

**Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής
Ανάπτυξης**

Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών

**Απομόνωση και ταυτοποίηση
βιοπροστατευτικών καλλιεργειών
οξυγαλακτικών βακτηρίων**

**Δρ. Ιωάννης Δ. Σακαρίδης
Κτηνίατρος, MSc, PhD**

A microscopic view of numerous white, rod-shaped bacteria, likely Bacillus subtilis, arranged in a dense cluster. The bacteria are elongated and have rounded ends. The background is a light blue gradient. The word "Εισαγωγή" is overlaid in the center in a bold, black, sans-serif font.

Εισαγωγή



Προβιοτικά ή Probiotic


Pro = υπέρ, προς όφελος

Biotic = βιοτικός, ζωή



Προβιοτικά

- **Λακτοβάκιλλοι** (*Lactobacillus acidophilus*, *L. Gasseri*, *L. Johnsonii*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. Helveticus*, *L. paracasei* subsp. *Paracasei*, *L. Casei*, *L. Plantarum*, *L. GG*, *L. Rhamnosus*, *L. Curvatus*, *L. Brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. Cellobiosus*)
- **Λακτόκοκκοι** (*L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. lactis* subsp. *Cremoris*)
- **Leuconostoc** (*Leu. mesenteroides* subsp. *Dextranicus*)
- **Στρεπτόκοκκοι** (*Streptococcus thermophilus*)
- **Εντερόκοκκοι** (*Enterococcus faecium*, *E. Faecalis*)
- **Πεδιόκοκκοι** (*Pediococcus acidilactici*)
- **Προπιονικά βακτήρια** (*Propionibacterium freudenreichii*)
- **Bifidobacteria** (*Bifidobacterium bifidum*, *B. Infantis*, *B. Longum*, *B. Breve*, *B. Adolescentis*)
- **Ζύμες** (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. Boulardii*)



Κριτήρια επιλογής προβιοτικών για διατροφικά πρόσθετα

1. Να είναι ανθρώπινης προέλευσης
 2. Να είναι αποδεκτά ως ασφαλή (GRAS)
 3. Να αντέχουν σε χαμηλό pH (γαστρικό υγρό)
 4. Να αντέχουν στα χολικά άλατα και στη φαινόλη
 5. Να προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του ανθρώπου
 6. Να αποικίζουν το έντερο του ανθρώπου
 7. Να έχουν ευεργετικές δράσεις
 8. Να γίνεται επιβεβαίωση με κλινικές μελέτες
- (Τζανετάκης, 2003)



Σταθερότητα και βιοτεχνικές ιδιότητες

1. Να είναι ζωτικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής του προϊόντος
2. Να προσδίδουν απαλή οξύτητα
3. Να διατηρούν καλό άρωμα μετά τη ζύμωση
4. Να έχουν καλή διατήρηση-σταθερότητα στα ζυμωμένα προϊόντα
5. Να έχουν σταθερότητα στην κατάψυξη και ξήρανση
6. Να γίνεται σωστή ταυτοποίηση του είδους με φαινοτυπικές και γενοτυπικές μεθόδους

(Τζανετάκης, 2003)

Ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών

- Αντιμικροβιακές δράσεις (παρεμπόδιση ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών)
- Βιοχημικές δράσεις (ανακούφιση δυσανοχής στη λακτόζη, μείωση χοληστερόλης, αντιυπερτασική δράση, κ.α.)
- Φυσιολογικές δράσεις (διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, αντιμετώπιση των αλλεργιών κ.α.)



Διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Κοτόπουλο



Έχει κερδίσει την προτίμηση των καταναλωτών χάρη στην:

- Υψηλή διαιτητική αξία
 - Χαμηλή τιμή
- Ικανότητα προσαρμογής



Συχνά υπεύθυνο τρόφιμο πρόκλησης τροφιογενών διαταραχών



Σφάγια ορνιθίων μολυσμένα με:

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*,
Campylobacter spp., *Clostridium* spp.,
Staphylococcus aureus κ.α.

