.</p>	
---	--

7. Εισάγεται το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Ηρεμία του πηκτώματος(πάχος 3–5 mm)σε θερμοκρασία δωματίου για 30–40 λεπτά.

<p>9. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί απομακρύνεται το χτενάκι.</p>	
--	--

10. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
11. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA, στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA(προϊόν της PCR)και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

<p>12. Το δείγμα μεταφέρετε στο πηγάδι εισάγοντας την άκρη του ακρορύγχιου και αδειάζοντας το δείγμα αργά. Προσοχή χρειάζεται να μην τρυπήσει το πηγάδι με το ακρορύγχιο.</p>	
---	--

Η τάση στην συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 100V. Μετά από περίπου 40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται σε ένα θάλαμο, όπου κάτω από UV light και με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου τα τμήματα του DNA γίνονται ορατά. Με την κάμερα που είναι ενσωματωμένη στο θάλαμο υπάρχει δυνατότητα για λήψη φωτογραφιών. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τον οποίο ο θάλαμος είναι συνδεδεμένος.

8.4 PCR και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA

Η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλομορφίας, η ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών και η ανάθεσή τους σε ταξινομικές ομάδες, είναι εφικτή λόγω της μεγάλης συντήρησης του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια και στα αρχαία. Η ταξινομική ανάθεση είναι εφικτή λόγω της παρουσίας 9 υπερμεταβλητών περιοχών(V1-V9), όπου η διαφοροποίηση των αλληλουχιών τους μας επιτρέπει την ταξινόμηση των μικροβίων. Επίσης, λόγω της ύπαρξης συντηρημένων περιοχών που πλαισιώνουν τις μεταβλητές, είναι δυνατή η ενίσχυση μέσω PCR με τη χρήση παγκόσμιων εκκινητών.

8.5 Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR

Η Multiplex PCR πραγματοποιήθηκε με kit της εταιρίας ThermoFisher Scientific για την ενίσχυση τμημάτων του βακτηριακού 16S rRNA γονιδίου. Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε η ενίσχυση των περιοχών 2,4 και 8 να γίνεται σε μία αντίδραση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 250, 288 και 295 βάσεων αντίστοιχα. Σε μία δεύτερη αντίδραση ενισχύονται οι περιοχές 3,6-7 και 9, έχοντας ως αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 215, 260 και 209 βάσεων αντίστοιχα. Τα σετ των παραπάνω εκκινητών είναι σχεδιασμένα να στοχεύουν >80% των αλληλουχιών της βάσης δεδομένων Greengenes με 100% ομοιότητα για τουλάχιστον ένα ζεύγος εκκινητών.

8.6 Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχιση

Τα PCR προϊόντα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία βιβλιοθήκης με τη χρήση του Ion Plus Fragment Library Kit. Η σήμανση των δειγμάτων γίνεται μέσω του Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με το Ion OneTouch 2 System και το Ion PGM Template OT2 400 Kit. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Ion PGM Sequencing 400 Kit σε μηχανήμα Ion PGM χρησιμοποιώντας το Ion 318 Chip [69].

8.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του Torrent Suite Software και του Ion Reporter. Ως βάσεις δεδομένων αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 και Curated Greengenes v13.5. Για την ταξινομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα διαβάσματα και από τους δύο εκκινητές ανά ζεύγος και στη συνέχεια οι ακολουθίες των εκκινητών απομακρύνθηκαν. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αλληλουχίες που είχαν τουλάχιστον 90% αλληλεπικάλυψη μεταξύ της αλληλουχίας επερώτησης και της αλληλουχίας από τη βάση δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες οι οποίες είχαν τουλάχιστον δέκα αναγνώσεις. Το ποσοστό που χρησιμοποιήθηκε για

την ταυτοποίηση γένους είναι 97% ομοιότητα και το ποσοστό για την ταυτοποίηση είδους 99% ομοιότητα. Στις περιπτώσεις όπου η διαφορά ομοιότητας ανάμεσα στις δύο πρώτες αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αλληλουχία επερώτησης είναι μικρότερη από 0.2%, χρησιμοποιείται ο όρος “slash ID”.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του Krona [70] και του πακέτου “Phyloseq” της R [71].

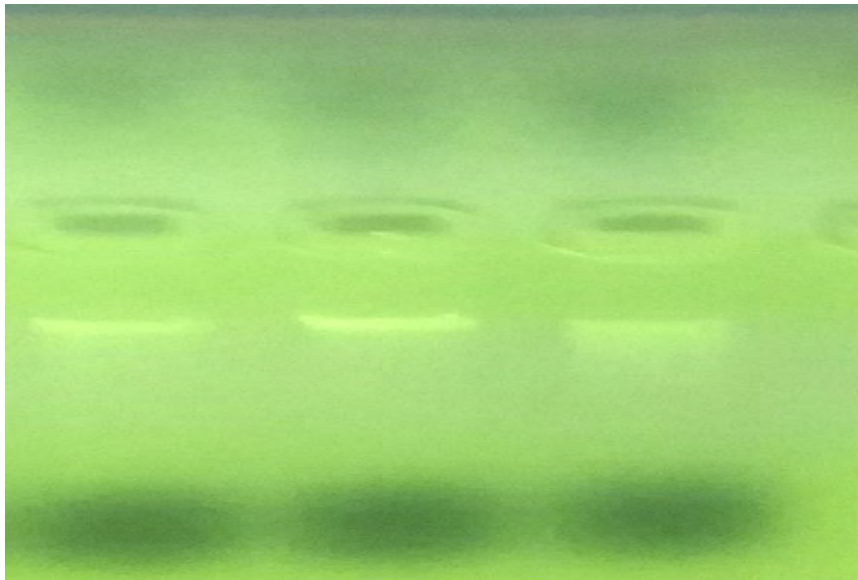
Κεφάλαιο 9^ο

Αποτελέσματα

Τα δείγματα γάλακτος αποτελούν κατάλληλη πηγή καθαρού DNA λόγω της περιεκτικότητάς τους σε σωματικά κύτταρα. Αυτό το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας του, χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της μελέτης ήταν τρία παστεριωμένο, μη παστεριωμένο και ξινόγαλα.

9.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στην ενότητα 8.2 και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 7: Απομόνωση DNA από τα δείγματα γάλακτος

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που απομονώθηκε από τα δείγματα είναι ικανοποιητική, οπότε πραγματοποιήθηκε η PCR.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η sequencing-PCR με σκοπό να εξακριβωθεί η εξειδίκευση των εκκινητών σε συγκεκριμένη ακολουθία του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA για να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών στα τρία δείγματα γάλακτος. Τα βακτηρικά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα(4).

Από τα στοιχεία του πίνακα (4) διαπιστώνουμε ότι στο παστεριωμένο γάλα ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους τρία βακτηριακά στελέχη, στο ξινόγαλα ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους τέσσερα βακτηριακά στελέχη ενώ παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο μη παστεριωμένο γάλα όπου ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους τριάντα ένα βακτηριακά στελέχη.

Όπως μας δείχνει ο πίνακας (5) οι συνολικές αλληλουχίες(reads)που εξετάστηκαν στο μη παστεριωμένο γάλα, παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα ήταν αντίστοιχα 70801, 59795, 64690. Από τα οποία πέρασαν τον ποιοτικό έλεγχο 47403,38237,40999 αντίστοιχα και δεν πέρασαν τον ποιοτικό έλεγχο 19041, 10707, 9403 reads αντίστοιχα . Ταυτοποιήθηκαν 28362, 27530, 31566 reads αντίστοιχα.

Στον πίνακα (6) φαίνονται τα reads για το παστεριωμένο γάλα για το κάθε ζεύγος εκκινητών ή περιοχών γονιδίου.

Στον πίνακα (7) φαίνονται τα reads για το ξινόγαλα για το κάθε ζεύγος εκκινητών ή περιοχών γονιδίου.

Στον πίνακα (8) φαίνονται τα reads για το μη παστεριωμένο γάλα για το κάθε ζεύγος εκκινητών ή περιοχών γονιδίου.

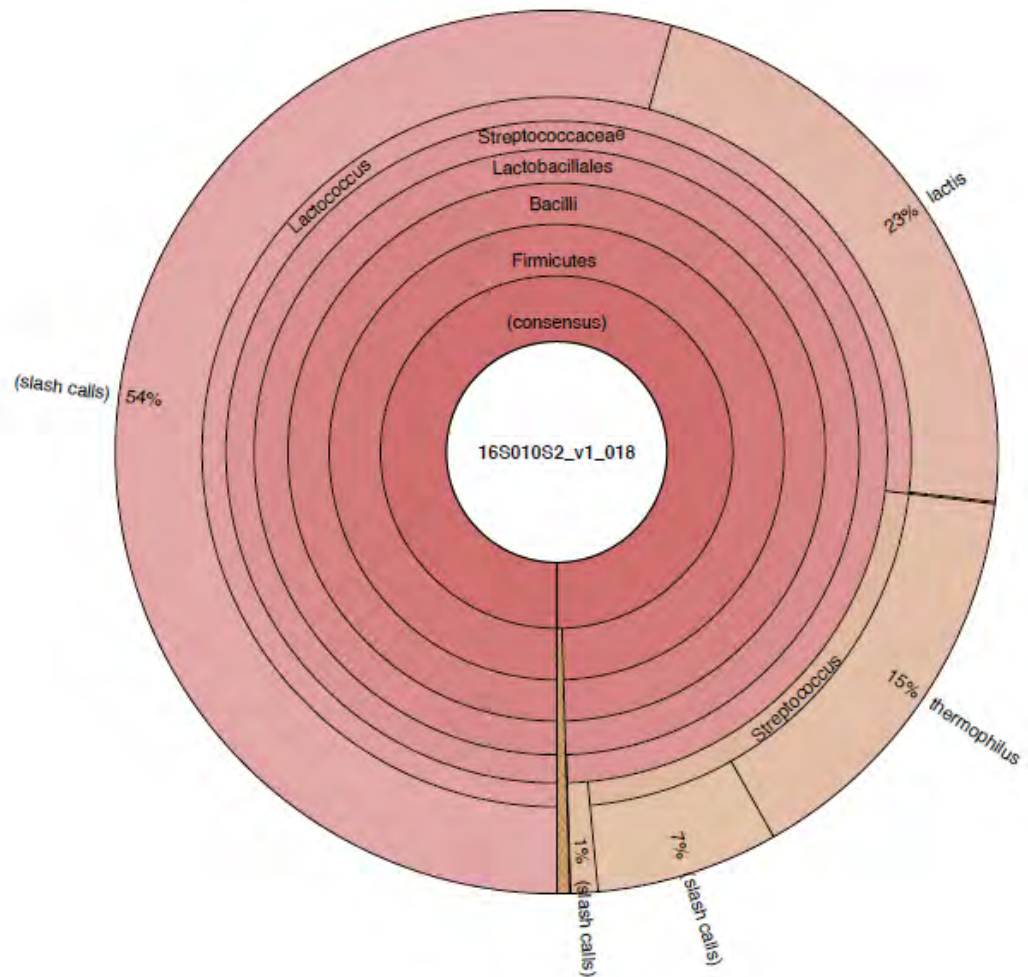
Στον πίνακα (9) φαίνονται τα γένη των βακτηρίων που δεν ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους αλλά ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο γένους στο μη παστεριωμένο γάλα.

9.2 ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ

Η μικροβιακή χλωρίδα του παστεριωμένου γάλα φαίνεται πως κυριαρχείται από βακτηριακά γένη *Streptococcus*(ποσοστό22%), *Lactococcus*(ποσοστό 77%) και *Pseudomonas*, με κυρίαρχα είδη, *Streptococcus thermophilus*(ποσοστό 15 %) και *Lactococcus lactis*(ποσοστό 23 %) και *Pseudomonas hibiscicola* αντίστοιχα. (Διάγραμμα 1)

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα (1) όπου φαίνονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά σε επίπεδο γένους και είδους των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο παστεριωμένο γάλα.Στην εξωτερική στοιβάδα του διαγράμματος απεικονίζεται το είδος, στη δεύτερη στοιβάδα απεικονίζεται το γένος, στη τρίτη στοιβάδα απεικονίζεται η οικογένεια, στη τέταρτη στοιβάδα απεικονίζεται η σειρά, στη πέμπτη στοιβάδα απεικονίζεται η τάξη, στη έκτη στοιβάδα απεικονίζεται η ζωολογική διαίρεση και στη έβδομη στοιβάδα απεικονίζεται το βασίλειο των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα γάλακτος. Ο όρος slash ID χρησιμοποιείται για τις αλληλουχίες όπου η διαφορά ομοιότητας είναι μικρότερη του 0.2%.Το 16S010S2_V1_018 είναι το δείγμα του παστεριωμένου γάλακτος.

Διάγραμμα 1 : Οι αναλογίες βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο παστεριωμένο γάλα



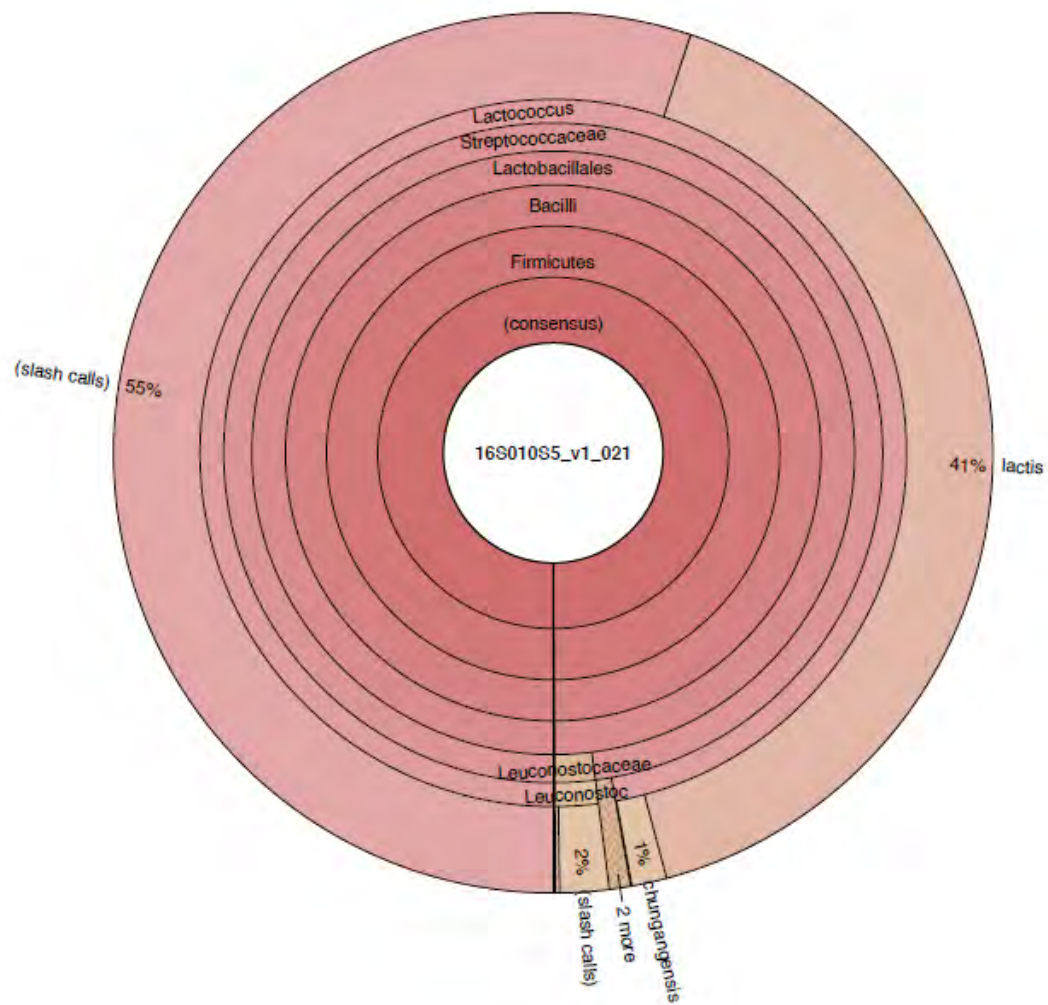
9.3 ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ ΞΙΝΟΓΑΛΑ

Η μικροβιακή χλωρίδα του ξινόγαλου φαίνεται πως κυριαρχείται από βακτηριακά γένη *Lactococcus*(ποσοστό 97%) και *Leuconostoc*(ποσοστό 2%) με κυρίαρχα είδη και *Lactococcus lactis*(ποσοστό 41 %), *Lactococcus chungangensis*(ποσοστό 1%) και *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus* σε μικρότερη αναλογία.(Διάγραμμα 2)

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα (2) όπου φαίνονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά σε επίπεδο γένους και είδους των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο ξινόγαλα.

Στην εξωτερική στοιβάδα του διαγράμματος απεικονίζεται το είδος, στη δεύτερη στοιβάδα απεικονίζεται το γένος, στη τρίτη στοιβάδα απεικονίζεται η οικογένεια, στη τέταρτη στοιβάδα απεικονίζεται η σειρά, στη πέμπτη στοιβάδα απεικονίζεται η τάξη, στη έκτη στοιβάδα απεικονίζεται η ζωολογική διαίρεση και στη έβδομη στοιβάδα απεικονίζεται το βασίλειο των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα γάλακτος. Ο όρος slash ID χρησιμοποιείται για τις αλληλουχίες όπου η διαφορά ομοιότητας είναι μικρότερη του 0.2%. Το 16S010S5_V1_021 είναι το δείγμα του ξινογάλακτος.

Διάγραμμα 2 : Οι αναλογίες βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο ξινόγαλα



9.4 ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ

Η μικροβιακή χλωρίδα του μη παστεριωμένου γάλα φαίνεται πως κυριαρχείται από **βακτηριακά γένη** *Pseudomonas*(33%), *Streptococcus*(32%), *Acinetobacter*(2%), *Phyllobacterium*(1%), *Lactobacillus*(1%), *Methylobacterium*(1%), με **κυρίαρχα είδη** *Pseudomonas hibiscicola*(18%),*Streptococcus thermophilus*(2%)και σε μικρότερη αναλογία τα *Propionibacterium acnes*, *Methylobacterium jeotgali*, *Acinetobacter johnsonii*, *Lactobacillus curvatus*, *Moraxella osloensis*, *Sphingomonas echinoides*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Lactococcus lactis*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Lactobacillus sakei*, *Novosphingobium nitrogenifigens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Lactobacillus graminis*, *Psychrobacter sanguinis*, *Acinetobacter rsingii*, *Psychrobacter lutiphocae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Acinetobacter baumannii*, *Thauera sp.*, *Pseudomonas caeni*, *Pseudomonas fragi*, *Arthrobacter sp.*, *Acinetobacter soli*, *Caryophanon latum*, *Burkholderia caledonica*, *Methylobacterium goesingense*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus sp.*, *Methylobacterium persicinum*, *Lactococcus chungangensis*, *Leuconostoc mesenteroide*.(Διάγραμμα 3)

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα (3) όπου φαίνονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά σε επίπεδο γένους και είδους των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στο μη παστεριωμένο γάλα.

Στην εξωτερική στοιβάδα του διαγράμματος απεικονίζεται το είδος, στη δεύτερη στοιβάδα απεικονίζεται το γένος, στη τρίτη στοιβάδα απεικονίζεται η οικογένεια, στη τέταρτη στοιβάδα απεικονίζεται η σειρά, στη πέμπτη στοιβάδα απεικονίζεται η τάξη, στη έκτη στοιβάδα απεικονίζεται η ζωολογική διαίρεση και στη έβδομη στοιβάδα απεικονίζεται το βασίλειο των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα γάλακτος. Ο όρος slash ID χρησιμοποιείται για τις αλληλουχίες όπου η διαφορά ομοιότητας είναι μικρότερη του 0.2%. Το 16S010S2_V1_017 είναι το δείγμα του μη παστεριωμένου γάλακτος.