Αυτό αποδίδεται:

- στην εντατική εκτροφή των ορνίθων
- στη δυνατότητα της μόλυνσής τους κατά τη διάρκεια της γραμμής σφαγής
- στην πλημμελή τήρηση των κανόνων Ο.Β.Υ.Π. κατά την παρασκευή των παραγόμενων προϊόντων που έχουν ως βάση το κρέας κοτόπουλου





Μέθοδοι για μείωση επίπεδου μόλυνσης σφαγίων ορνιθίων:

- Φυσικές μέθοδοι (Θερμό νερό, ατμός, αερόψυξη, ακτινοβοληση, χρήση υπερήχων κ.α.)
- Χημικές μέθοδοι (οργανικά οξέα, χλωριούχες και φωσφορικές ενώσεις κ.α.)
- Βιοπροστασία




Βιοπροστασία

Ενοφθαλμισμός τροφίμου με βιοπροστατευτικές καλλιέργειες βακτηρίων ικανών να αναστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Rodgers, 2001)

Βιοπροστατευτικές καλλιέργειες:

- Αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις
- Επιμήκυνση διάρκειας συντήρησης
- Ανεπηρέαστες οργανοληπτικές ιδιότητες (Lucke, 2000)

A vertical strip on the left side of the slide shows a microscopic view of Lactobacillus bacteria. The bacteria are rod-shaped and appear in various orientations, some overlapping. They are illuminated with a blue-green light, giving them a glowing appearance against a dark background.

Τα [οξυγαλακτικά βακτήρια](#) αποτελούν
ιδανική επιλογή ως βιοπροστατευτικές
καλλιέργειες γιατί:

- Μέρος της χλωρίδας των περισσότερων τροφίμων
- Μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας ανθρώπων και ζώων
- Μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης
(Maragkoudakis et al., 2009)



Αντιμικροβιακή δράση οξυγαλακτικών βακτηρίων

- διατροφικός ανταγωνισμός
- παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών (οργανικά οξέα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διακετύλιο, αντιμικροβιακά ένζυμα, βακτηριοσίνες και ρευτερίνη)
(Ray and Bhunia, 2008)

A microscopic view of numerous rod-shaped bacteria, likely Bacillus or Clostridium species, arranged in a dense, overlapping cluster. The bacteria are light blue or cyan in color, with a slightly textured surface. The background is a soft, out-of-focus light blue. The entire image is framed by a dark blue border.

Υλικά και μέθοδοι

Δειγματοληψία

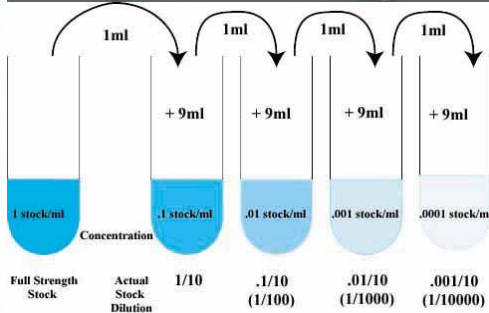
- 4 πτηνοσφαγεία Β. Ελλάδας
- Δειγματοληψίες μετά τη σφαγή
- 10g δέρματος τραχήλου
- Κάθε δείγμα: 25g δέρματος τραχήλου, από 3 σφάγια ορνιθίων (EN/ISO 17604:2003)



Οξυγαλακτικά βακτήρια

- Αριθμός δειγμάτων = 100 (300 σφάγια)
- Μέθοδος αναστολής διπλής επίστρωσης
- Επιλογή ψυχρότροφων οξυγαλακτ. βακτηρίων
- Ανίχνευση παραγωγής βιογενών αμινών (HPLC)
- Βιοχημική ταυτοποίηση (API 50 CH)
- Μοριακή ταυτοποίηση (Αλληλούχιση της ISR περιοχής, HRM analysis)





Απομόνωση

Δείγμα (25 g)



Ομογενοποίηση: 225ml Peptone dilution water (2 min)
Αναζωογόνηση: θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min



4 δεκαδικές αραιώσεις
Ενοφθαλμισμός MRS agar
Επάση στους 7°C για 10-15 μέρες



Επιλογή τρυβλίων MRS agar
με 10-30 αποικίες.