9.5 Γενικές πληροφορίες για τα βακτήρια του πίνακα (4)

Pseudomonas hibiscicola

Η *Pseudomonas hibiscicola* είναι αερόβιο, μη φερματικό, Gram-αρνητικό βακτήριο. Είναι ένα ασυνήθιστο βακτήριο που όταν μολύνει τον άνθρωπο δύσκολα θεραπεύεται [74]. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, η *Stenotrophomonas maltophilia* μπορεί να οδηγήσει σε νοσοκομειακές λοιμώξεις [75].

Streptococcus thermophilus

Το *Streptococcus thermophilus* είναι ταξινομημένο ως βακτήριο γαλακτικού οξέος [74]. Το *Streptococcus thermophilus* βρίσκεται στα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση και χρησιμοποιείται γενικά στην παραγωγή γιαουρτιού [75].

Propionibacterium acnes

Το *Propionibacterium acnes* είναι το σχετικά αργά αναπτυσσόμενο, συνήθως αναερόβιο, που συνδέεται με την πάθηση του δέρματος, την ακμή [76].

Methylobacterium jeotgali

Το *Methylobacterium jeotgali* είναι ένα Gram-αρνητικό, αυστηρά αερόβιο, κινητό και ραβδόμορφο βακτήριο από το γένος του *Methylobacterium* το οποίο έχει απομονωθεί από ζυμωμένα θαλασσινά στην Κορέα [77], [78].

Acinetobacter johnsonii

Το *Acinetobacter johnsonii* είναι ένα βακτηριακό είδος του γένους *Acinetobacter*. Πρόκειται για ένα μη πτητικό, gram αρνητικό κοκκοβακίλλιο. Είναι μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπινου εντέρου [79].

Lactobacillus curvatus

Το *Lactobacillus curvatus* ανήκει στην ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος δηλαδή μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ. Στον άνθρωπο, αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό της μικροβιακής χλωρίδας σε αρκετές θέσεις του σώματος [80],[81],[82].

Lactococcus lactis

Το *Lactococcus lactis* είναι ένα Gram-θετικό βακτήριο που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή βουτυρογάλακτος και τυριού [83]. Η ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους ο *Lactococcus lactis* είναι ένας από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς στη γαλακτοκομική βιομηχανία [84].

Phyllobacterium myrsinacearum

Το *Phyllobacterium myrsinacearum* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο από το γένος *Phyllobacterium* το οποίο απομονώθηκε από τις ρίζες ζαχαρότευτλων [85].

Lactobacillus sakei

Το *Lactobacillus sakei* είναι ένα είδος βακτηρίων στο γένος *Lactobacillus*. Τοποθετείται στην ομάδα II, με είδη ικανά να παράγουν είτε αλκοόλη είτε γαλακτικό οξύ από σάκχαρα.

Novosphingobium nitrogenifigens

Το *Novosphingobium nitrogenifigens* είναι ένα βακτήριο Gram-αρνητικό, διαζωτρόφο και ραβδόμορφο από το γένος του *Novosphingobium* που έχει απομονωθεί από τα απορρίμματα χαρτοπολτού και χαρτιού στη Νέα Ζηλανδία [86], [87], [88], [89].

Acinetobacter lwoffii

Το *Acinetobacter lwoffii*, θεωρείται φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος και μπορεί επίσης να κατοικήσει στον ανθρώπινο οροφαρυγγικό ιστό και στο περίνεο έως και του 25% του πληθυσμού. Μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις στους ανθρώπινους ξενιστές, ιδιαίτερα μολύνσεις που σχετίζονται με τον καθετήρα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς [90].

Psychrobacter sanguinis

Το *Psychrobacter sanguinis* είναι ένα Gram-αρνητικό, αυστηρά αερόβιο βακτήριο του γένους *Psychrobacter*, το οποίο απομονώθηκε από ανθρώπινο αίμα στη Νέα Υόρκη [91],[92].

Acinetobacter ursingii

Το *Acinetobacter ursingii* είναι ένα είδος [93] δυνητικά παθογόνων βακτηρίων [94].

Psychrobacter lutiphocae

Το *Psychrobacter lutiphocae* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο του γένους *Psychrobacter*, το οποίο απομονώθηκε από τα περιττώματα μιας φώκιας στο Schleswig-Holstein της Γερμανίας [95], [96].

Streptococcus dysgalactiae

Το *Streptococcus dysgalactiae* είναι ένα gram θετικό, βήτα-αιμολυτικό, κοκκώδες βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Streptococcaceae*. Είναι ικανό να μολύνει τόσο ανθρώπους όσο και ζώα. Οι κλινικές αναφορές σε ανθρώπινες ασθένειες κυμαίνονται από επιφανειακές δερματικές λοιμώξεις και αμυγδαλίτιδα, έως σοβαρή νεκρωτική γαστρεντερίτιδα και βακτηριαμία [97].

Acinetobacter baumannii

Το *Acinetobacter baumannii* είναι ένα τυπικά κοντό, σχεδόν στρογγυλό, με ραβδόμορφο σχήμα(*coccobacillus*)Gram-αρνητικό βακτήριο. Μπορεί να είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο στον άνθρωπο, επηρεάζοντας τα άτομα με μειωμένα ανοσοποιητικά συστήματα και καθίσταται όλο και πιο σημαντικό ως νοσοκομειακή μόλυνση [98].

Thauera

Η *Thauera* είναι ένα γένος Gram-αρνητικών. Τα είδη εμφανίζονται σε υγρό έδαφος και σε μολυσμένα γλυκά νερά [99].

Pseudomonas caeni

Το *Pseudomonas caeni* ένα απονιτροποιητικό βακτήριο που απομονώνεται από την ιλύ ενός αναερόβιου βιοαντιδραστήρα οξειδώσεως αμμωνίου [100].

Pseudomonas fragi

Το *Pseudomonas fragi* είναι ένα ψυχρόφιλο Gram-αρνητικό βακτήριο που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων [101].

Arthrobacter

Το *Arthrobacter* είναι ένα γένος βακτηρίων που απαντάται συνήθως στο έδαφος. Όλα τα είδη αυτού του γένους είναι Gram θετικά δεσμευτικά αερόβια. Το *Arthrobacter* χρησιμοποιείται για βιομηχανική παραγωγή L-γλουταμικού [77].

Acinetobacter soli

Το *Acinetobacter soli* μπορεί να προκαλέσει μόλυνση στα νεογνά [102].

Caryophanon latum

Η *Caryophanon latum* είναι βακτηριακό είδος. Το *Caryophanon latum* εμφανίζεται σε νωπά περιττώματα βοοειδή, όπου γίνεται γρήγορα ένας πληθυσμός μάζας που εξαφανίζεται αμέσως μετά την εξάντληση των κύριων ενεργειακών πηγών (κατώτερα λιπαρά οξέα) [103].

Methylobacterium goesingense

Το *Methylobacterium goesingense* έχει απομονωθεί από τα ενδοσπόρια από το φυτό *Thlapi goingense* στην Αυστρία [77]. Το *Methylobacterium goesingense* είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στο νικέλιο [104].

Acinetobacter junii

Το *Acinetobacter junii* μπορεί να είναι παθογόνο [105], [106], [107]. Αυτό το βακτήριο έχει συνδεθεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων της αιματικής ροής που σχετίζονται με τον καθετήρα [107].

Bacillus

Το *Bacillus* είναι Πανταχού παρών στη φύση, ο *Bacillus* περιλαμβάνει τόσο ελεύθερα ζωντανά (μη παρασιτικά) όσο και παρασιτικά παθογόνα είδη [108].

Methylobacterium persicinum

Το *Methylobacterium persicinum* είναι ένα Gram-αρνητικό, προαιρετικά μεθυλοτροφικό, αποκλειστικά αερόβιο από το γένος του *Methylobacterium* το οποίο έχει απομονωθεί από το νερό από ένα εργοστάσιο τροφίμων στην Ιαπωνία [109], [110], [111].

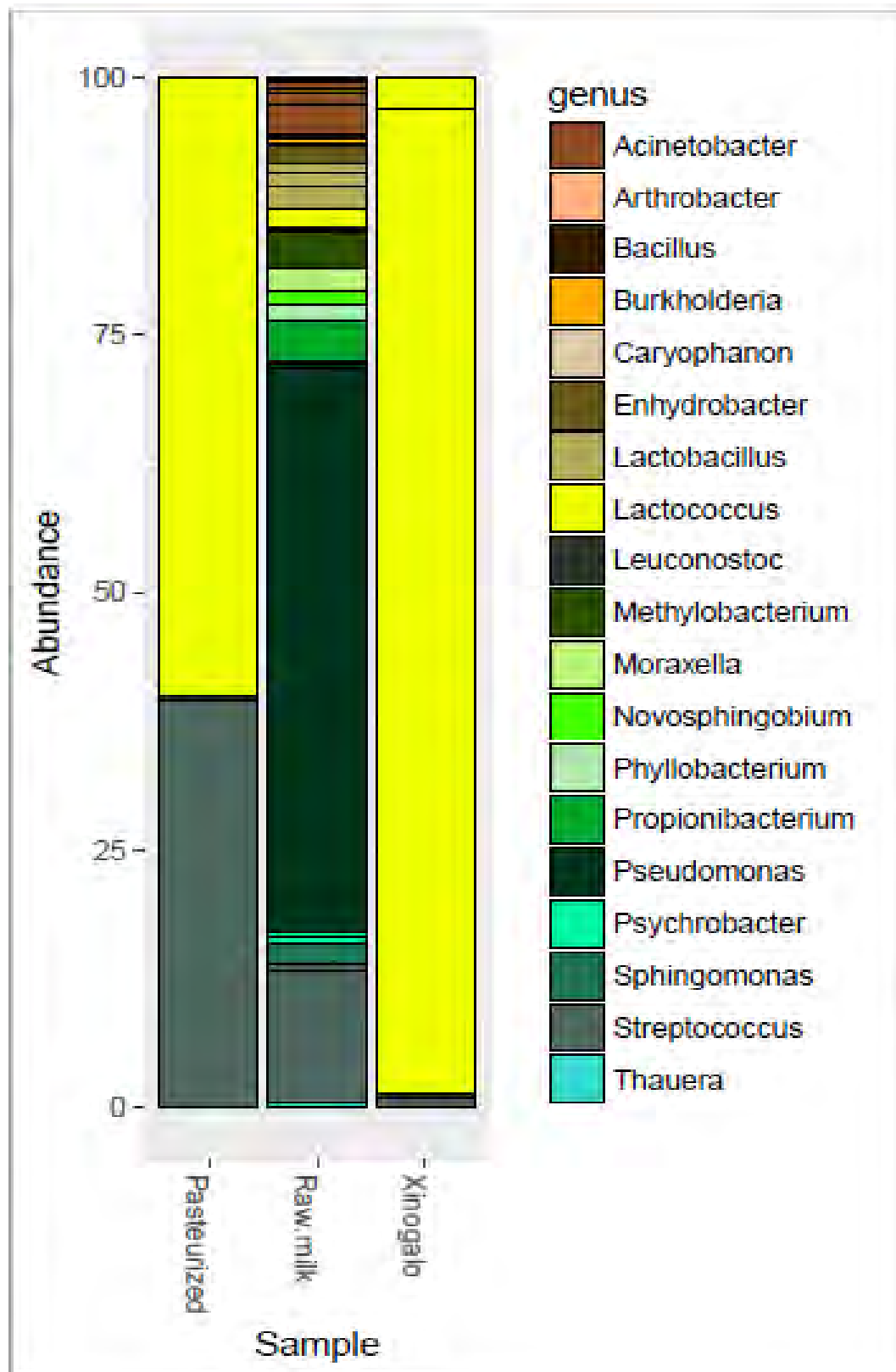
Lactococcus chungangensis

Το *Lactococcus chungangensis* αναγνωρίστηκε πρόσφατα, από την απομόνωσή του σε ενεργοποιημένο αφρό ιλύος σε μονάδα επεξεργασίας λυμάτων στην Κορέα. Παράγουν επίσης ορισμένα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της γεύσης στο τυρί, από μια ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν ορισμένα ένζυμα [112].

Leuconostoc mesenteroides

Το *Leuconostoc mesenteroides* είναι ένα βακτηριακό είδος που μερικές φορές συνδέεται με τη ζύμωση, υπό συνθήκες αλατότητας και χαμηλής θερμοκρασίας (όπως η παραγωγή γαλακτικού οξέος σε λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση) [113].

Από τα δεδομένα του Πίνακα(4) δημιουργήσαμε το παρακάτω γράφημα(1):



Γράφημα (1) : Απεικόνιση βακτηριακής σύστασης σε επίπεδο γένους στο παστεριωμένο γάλα, σε μη παστεριωμένο γάλα και στο ξινόγαλα.

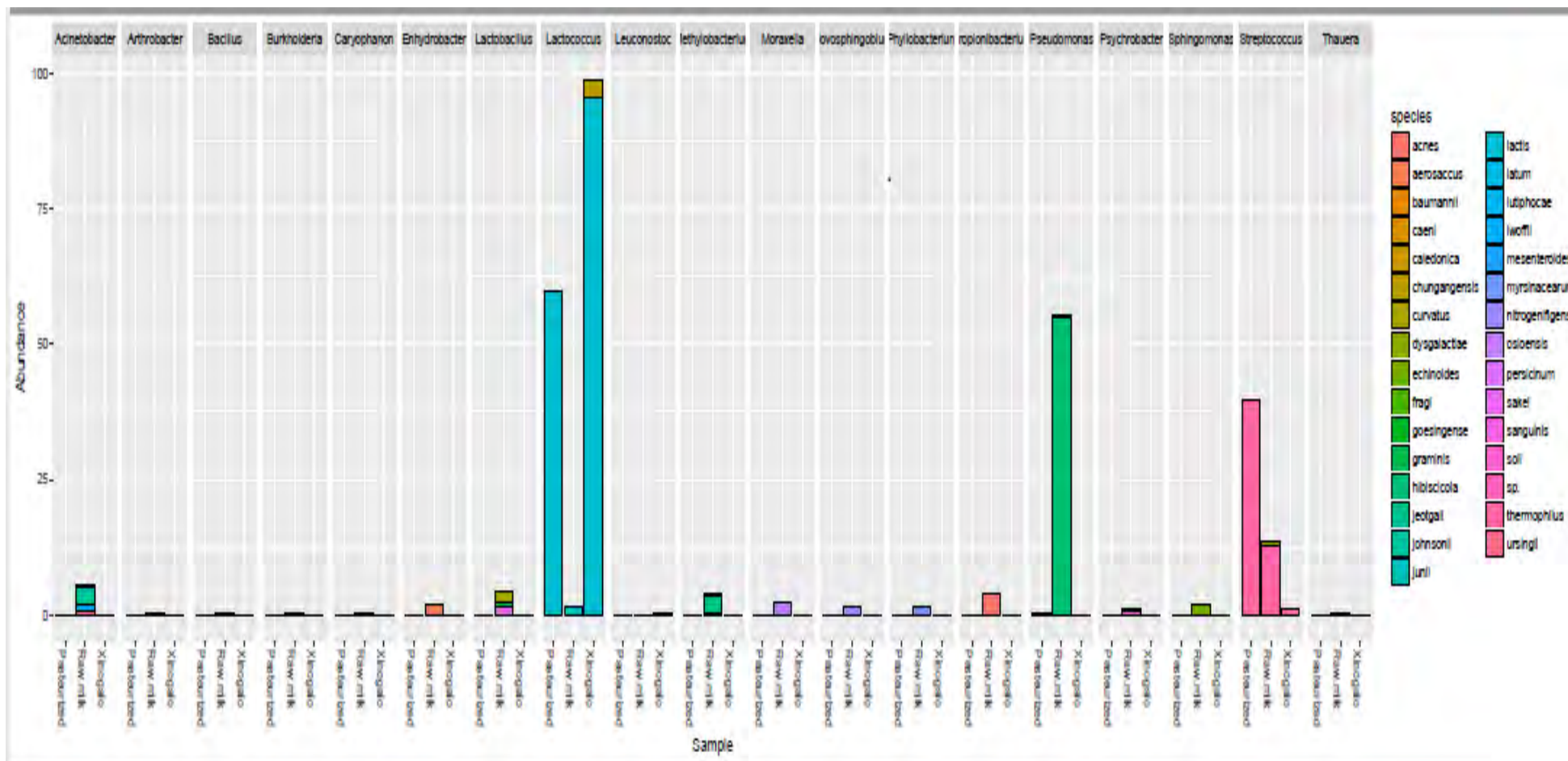
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται τα τρία δείγματα γάλακτος σε ξεχωριστές στήλες. Η κάθε στήλη αποτελείται από διαφορετικά χρώματα. Τα χρώματα που υπάρχουν στην στήλη αντιστοιχούν στα γένη που ανιχνεύθηκαν στο κάθε δείγμα γάλακτος. Στη δεξιά πλευρά του γραφήματος απεικονίζονται τα γένη σε αντιστοιχία με τα χρώματα της κάθε στήλης.

Από τα στοιχεία του παραπάνω γραφήματος διαπιστώνουμε ότι στο παστεριωμένο γάλα επικρατούν τα γένη *Lactococcus* και *Streptococcus* σε μεγάλη αναλογία, στο ξινόγαλα επικρατούν τα γένη *Lactococcus* σε μεγάλη αναλογία, σε μικρότερη αναλογία *Leuconostoc*, *Streptococcus* και στο μη παστεριωμένο γάλα επικρατούν τα γένη *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Methylobacterium*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Sphingomonas*, *Enhydrobacter*, *Lactococcus*, *Phyllobacterium* σε μεγάλη αναλογία και αρκετά γένη σε μικρότερη αναλογία.

Από τα δεδομένα του Πίνακα(4) δημιουργήσαμε το παρακάτω γράφημα(2):

Στο παρακάτω γράφημα η μεγάλη(γκρι)στήλη αντιστοιχεί σε κάθε γένος και αποτελείται από επί μέρους στήλες που απεικονίζουν τα βακτηριακά είδη που ανιχνεύθηκαν στο κάθε δείγμα γάλακτος ξεχωριστά. Τα χρώματα που υπάρχουν στην στήλη αντιστοιχούν στα είδη που ανιχνεύθηκαν στο κάθε δείγμα γάλακτος. Στη δεξιά πλευρά του γραφήματος απεικονίζονται τα είδη σε αντιστοιχία με τα χρώματα της κάθε στήλης.