Μέθοδος αναστολής διπλής επίστρωσης

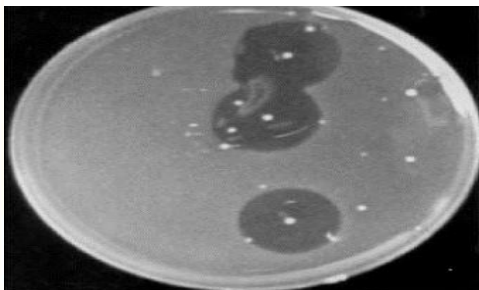
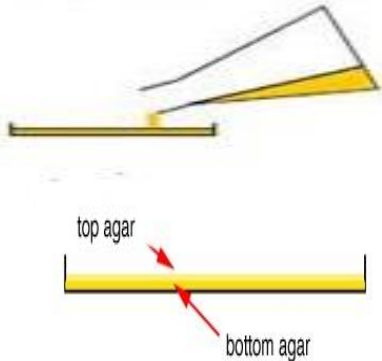
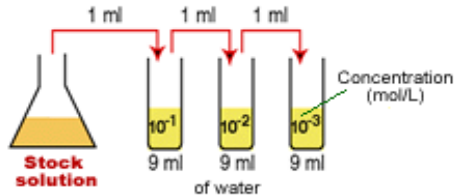
Salmonella spp. σε BHI
37°C για 48 ώρες

Listeria monocytogenes σε BHI
37°C για 48 ώρες

3 δεκαδικές αραιώσεις
Ενοφθαλμισμός σε 15 ml ημίρρευστου BHI agar

Επικάλυψη των MRS agar με τις 10-30 αποικίες
οξυγαλακτικών με το ημίρρευστο BHI agar με
Salmonella και *Listeria*
Επώαση στους 37°C για 48 ώρες

Επιλογή οξυγαλακτικών αποικιών από το MRS agar
που εμφάνιζαν ζώνη αναστολής





Επιλογή ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων

- Gram(+), καταλάση (-), οξειδάση(-)
- Επώαση στους 7°C για 10 – 15 μέρες

Ανίχνευση παραγωγής βιογενών αμινών

- Προσθήκη 2‰ ιστιδίνη και τυροσίνη σε MRS broth
- Ενοφθαλμισμός του MRS broth
- Επώαση στους 20°C για 72 ώρες
- Ανίχνευση παραγωγής ισταμίνης και τυραμίνης με HPLC

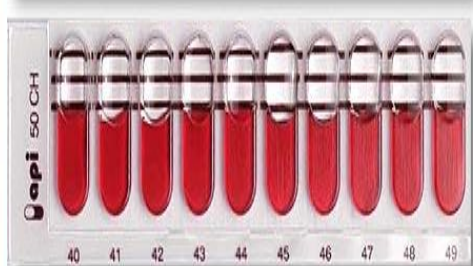
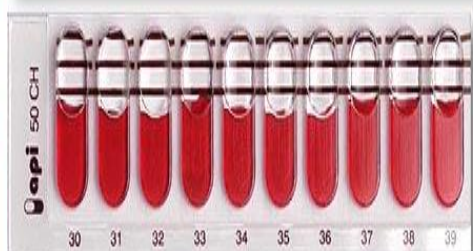
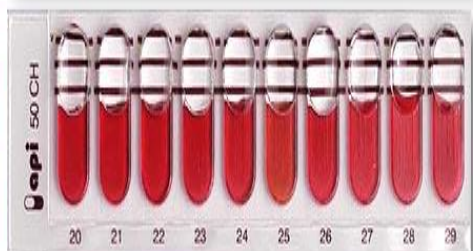
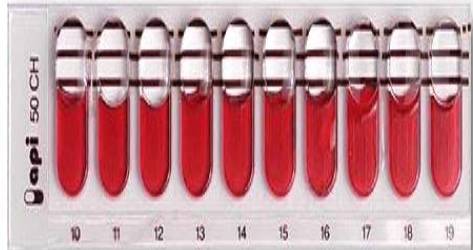
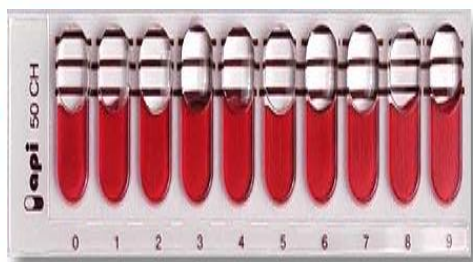