Από τα στοιχεία του παρακάτω γραφήματος διαπιστώνουμε ότι στο παστεριωμένο γάλα επικρατούν τα βακτηριακά είδη *Lactococcus lactis* και *Streptococcus thermophilus* σε μεγάλη αναλογία το *Pseudomonas hibiscicola* επικρατεί σε μικρή αναλογία, στο ξινόγαλα επικρατούν τα βακτηριακά είδη *Lactococcus lactis* σε μεγάλη αναλογία, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* σε μικρότερη αναλογία και στο μη παστεριωμένο γάλα επικρατούν τα βακτηριακά είδη *Pseudomonas hibiscicola*, *Streptococcus thermophilus* σε μεγάλη αναλογία και αρκετά βακτηριακά είδη σε μικρότερη αναλογία.(Γράφημα 2)



Γράφημα (2) : Απεικόνιση βακτηριακής σύστασης σε επίπεδο είδους στο παστεριωμένο γάλα, στο μη παστεριωμένο γάλα και στο ξινόγαλα

10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα αφορά αποκλειστικά την κανονική έκκριση του μαστού που λαμβάνεται από ένα ή περισσότερα αρμέγματα χωρίς καμία προσθήκη ή αφαίρεση όπως αναφέρει ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας των Ηνωμένων Εθνών. Το γάλα είναι μια πολύ υγιεινή τροφή αλλά πρέπει να έχει ορισμένες προϋποθέσεις. Να προέρχεται από ζώα υγιή και να μην φέρει καμία ξένη ουσία όπως για παράδειγμα τα αντιβιοτικά, τα εντομοκτόνα, τα συντηρητικά και τις τοξίνες μικροοργανισμών. Επίσης να έχει καλή γεύση, οσμή, χρώμα, ιξώδες, οξύτητα. Το γάλα περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό συστατικών από τα οποία μερικά υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες και χαρακτηρίζονται σαν κύρια συστατικά(νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα)ενώ άλλα, βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες και ονομάζονται δευτερεύοντα(λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές βιταμίνες, ένζυμα, ίχνη μετάλλων, βακτήρια, μη πρωτεϊνικές ουσίες και άλλα). Μερικές από τις βιταμίνες της τελευταίας κατηγορίας, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν σε μικρές ποσότητες, έχουν μεγάλη βιολογική αξία. Αν και το γάλα, σύμφωνα με τον ορισμό του, δεν θα πρέπει να περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, πολλές φορές τα εργοστάσια παραλαμβάνουν γάλα με παρόμοιους μικροοργανισμούς. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών που συναντάμε στο γάλα, είναι βακτήρια ενώ σπάνια βρίσκουμε ζύμες και ιούς. Το γάλα από θρεπτική αξία είναι μια πλήρης και άριστη τροφή γιατί περιέχει τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά σε καλή αναλογία και σε μορφή αφομοιώσιμη. Μερικά από αυτά είναι πρωτεΐνες, λίπος, ασβέστιο, φώσφορο, μαγνήσιο, ψευδάργυρο, νάτριο, κάλιο, βιταμίνες C, B1 B2, B12, A [1], [2], [3].

Ως προς τα παραπάνω εύκολα γίνεται αντιληπτή, η μέγιστη σημασία που αποκτά ο έλεγχος, για την διερεύνηση των μικροοργανισμών στις διάφορες κατηγορίες γάλακτος. Ως εκ τούτου απαιτείται η αναγκαιότητα μιας μεθόδου ελέγχου, σύμφωνα με την οποία θα διασφαλίζονται γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Σκοπός της έρευνας ήταν η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των βακτηριακών στελεχών που είχαν απομονωθεί από μη παστεριωμένο, παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών από το μη παστεριωμένο γάλα, παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα, βασίστηκε στην ενίσχυση αλληλουχιών του βακτηριακού 16S rRNA γονιδίου, συγκεκριμένα με τη μέθοδο Multiplex PCR. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν τα δείγματα γάλακτος περιείχαν παθογόνους μικροοργανισμούς με τη χρήση μοριακών δεικτών και συγκεκριμένου γονιδίου. Η διαδικασία στηρίχτηκε στο γονίδιο 16S rRNA το οποίο επιλέχτηκε ως γονίδιο στόχος, λόγω της υψηλής ικανότητας του ταυτοποίησης μεταξύ των ειδών. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου ανάλυσης, βασιζόμενο στο γονίδιο 12S rRNA.

Η ταυτοποίηση των ειδών έδειξε ότι το παστεριωμένο γάλα αποτελείται κατά 77% από *Lactococcus* από τα οποία 23% είναι βακτήρια *Lactococcus lactis*, κατά 22% από *Streptococcus* από τα οποία 15% είναι βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Pseudomonas hibiscicola* σε μικρή αναλογία.

Το *Lactococcus lactis* χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή βουτυρογάλακτος και τυριού αλλά έχει επίσης γίνει διάσημο ως ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος οργανισμός που έχει χρησιμοποιηθεί ζωντανός για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών.

Το *Streptococcus thermophilus* είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βακτήρια στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα στατιστικά στοιχεία του USDA από το 1998 έδειξαν ότι περισσότερα από 1,02 δισεκατομμύρια κιλά τυριού μοτσαρέλα και 621 εκατομμύρια κιλά γιαούρτι παρήχθησαν από το *Streptococcus thermophilus*. Στην πραγματικότητα, το γιαούρτι και το τυρί που περιέχουν ζωντανές καλλιέργειες *Streptococcus thermophilus* θεωρείται ότι είναι επωφελής για την υγεία. Οι ζωντανές καλλιέργειες του *Streptococcus thermophilus* καθιστούν ευκολότερο για τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη να χωνέψουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα βακτηρίδια διασπούν τη λακτόζη, τη ζάχαρη στο γάλα, τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη δυσκολεύονται να αφομοιώσουν.

Το ξινόγαλα αποτελείται κατά 97% από το γένος *Lactococcus* από τα οποία 41% είναι το βακτηριακό είδος *Lactococcus lactis*, 1% είναι το βακτηριακό είδος *Lactococcus chungangensis*, κατά 2% από το γένος *Leuconostoc* και σε μικρή αναλογία τα βακτηριακά είδη *Leuconostoc mesenteroides* και *Streptococcus thermophilus*.

Το *Lactococcus chungangensis* είναι σημαντικό για τη βιομηχανική τυροκομική παραγωγή, καθώς μπορεί να είναι υπεύθυνο για τις ξεχωριστές γεύσεις. Μπορεί επίσης να παρουσιάσει ένα όφελος λόγω της πρόσληψης αλκοόλης από τη δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH). Αποδείχθηκε ότι μειώνει την πρόσληψη αλκοόλης στον ορό ποντικού. Η αποικοδόμηση καζεΐνης είναι ο κύριος πρόδρομος της γεύσης στην παραγωγή τυριού [114].

Το *Leuconostoc mesenteroides* εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια αρκετών φρούτων και λαχανικών. Υπό τις σωστές μικροαερόβιες συνθήκες, το *Leuconostoc mesenteroides* είναι στην πραγματικότητα υπεύθυνο για την έναρξη των διαδικασιών ζύμωσης σε πολλά τυποποιημένα τρόφιμα και συμπεριλαμβάνεται ακόμη στις αρχικές καλλιέργειες διαφόρων ψωμιών και γαλακτοκομικών καλλιεργειών [115]. Το *Leuconostoc mesenteroides* είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο στα φρούτα και τα λαχανικά και γενικά δεν θεωρείται ως λοιμώδης παράγοντας στον άνθρωπο. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες τεκμηριωμένες περιπτώσεις όπου ο *Leuconostoc mesenteroides* έχει πράγματι προκαλέσει ασθένεια στους ανθρώπους [116]. Μια άλλη περίπτωση παρουσιάζεται όπου τα είδη *Leuconostoc* βρίσκονται σε ασθενείς με καρκίνο και σε ασθενείς που

είναι κρίσιμα άρρωστοι, ανοσοκατασταλμένοι ή μη νοσοκομειακοί. Το *Leuconostoc mesenteroides* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο και δεν είναι ευρέως διαδεδομένο σε ασθένειες, αλλά σε πιο πρόσφατα χρόνια, μια μεγάλη ποικιλία διαγνώσεων έχει βρει μολύνσεις μεταξύ ανθρώπων, πράγμα που σημαίνει ότι έχει τη δυνατότητα να μολύνει τους ανθρώπινους ξενιστές. Αυτή τη στιγμή, ο *Leuconostoc mesenteroides* δεν θεωρείται γενικά απειλή, εκτός αν βρίσκεται σε ανοσοκατασταλμένους ξενιστές και οι μελέτες συνεχίζονται. Στο ξινόγαλα ανιχνεύθηκε μεγαλύτερο ποσοστό από το βακτηριακό γένος *Lactococcus* σε σχέση με το παστεριωμένο γάλα.

Το μη παστεριωμένο γάλα αποτελείται κατά 33% από το γένος *Pseudomonas* από το οποίο 18% είναι το βακτηριακό είδος *Pseudomonas hibiscicola*, κατά 32% από το γένος *Streptococcus* από το οποίο 2% είναι το βακτηριακό είδος *Streptococcus thermophilus*, κατά 2% από το γένος *Acinetobacter*, κατά 1% από το γένος *Methylobacterium*, κατά 1% από το γένος *Lactobacillus*, κατά 1% από το γένος *Phyllobacterium* και αρκετά γένη σε μικρότερα ποσοστά.

Το *Pseudomonas hibiscicola* συχνά αποικιώνει σε υγρές επιφάνειες όπως οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται στον μηχανικό εξαερισμό και τους καθετήρες ούρων καθώς και ιατρικές συσκευές όπως καθετήρες αναρρόφησης [117]. Η μόλυνση συνήθως διευκολύνεται από την παρουσία προσθετικού υλικού(πλαστικό ή μέταλλο)και η πιο αποτελεσματική θεραπεία είναι η αφαίρεση του προσθετικού υλικού(συνήθως ένας κεντρικός φλεβικός καθετήρας ή παρόμοια συσκευή). Η ανάπτυξη του *Pseudomonas hibiscicola* σε μικροβιολογικές καλλιέργειες αναπνευστικών ή ουρολογικών δειγμάτων είναι δύσκολο να ερμηνευθεί λόγω της χαμηλής του παθογένειας και όχι ως απόδειξη μόλυνσης[151]. Αν, ωστόσο, αναπτυχθεί από χώρους που κανονικά θα είναι στείροι(π.χ. αίμα), τότε αντιπροσωπεύει συνήθως πραγματική μόλυνση. Σε ανοσοκατασταλτικά άτομα, το *Pseudomonas hibiscicola* είναι μια σχετικά ασυνήθιστη αιτία πνευμονίας, λοίμωξης του ουροποιητικού συστήματος ή μόλυνσης από την κυκλοφορία του αίματος. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ωστόσο, το *Pseudomonas hibiscicola* είναι μια αυξανόμενη πηγή λανθανόντων πνευμονικών λοιμώξεων [118]. Τα ποσοστά αποικισμού *Pseudomonas hibiscicola* σε άτομα με κυστική ίνωση έχουν αυξηθεί [119].

Τα στελέχη *Pseudomonas hibiscicola*, *Prorionibacterium acnes*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Acinetobacter ursingii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fragi*, *Acinetobacter soli*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus sp.* τα οποία ανιχνεύθηκαν στο μη παστεριωμένο γάλα μπορούν να χαρακτηρηστούν ως παθογόνα για τον άνθρωπο.

Το *Prorionibacterium acnes* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο, προκαλώντας σειρά μετεγχειρητικών και σχετιζόμενων με τη συσκευή λοιμώξεων, π.χ., χειρουργική επέμβαση, μετα-νευροχειρουργική λοίμωξη, αρθρικές προθέσεις, απολήξεις και

προσθετικές καρδιακές βαλβίδες. Το *Prorionibacterium acnes* μπορεί να παίζει ρόλο σε άλλες καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής του προστάτη που οδηγεί σε καρκίνο, σύνδρομο SAPHO (Synovitis, Acne, Pustulosis, Hyperostosis, Osteitis), σαρκοείδωση και ισχιαλγία. Υπάρχει επίσης υποψία ότι μια κύρια βακτηριακή πηγή νευροφλεγμονής στους εγκεφάλους της νόσου του Alzheimer.

Το *Acinetobacter* συχνά απομονώνεται σε νοσοκομειακές λοιμώξεις και είναι ιδιαίτερα επικρατέστερο στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Μπορεί να προκαλέσει διάφορες άλλες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων του δέρματος και των πληγών, της βακτηριαμίας και της μηνιγγίτιδας, αλλά ο *Acinetobacter Lwoffii* είναι κυρίως υπεύθυνος για την τελευταία.

Το *Streptococcus dysgalactiae* είναι ένα κοινό παθογόνο που προκαλεί πολυαρθρίτιδα στα ζώα και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα στους ανθρώπους.

Το *Pseudomonas fragi* είναι ένα ψυχοφιλικό Gram-αρνητικό βακτήριο που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Τα *Bacillus sp.* προκαλούν μια σειρά από μολύνσεων, από μολύνσεις αυτιών έως μηνιγγίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και σηψαιμία. Κυρίως εμφανίζονται ως δευτερογενείς λοιμώξεις σε ανοσοανεπαρκείς ξενιστές ή σε άλλου είδους υποβαθμισμένους ξενιστές. Μπορούν να επιδεινώσουν την προηγούμενη λοίμωξη με την παραγωγή τοξινών ή μεταβολιτών και προκαλούν ζημιά στα ιστό και παρεμποδίζουν τη θεραπεία. Η ύπαρξη των ανωτέρω παθογόνων μικροοργανισμών είναι συνηθισμένη στο μη παστεριωμένο γάλα.

Στο μη παστεριωμένο γάλα ανιχνεύθηκαν επίσης μικροβιακά στελέχη σε επίπεδο γένους από τα οποία μερικά είναι παθογόνα (*Staphylococcus*, *Clostridium*).

Ο *Staphylococcus* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο που ζει στο ανθρώπινο σώμα σαν μέρος της φυσικής χλωρίδας του δέρματος, στη μύτη και στην περιοχή γύρω από τα γεννητικά όργανα και στα δύο φύλα. Οι περισσότερες μολύνσεις από σταφυλόκοκκο είναι ακίνδυνες και θεραπεύονται με αντιβιοτικά, ενώ πολλές φορές οι μολύνσεις αυτές είναι τόσο ήπιες που μπορούν να θεραπευτούν χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών.

Τα *Clostridium* είναι, Gram-θετικά, αναερόβια (αν και ορισμένα είδη είναι μικροαερόφιλα). Είναι γνωστό ότι παράγουν μια ποικιλία από τοξίνες, μερικές από τις οποίες είναι θανατηφόρες. Υπάρχουν τρία είδη *Clostridium* που προκαλούν ευρέως αναγνωρισμένες και συχνά θανατηφόρες ασθένειες. Το *Clostridium tetani* είναι ο παράγοντας που προκαλεί τον τέτανο, το *Clostridium botulinum* είναι ο παράγοντας που προκαλεί την αλλαντίαση και το *Clostridium perfringens* είναι ένας από τους παράγοντες που προκαλούν την γάγγραινα.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα πειραματική εργασία είναι ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της παρουσίας

/απουσίας των βακτηριακών στελεχών σε επίπεδο γένους και σε επίπεδο είδος τόσο στο παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα όσο και στο μη παστεριωμένο γάλα.

Η γνώση της αποτελεσματικότητας και της διακριτικής ικανότητας των γενετικών δεικτών που παρουσιάζονται σε αυτή την μεταπτυχιακή διατριβή μπορεί να εφαρμοστεί στην πράξη μελλοντικά, καθώς την καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο των μικροοργανισμών στις διάφορες κατηγορίες γάλακτος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Row.names	Pasteurized	Xinogalo	Raw milk
<i>Pseudomonas_hibiscicola</i>	47	0	2719
<i>Streptococcus_thermophilus</i>	4115	138	640
<i>Propionibacterium_acnes</i>	0	0	193
<i>Methylobacterium_jeotgali</i>	0	0	170
<i>Acinetobacter_johnsonii</i>	0	0	146
<i>Lactobacillus_curvatus</i>	0	0	109
<i>Moraxella_osloensis</i>	0	0	109
<i>Sphingomonas_echinoides</i>	0	0	98
<i>Enhydrobacter_aerosaccus</i>	0	0	95
<i>Lactococcus_lactis</i>	6224	12875	83
<i>Phyllobacterium_myrsinacearum</i>	0	0	81
<i>Lactobacillus_sakei</i>	0	0	67
<i>Novosphingobium_nitrogenifigens</i>	0	0	66
<i>Acinetobacter_lwoffii</i>	0	0	50
<i>Lactobacillus_graminis</i>	0	0	43
<i>Psychrobacter_sanguinis</i>	0	0	32
<i>Acinetobacter_ursingii</i>	0	0	28
<i>Psychrobacter_lutiphocae</i>	0	0	27
<i>Streptococcus_dysgalactiae</i>	0	0	26
<i>Acinetobacter_baumannii</i>	0	0	25
<i>Thauera_sp.</i>	0	0	22
<i>Pseudomonas_caeni</i>	0	0	18
<i>Pseudomonas_fragi</i>	0	0	18
<i>Arthrobacter_sp.</i>	0	0	16
<i>Acinetobacter_soli</i>	0	0	13
<i>Caryophanon_latum</i>	0	0	13
<i>Burkholderia_caledonica</i>	0	0	12
<i>Methylobacterium_goesingense</i>	0	0	12
<i>Acinetobacter_junii</i>	0	0	11
<i>Bacillus_sp.</i>	0	0	11
<i>Methylobacterium_persicinum</i>	0	0	11
<i>Lactococcus_chungangensis</i>	0	407	0
<i>Leuconostoc_mesenteroides</i>	0	49	0

Πίνακας(4) : Αριθμός βακτηριακών στελεχών που ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους σε δείγματα γάλακτος παστεριωμένου, ξινόγαλα και μη παστεριωμένου

sample ID	sample	Total reads	valid reads	reads ignored	Mapped reads in sample	Un-Mapped reads in sample
16S010S1_v1_017	Row milk	70801	47403	19041	28362	0
16S010S2_v1_018	pasteurized milk	59795	38237	10707	27530	0
16S010S5_v1_021	xinogalo	64690	40999	9433	31566	1

Πίνακας (5) : Αριθμός συνολικών reads σε μη παστεριωμένο γάλα , παστεριωμένο γάλα και ξινόγαλα

Pasteurized milk												
Primer name	mapped reads	valid reads	low copy number reads	un-mapped reads	forward found	forward full coverage	forward short	forward valid reads	reversed found	reversed full coverage	reversed short	reversed valid reads
V2	1500	2341	841	0	1892	633	0	633	3131	1708	0	1708
V3	7563	10278	2715	0	8096	5233	0	5233	7565	5045	0	5045
V4	4784	6674	1890	0	5694	4580	0	4580	3890	2094	0	2094
V67	4782	6589	1807	0	3537	2587	0	2587	5360	4002	0	4002
V8	8901	12354	3453	0	8880	6280	0	6280	8780	6074	0	6074
V9	0	1	1	0	2	0	0	0	40	1	0	1

Πίνακας (6) : Αριθμός reads ανά εκκινητή σε παστεριωμένο γάλα

xinogalo													
Primer name	mapped reads	valid reads	low copy reads	un-mapped reads	forward reads	forward reads	forward reads	forward reads	reversed reads	reversed reads	reversed reads	reversed reads	reversed reads
V2	642	1097	455	0	837	344	0	344	1616	753	0	753	
V3	13068	16579	3511	0	14176	9214	0	9214	12386	7365	0	7365	
V4	3194	4197	1003	0	3133	2535	0	2535	2384	1662	0	1662	
V67	7897	10100	2203	0	5051	3671	0	3671	8359	6429	0	6429	
V8	6740	8993	2253	0	6812	4674	0	4674	6120	4319	0	4319	
V9	25	33	8	0	73	21	0	21	37	12	0	12	

Πίνακας (7) : Αριθμός reads ανά εκκινητή σε ξινόγαλα

Primer name	mapped reads	valid reads	low copy number reads	un-mapped reads	forward found	forward full coverage	forward short	forward valid reads	reversed found	reversed full coverage	reversed short	reversed valid reads
V2	1301	3095	1794	0	1741	1322	0	1322	2556	1773	0	1773
V3	11092	17199	6107	0	13929	8835	0	8835	12341	8364	0	8364
V4	6201	10169	3968	0	7665	6261	0	6261	5976	3908	0	3908
V67	2512	5214	2702	0	3108	2309	0	2309	3621	2905	0	2905
V8	6963	11250	4287	0	7601	5746	0	5746	8061	5504	0	5504
V9	293	476	183	0	367	314	0	314	241	162	0	162

Πίνακας (8) : Αριθμός reads ανά εκκινητή σε μη παστεριωμένο γάλα

Rhizobium
Staphylococcus
Janthinobacterium
Bradyrhizobium
Methylocapsa
Butyrivibrio
Rhodopseudomonas
Methyloferula
Rhodococcus
Clostridium
Paracoccus