Βιοχημική ταυτοποίηση

API 50 CH biochemical test strip (Ζύμωση 49 υδατανθράκων)

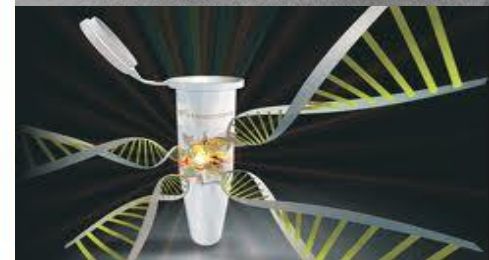
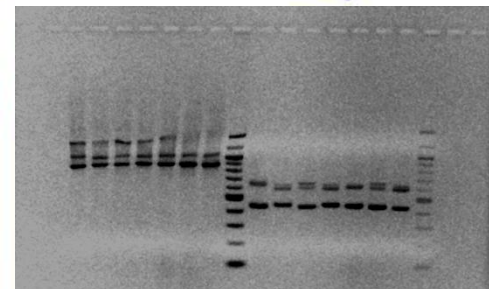
Επιλέχτηκαν για εξέταση τα 50 αποτελεσματικότερα στελέχη με βάση:

- διάμετρο ζώνης αναστολής
- ικανότητα ανάπτυξης στους 7°C
- συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των παθογόνων



Μοριακή ταυτοποίηση

- Ένα στέλεχος από κάθε είδος (βιοχημική ταυτοποίηση)
- Επιλογή: μεγαλύτερη βεβαιότητα ταυτοποίησης
- Εκχύλιση DNA
- PCR (16s-23s rRNA, Διαχωριστικής γονιδίων περιοχής, ISR)
- Ηλεκτροφόρηση
- Αλληλούχιση DNA και ανάλυση με αλγόριθμο BLAST



High Resolution Melting (HRM) analysis

- 50 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που είχαν ταυτοποιηθεί με API 50 CH
- Ενοφθαλμισμός σε MRS broth και ανακαλλιέργεια σε MRS agar
- Εκχύλιση DNA (tissue kit Macherey Nagel)
- PCR (16s rRNA)
- HRM analysis vs API 50 CH vs DNA sequencing



A microscopic view of numerous rod-shaped bacteria, likely Bacillus or Clostridium species, arranged in a dense cluster. The bacteria are light blue and have a slightly textured surface. The background is a light, hazy blue, and the entire image is framed by a dark blue border.

Αποτελέσματα

Απομόνωση οξυγαλακτικών βακτηρίων

- Απομονώθηκαν συνολικά 92 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που ήταν Gram θετικά και καταλάση/οξειδάση αρνητικά
- 83 στελέχη παρουσίαζαν ικανοποιητική ανάπτυξη στους 7°C



Ανίχνευση παραγωγής βιογενών αμινών

Κανένα από τα στελέχη **οξυγαλακτικών βακτηρίων** δεν παρήγαγε τις βιογενείς αμίνες **τυραμίνη** και **ισταμίνη**



Βιοχημική ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

- 7 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*)
- Επιλογή 1 στελέχους από κάθε είδος για αλληλούχιση DNA



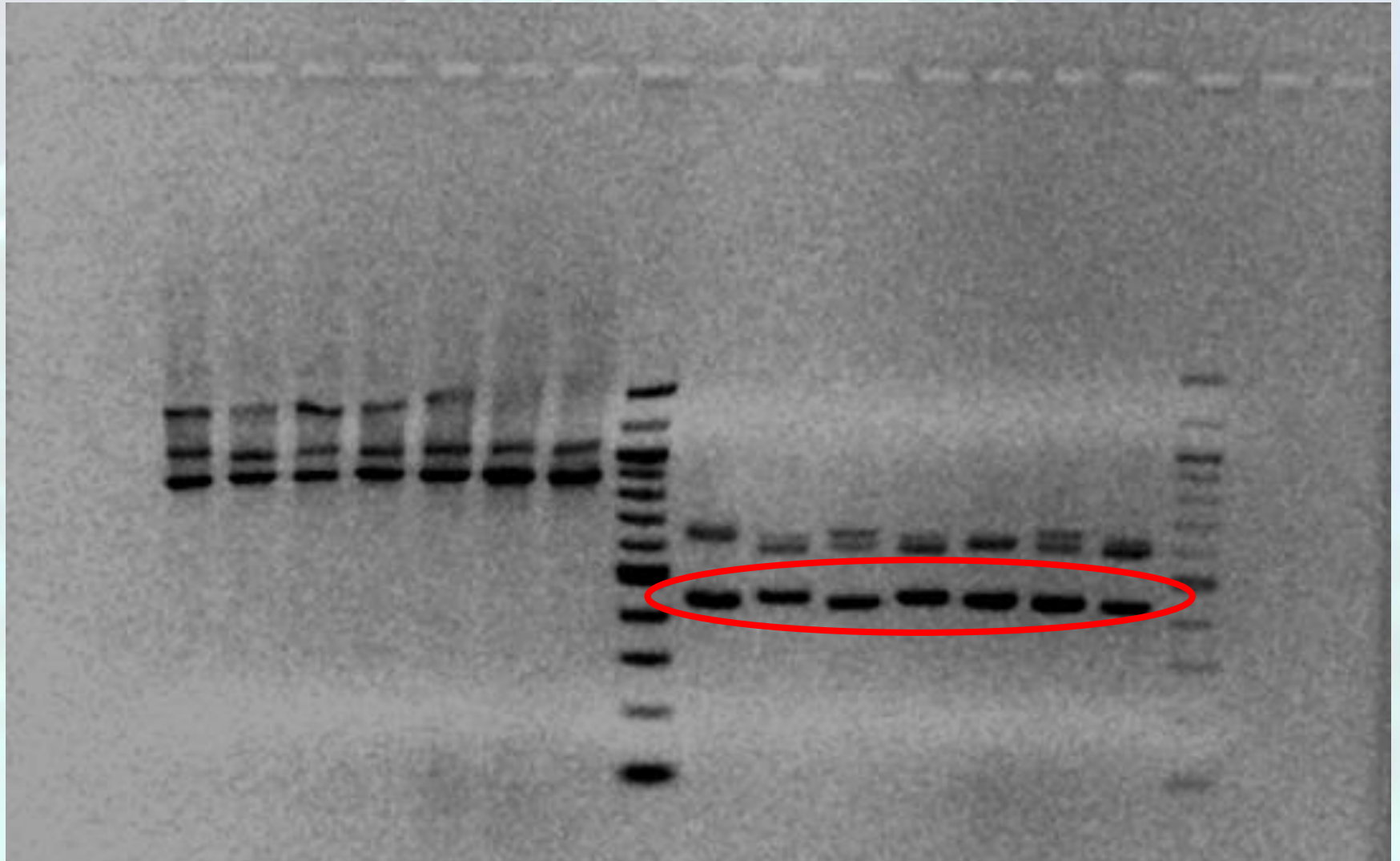
Βιοχημική ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Ταυτοποίηση είδους με API 50 CH	Αριθμός στελεχών	Βεβαιότητα %
<i>Leuconostoc lactis</i>	19	60,2-96,9%
<i>Lactobacillus salivarius</i>	9	98,7-99,9%
<i>Lactobacillus fermentum</i>	8	30,9-99%
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7	55,7-97,6%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	68,5-98,4%
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	59,1-98,3%
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	99,9%