Πίνακας (9): Βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο γένους στο μη παστεριωμένο γάλα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Ανυφαντάκης Ε.(2004): Τυροκομία(Εκδόσεις Σταμούλης).
- 2.ΚΤΠ 2014 , Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης Μέρος Α΄, Τρόφιμα και Ποτά Άρθρο 80 , Είδη Γάλακτος Εθνικό Τυπογραφείο. Αθήνα
- 3.FAO / WHO, 2011 . Codex General Standard for the Use of Dairy Terms .Codex STAN 206-1999. In: FAO/WHO Codex Alimentarius, Milk and Milk Products, 2nd Ed. Rome. p.p 176-179
- 4.Μάντης Α.(2000): Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. (Εκδόσεις Κυριακίδη).
- 5.Ανυφαντάκης Ε. & Καλαντζόπουλος Γ.(1993): Γαλακτοκομία, Α΄ και Β΄ Τόμοι (Εκδόσεις Σταμούλης).
- 6.Χημεία και τεχνολογία τροφίμων .Θεοφάνης Γεωργόπουλος. Τμήμα διατροφής και διαιτολογίας.
- 7.Μάντης Α. Ι., 2001. " Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του " . Εκδοτικός οίκος Αδελφ. Κυριακίδη
- 8.Walstra P., Wouters J.T.M. & Geurts T.J.(2006). Dairy Science and Technology. 2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- 9.McCarthy, O.J., 2011. Physical and physico-chemical properties of milk. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. 9eds), Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3, 2nd Ed. Elsevier, London. pp. 467-477.
- 10.Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, Γ΄ Έκδοση Αντωνίου Ι. Μαντή, καθηγητή του Α.Π.Θ. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. 2000
- 11.Χημεία και ανάλυση του γάλακτος, Εμμ. Μιχ. Ανυφαντάκη, Εκδόσεις Α. Σταμούλης Αθήνα-Πειραιάς 1994
- 12.Walstra P., Wouters J.T.M. & Geurts T.J.(2006). Dairy Science and Technology. 2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- 13.Μαντής Α., Παπαγεωργίου Δημ., Φλετούρης Δημ., Αγγελίδης Αποστ. «Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του». Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ. Αφοί Κυριακίδη, Εκδόσεις Α.Ε. Θεσσαλονίκη.
- 14.Miller, G.D., Jarvis, J.K., and McBean, L.D., 2007. The importance of milk and milk products in the diet. In: Miller, G.D. Jarvis, J.K., and McBean, L.D. (eds), Handbook of Dairy Foods and Nutrition, 3rd Ed. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL. pp. 1-53.
- 15.Gaucheron, F., 2013. Milk minerals, trace elements and macroelements. In: Park, Y.W., and Haenlein, G.F.W. 9 eds), Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, 1st Ed. John Wiley & Sons, Ltd., New York. pp. 172-199.
- 16.Hambraeus L.(1992) Nutritional aspects of milk proteins. In: Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins. Edited by P.F. Fox. Elsevier Science Publishers, Essex, England. pp. 457-490.

17. Walstra P. & Jenness R. (1984). Dairy Chemistry and Physics. Wiley Interscience Publications.
18. Miller G.D., Jarvis J.K. & McBean L.D. (2000). Handbook of Dairy Foods and Nutrition
19. Huppert T., Patrick F. Fox, Alan L. "Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk". (2001)
20. Csapo – Kiss, J. Stefler, T.g. Martin, S. Makray, J. Csapo (2004) "Composition of Colostrum and milk protein content amino acid composition and contents of macro and micro elements, Zs".
21. Kurtz F.E, 1974. "The lipids of milk. Composition and properties". In Fundamentals of dairy chemistry, 2nd edition. AVI Publ. Co. Westport Conn.
22. Πανέτσος Αχιλ. Γ. <<Υγιεινή τροφίμων ζωϊκής προελεύσεως>>, έκδοση τέταρτη, Θεσσαλονίκη 1978
23. Μαντζουράνη Σ. Ιωάννα " Μικροβιολογία Νωπού γάλακτος " Διδάκτορας Δημοκρίτιου Πανεπιστημίου Θράκης.
24. Hubble, I. B. & Manners, J.G., " The Contaminant Quality of Farm Milk in Australian Journal of Dairy Technology , 1985 , December , p. 143-151
25. Gorris LGM (2005) Food safety objective: An integral part of food chain management Food Control 16:801-809
26. Gray M. L. Amer J. Pub. Health, 53, 554-63
27. Zall Robert: The microbiology of milk, Second Edition, Pages 115-163, Control and destruction of microorganisms (1990).
28. Μανωλκίδης Κωνσταντίνος: Γαλακτοκομία, Vol I. Τεχνολογία του γάλακτος, Θεσσαλονίκη (1983)
29. Παπαγεωργίου Δημήτρης: Εφαρμογή του συστήματος HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) στη γραμμή παραγωγής του τυριού φέτα (2003)
30. Ρογδάκης Εμμανουήλ: Φυσιολογία αποδώσεων αγροτικών ζώων III Γαλακτοπαραγωγή (1995)
31. Ανθυγιεινά Ακατάλληλα Γάλατα, Δρ. Μανώλης Κοκκινάκης (Σε συνεργασία με το εργαστήριο κλινικής βακτηριολογίας παρασιτολογίας ζωνόσων και γεωγραφικής Ιατρικής του πανεπιστημίου κρήτης), 2004
32. Μάθημα εφαρμοσμένης μικροβιολογίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (τόμοι Α' και Β'), Γιώργος Καλατζόπουλος, Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης 1999
33. Γαλακτοκομία 1 και 2 Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Κων/νου Μανωλκίδη, Εκδοτικός οίκος Αφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1983
34. Γάλα καλής ποιότητας – Παραγωγή και έλεγχος, Ε. Μιχ. Ανυφαντάκης, Εθνική επιτροπή Γάλακτος Αθήνα 1987

- 35.Κανονισμός (ΕΚ) αριθ . 2073/2005 ης επιτροπής της 15 ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ) (ΕΕ L 338 της 22.12.2005, σ .1)
- 36.Ο ισχύον σχετικός κανονισμός είναι ο (ΕΚ) αριθ. 853/2004 ενώ τα ειδικά κριτήρια ποιότητας για το νωπό γάλα ορίζονται στο κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1662/2006.
- 37.Κεχαγιάς Χρήστος (2011), «Γάλα – επιστήμη, τεχνολογία και έλεγχοι για τη διασφάλιση της ποιότητας», Εκδοτικός όμιλος Ίων, Περιστέρι – Αθήνα.
- 38.Lewis, M.L. and Deeth, H.C., 2009. Heat treatment of milk. In “Milk Processing and Quality Management”. A.Y. Tamime, ed., Black-Well Publ. Ltd.
- 39.Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A. & Van Boeckel M.A.J.S. (1999). Dairy Technology – Principles of Milk Properties and Processes. Εκδόσεις: Marcel Dekker Inc.
- 40.Food Standards Agency (2008). The Manual of Nutrition, 11th ed. U.K.
- 41.Παπανδρέου Θ., Νικολάου Ν., Τζωρτζάκη Ε. <<Βιολογική εκτροφή ζώων>>,2007.
- 42.Καμιναρίδης Στ., Μοάτσου Γκ., (2009). «Γαλακτοκομία». Εκδόσεις: Έμβρυο. Ιερά οδός – Αιγάλεω.
- 43.Fanourakis N., H. Pavlikaki and C.P. Navarro, 2004. Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. Euphytica Plant breeding 136: 143-147
- 44.Χατζόπουλος Π. 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ και Πολυδεύκης Χατζόπουλος , Δεύτερη έκδοση 2004.
- 45.Botstein, D., K. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.*Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331
- 46.Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- 47.Mullis, K., Fallona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.
- 48.Mohd Hazim, M. Y., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Abdul, O., & Nur Fadhilah, K. M.(2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B gene by molecular beacon probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5, 422–429
- 49.Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhambazov, B., Prabakaran, D., and Uma, L. (2006). Molecular characterization of marine Cyanobacteria from the Indian subcontinent deduced from sequence analysis of the phycocyanin operon(*cpcb-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS region. *J. Microbiol. Seoul Korea* 44, 607–616.
- 50.Crosbie, N.D., Pöckl, M., and Weisse, T.(2003). Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5716–5721.

51. Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., and Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *64*, 346–351.
52. Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 3327–3332.
53. Salomon, P.S., Janson, S., and Granéli, E. (2003). Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae* *2*, 261–272.
54. Wilmotte, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D.A. Bryant, ed. (Springer Netherlands), pp. 1–25.
55. Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* *51*, 221–271.
56. Ludwig, W., and Klenk, H.-P. (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, (Springer), pp. 49–65.
57. Staley, J.T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *361*, 1899–1909.
58. Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. (1994). Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *44*, 846–849.
59. Komárek, J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* *639*, 245–259.
60. Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C., and Fields, C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *45*, 595–599.
61. Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., and Young, J.P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 2037–2048.
62. Krieg, N.R. (2005). Identification of prokaryotes. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, (Springer), pp. 33–38.
63. Strackebrandt, E., and Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revised: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* *33*, 152–155.
64. Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., and Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* *14*, 60.
65. Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., and Lim, Y.-W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *57*, 2259–2261.