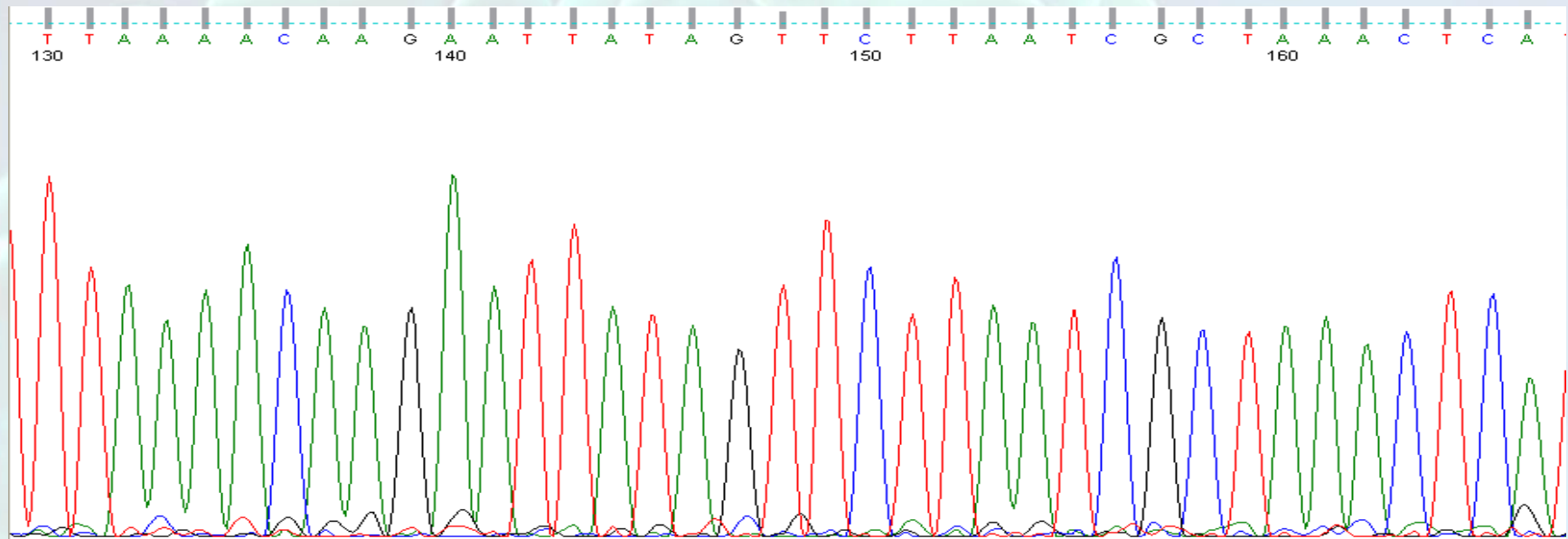


Μοριακή ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

PCR της ISR περιοχής και Ηλεκτροφόρηση



Αλληλούχιση της ISR περιοχής



LAB_59

εΤΤGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGC
CGTCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCAC
CTCCTTTCTAAGGAATAATTACGGAACCTGTACATTTATCGAATACTTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCATATCTCTCAA
GATTTTGTCTTTGAAAACCTAGATATTGATTTATTTCTTAAAAATAAACCGAGAACACCGCGTTTTAAAGAGTTTAAA
ACAAGAATTATAGTTCTTAATCGCTAAACTCATAACCTATTATCGTTAGATAATATTAGGTTAAGTTATTAAGGGCGTA
TGGTGGATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACGTGACTAACTGCGATATGCTTCGGGGAGTTGTAAGTAA
ACTATGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGAAACCTAACAGGTTTTACCGCCTGTTATCACTAAGTGAATTCATAGCT
TAGTTGAAGGTAGACGTGGGGAACTGAAACATCTAAGTACCCACAGGAAGAGAAAGAAATTCGATTCCCTCAGT
AGCGGCGAGCGAACC GGGAAGAGCCCAAACCTAAGAAGCTTGCTTCTTAGGGTTGTAGGACTGAACATTTGAGTT
ACCAAGAAATGAAGTAGTTGAATAATCTGGGAAGATTAGCCAAAGAGAGTGATAGCCTCGTAA

Ταυτοποίηση με τον αλγόριθμο BLAST

>gb|CP000233.1|  *Lactobacillus salivarius* UCC118, complete genome
Length=1827111
[rRNA-23S ribosomal RNA](#)