- 66.Seo, P.-S., and Yokota, A.(2003). The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpod1* gene sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49, 191–203.
- 67.Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – A laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press.
- 68.Helling RB, Goodman HM., Boyer HW. 1974. Analysis of endonuclease R EcoRI fragments of DNA from Lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14:1235-1244.
- 69.ThermoFisher SCIENTIFIC, Ion Torrent. 16S rRNA Sequencing An integrated research solution for bacterial identification using 16S rRNA sequencing on the Ion PGM™ System with Ion Reporter™ Software
- 70.Ondov BD, Bergman NH, and Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics.* 2011 Sep 30; 12(1):385.
- 71.McMurdie and Holmes(2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE.* 8(4):e61217
- 72.Palleroni N, Bradbury J(1993). "Stenotrophomonas, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983". *Int J Syst Bacteriol.* 43 (3): 606–9. PMID 8347518. doi:10.1099/00207713-43-3-606.
- 73.Berg G, Roskot N, Smalla K (1999). "Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*". *J Clin Microbiol.* 37(11): 3594–600. PMC 85701 . PMID 10523559.
- 74.Courtin, P.; Rul, F. O. (2003). "Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model". *Le Lait.* 84: 125–134. doi:10.1051/lait:2003031.
- 76.Kiliç, AO; Pavlova, SI; Ma, WG; Tao, L(1996). "Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt". *Applied and Environmental Microbiology.* 62 (6): 2111–6. PMC 167989 . PMID 8787408.
- 77.Bhatia, Ajay; Maisonneuve, Jean-Francoise; Persing, David H.(2004-01-01). *PROPIONIBACTERIUM ACNES AND CHRONIC DISEASES*. National Academies Press (US).
78. LPSN bacterio.net
- 79.Asalam, Z; Lee, CS; Kim, KH; Im, WT; Ten, LN; Lee, ST(March 2007). "Methylobacterium jeotgali sp. nov., a non-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57(Pt 3): 566–80.PMID 17329786. doi:10.1099/ij.s.0.64625-0.
- 81.Ma, Bing; Forney, Larry J.; Ravel, Jacques(20 September 2012). "Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease". *Annual Review of Microbiology.* 66

(1):371–389. ISSN 0066-4227. PMC 3780402 . PMID 22746335. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150157.

82. Fettweis, JM; Brooks, JP; Serrano, MG; Sheth, NU; Girerd, PH; Edwards, DJ; Strauss, JF; Jefferson, KK; Buck, GA(2014). "Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry". *Microbiology*. 160 (Pt 10): 2272–82. PMC 4178329. PMID 25073854. doi:10.1099/mic.0.081034-0.

83. Madigan M, Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.

84. Integr8 - Species search results:

85. Mergaert, J. (2002). "Phyllobacterium myrsinacearum (subjective synonym Phyllobacterium rubiacearum) emend". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 (5): 1821. doi:10.1099/ijs.0.02150-0.

86. Parte, A.C. "Novosphingobium". www.bacterio.net.

87. "Novosphingobium nitrogenifigens". www.uniprot.org.

88. "Details: DSM-19370". www.dsmz.de.

89. Addison, S. L.; Foote, S. M.; Reid, N. M.; Lloyd-Jones, G. (1 November 2007). "Novosphingobium nitrogenifigens sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater". *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 57 (11): 2467–2471. PMID 17978201. doi:10.1099/ijs.0.64627-0.

90. Ku, SC; Hsueh, PR; Yang, PC; Luh, KT (July 2000). "Clinical and microbiological characteristics of bacteremia caused by *Acinetobacter lwoffii*". *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 19 (7): 501–5. PMID 10968320. doi:10.1007/s100960000315.

91. Wirth, S. E.; Ayala-Del-Río, H. L.; Cole, J. A.; Kohlerschmidt, D. J.; Musser, K. A.; Sepúlveda-Torres Ldel, L. D. C.; Thompson, L. M.; Wolfgang, W. J. (2011). "Psychrobacter sanguinis sp. nov., recovered from four clinical specimens over a 4-year period". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

92. Bowman, J. P. (2006). "The Genus *Psychrobacter*". *The Prokaryotes*. pp. 920–930. ISBN 978-0-387-25496-8. doi:10.1007/0-387-30746-X 35

93. Nemeč, A.; De Baere, T.; Tjernberg, I.; Vaneechoutte, M.; van der Reijden, T.; Dijkshoorn, L. (2001). "*Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 (5): 1891–1899. ISSN 1466-5026. PMID 11594623. doi:10.1099/00207713-51-5-1891.

94. Horii, Toshinobu; Tamai, Kiyoko; Mitsui, Mayumi; Notake, Shigeyuki; Yanagisawa, Hideji (2011). "Blood stream infections caused by *Acinetobacter ursingii* in an obstetrics ward". *Infection, Genetics and Evolution*. 11 (1): 52–56. ISSN 1567-1348. doi:10.1016/j.meegid.2010.10.011.

95. Yassin, A. F.; Busse, H. -J. (2009). "Psychrobacter lutiphocae sp. nov., isolated from the faeces of a seal". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (8): 2049. PMID 19605717. doi:10.1099/ijs.0.008706-0.
96. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
97. Brandt, CM; Spellerberg, B1 (September 2009). "Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*". *Clinical Infectious Diseases*. 49 (5): 766–72. PMID 19635028. doi:10.1086/605085.
98. Antunes, LCS; Visca, P; Towner, KJ (2014). "Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen". *Pathogens and Disease*. 71 (3): 292–301. PMID 24376225. doi:10.1111/2049-632X.12125.
99. Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James T. (eds.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. New York, New York: Springer. ISBN 978-0-387-24145-6.
100. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, 59, 2594-2598.
101. Pereira, JN & Morgan, ME (Dec 1957). "Nutrition and physiology of *Pseudomonas fragi*". *J Bacteriol*. 74 (6): 710–3. PMC 289995 . PMID 13502296.
102. Pellegrino, F. L. P. C.; Vieira, V. V.; Baio, P. V. P.; Dos Santos, R. M. R.; Dos Santos, A. L. A.; Santos, N. G. D. B.; Meoas, M. M. G. L.; Santos, R. T.; De Souza, T. C.; Da Silva Dias, R. C.; Santoro-Lopes, G.; Riley, L. W.; Moreira, B. M. (2011). "Acinetobacter soli as a Cause of Bloodstream Infection in a Neonatal Intensive Care Unit". *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (6): 2283–2285. PMC 3122775 . PMID 21525230. doi:10.1128/JCM.00326-11.
103. Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt (Hrsg.) *The Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria*. 3. Auflage, Bd. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer-Verlag, New York u. a. O., 2006, ISBN 978-0-387-25493-7.
104. Rummel, Patrice Dion, Chandra Shekhar Nautiyal, editors ; foreword by John D. (2008). *Microbiology of extreme soils*. Berlin: Springer.
105. Linde HJ, Hahn J, Holler E, Reischl U, Lehn N (July 2002). "Septicemia due to *Acinetobacter junii*". *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (7): 2696–7. PMC 120562 . PMID 12089313. doi:10.1128/jcm.40.7.2696-2697.2002. Retrieved 2013-07-18.
106. Cayo, R.; Yanez San Segundo, L.; Perez del Molino Bernal, I. C.; Garcia de la Fuente, C.; Bermudez Rodriguez, M. A.; Calvo, J.; Martinez-Martinez, L. (2010). "Bloodstream infection caused by *Acinetobacter junii* in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic haematopoietic cell transplantation". *Journal of Medical Microbiology*. 60 (3): 375–377. ISSN 0022-2615. doi:10.1099/jmm.0.024596-0.
107. Henao-Martínez AF, González-Fontal GR, Johnson S (June 2012). "A case of community-acquired *Acinetobacter junii-johnsonii* cellulitis". *Biomédica*. 32 (2):

- 179–81. PMID 23242290. doi:10.1590/S0120-41572012000300004. Retrieved 2013-07-18.
108. Turnbull PCB(1996). Baron S; et al., eds. Bacillus. In: Barron's Medical Microbiology (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 978-0-9631172-1-2.
- 109.PSN bacterio.net
- 110.Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
- 111.Kato, Y; Asahara, M; Goto, K; Kasai, H; Yokota, A (May 2008). "Methylobacterium persicinum sp. nov., Methylobacterium komagatae sp. nov., Methylobacterium brachiatum sp. nov., Methylobacterium tardum sp. nov. and Methylobacterium gregans sp. nov., isolated from freshwater.". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58 (Pt 5): 1134–41. PMID 18450702. doi:10.1099/ijs.0.65583-0.
- 112.Cho, SL et al. Lactococcus chungangensis sp. nov., ένα βακτήριο γαλακτικού οξέος που απομονώνεται από ενεργό αφρό λάσπης. "International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008), 58, 1844-1849. DOI 10.1099 / ijs.0.65527-0.
- 113.Type strain of Leuconostoc mesenteroides at BacDive - the Bacterial Diversity Metadatabase
- 114.Konkit, M et al. "Transcriptomic analysis of Lactococcus chungangensis sp. nov. and its potential in cheese making." Journal of Dairy Science (2014), 97, 7362-7372. DOI 10.3168/jds.2014-8299.
- 115.Server-Busson, C., C. Foucaud, and J.-Y. Leveau. 1999. Selection of Dairy Leuconostoc Isolates for Important Technological Properties. J. Dairy Res. 66: 245-5.
- 116.Albanese A, Spanu T, Sali M, et al. Molecular identification of Leuconostoc mesenteroides as a cause of brain abscess in an immunocompromised patient. J Clin Microbiol. 2006;44:3044–5.
- 117.Chang, Ya Ting; Lin, Chun Yu; Chen, Yen Hsu; Hsueh, Po-Ren(2015-01-01). "Update on infections caused by Stenotrophomonas maltophilia with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options". Infectious Diseases. 6: 893. PMC 4557615 . PMID 26388847. doi:10.3389/fmicb.2015.00893.
- 118.McGowan J(2006). "Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum". Am J Med. 119 (6 Suppl 1): S29–36; discussion S62–70. PMID 16735148. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.014.
- 119.Waters V, Gómez M, Soong G, Amin S, Ernst R, Prince A(2007). "Immunostimulatory properties of the emerging pathogen Stenotrophomonas maltophilia". Infect Immun. 75 (4): 1698–703. PMC 1865680 . PMID 17220304. doi:10.1128/IAI.01469-06.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ:

120.http://www.elgo.gr/images/pdf/publications/demeter_magazine/dmtr5p4-7.pdf

121.<http://www.agroepirus.gr/eagro/farmers/articles/article.jsp?context=9104&articleid=6204>

<https://www.teilar.gr/dbData/ProfAnn/profann-e8d2689a.pdf>

https://www.irantousis.gr/02_TEXNOLOGIA_B! TAKSIS/04_grapti_ergasia_b/07_elgal.pdf

<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/emt/files/Lectures%20o%20Microbiology1%202009.pdf>

<http://www.patris.gr/articles/59257/23302?PHPSESSID>

<http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/>

<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>