Identities = 741/743 (99%), Gaps = 0/743 (0%)

```
Query 1      CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAAAC 60
             |||
Sbjct 75921   CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAAAC 75980

Query 61     CGCAAGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG 120
             |||
Sbjct 75981   CGCAAGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG 76040

Query 121    CCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATTACGGAACCTGTAC 180
             |||
Sbjct 76041   CCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATTACGGAACCTGTAC 76100

Query 181    ATTTATCGAATACTTTGTTAGTTTGTAGAGGTCATATCTCTCAAGATTTTGTCTTTGA 240
             |||
Sbjct 76101   ATTTATCGGATACTTTGTTAGTTTGTAGAGGTCATATCTCTCAAGATTTTGTCTTTGA 76160

Query 241    AAAC TAGATATTGATTTATTTCTTAAATAAACCAGAGAACC CGCGTTTTAAAGAGTTT 300
             |||
Sbjct 76161   AAAC TAGATATTGATTTATTTCTTAAATAAACCAGAGAACC GCGTTTTAAAGAGTTT 76220

Query 301    AAAACAAGAATTATAGTTCTTAATCGCTAAACTCATAACCTATTATCGTTAGATAATATT 360
             |||
Sbjct 76221   AAAACAAGAATTATAGTTCTTAATCGCTAAACTCATAACCTATTATCGTTAGATAATATT 76280

Query 361    AGGTTAAGTTATTAAGGGCGTATGGTGGATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACGT 420
             |||
Sbjct 76281   AGGTTAAGTTATTAAGGGCGTATGGTGGATGCCTTGGCACTAGGAGCCGATGAAGGACGT 76340

Query 421    GACTAAGTGCATATGCTTCGGGGAGTTGTAAGTAAACTATGATCCGGAGATTTCCGAAT 480
             |||
Sbjct 76341   GACTAAGTGCATATGCTTCGGGGAGTTGTAAGTAAACTATGATCCGGAGATTTCCGAAT 76400

Query 481    GGGGAAACCTAACAGGTTTTACCGCCTGTTATCACTAAGTGAATTCATAGCTTAGTTGAA 540
             |||
Sbjct 76401   GGGGAAACCTAACAGGTTTTACCGCCTGTTATCACTAAGTGAATTCATAGCTTAGTTGAA 76460

Query 541    GGTAGACGTGGGGAACTGAAACATCTAAGTACC CACAGGAAGAGAAAGAAATTCGATTCC 600
             |||
Sbjct 76461   GGTAGACGTGGGGAACTGAAACATCTAAGTACCCACAGGAAGAGAAAGAAATTCGATTCC 76520

Query 601    CTCAGTAGCGGCAGCGAACCGGGAAGAGCCCAAAC TAAGAAGCTTGCTTC TTAGGGTTG 660
             |||
Sbjct 76521   CTCAGTAGCGGCAGCGAACCGGGAAGAGCCCAAAC TAAGAAGCTTGCTTC TTAGGGTTG 76580

Query 661    TAGGACTGAACATTTGAGTTACCAAGAAATGAAGTAGTTGAATAATCTGGGAAGATTAGC 720
             |||
Sbjct 76581   TAGGACTGAACATTTGAGTTACCAAGAAATGAAGTAGTTGAATAATCTGGGAAGATTAGC 76640

Query 721    CAAAGAGAGTGATAGCCTCGTAA 743
             |||
Sbjct 76641   CAAAGA GAGTGATAGCCTCGTAA 76663
```

Αποτελέσματα μοριακής και βιοχημικής ταυτοποίησης

	Ταυτοποίηση με Αλληλούχιση του DNA		Ταυτοποίηση με API 50 CH	
Στέλεχος	Είδος	% Ομοιότητα	Είδος	% Βεβαιότητα
5	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	99,64%	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	96,6%
7	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99,79%	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	97,6%
40	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	99,64%	<i>Leuconostoc lactis</i>	96,9%
48	<i>Pediococcus acidilactici</i> clone P10	100%	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,9%
51	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> DSM 13238	99%	<i>Lactobacillus brevis</i>	98,3%
59	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	99,86%	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99,9%
74	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	100%	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98%

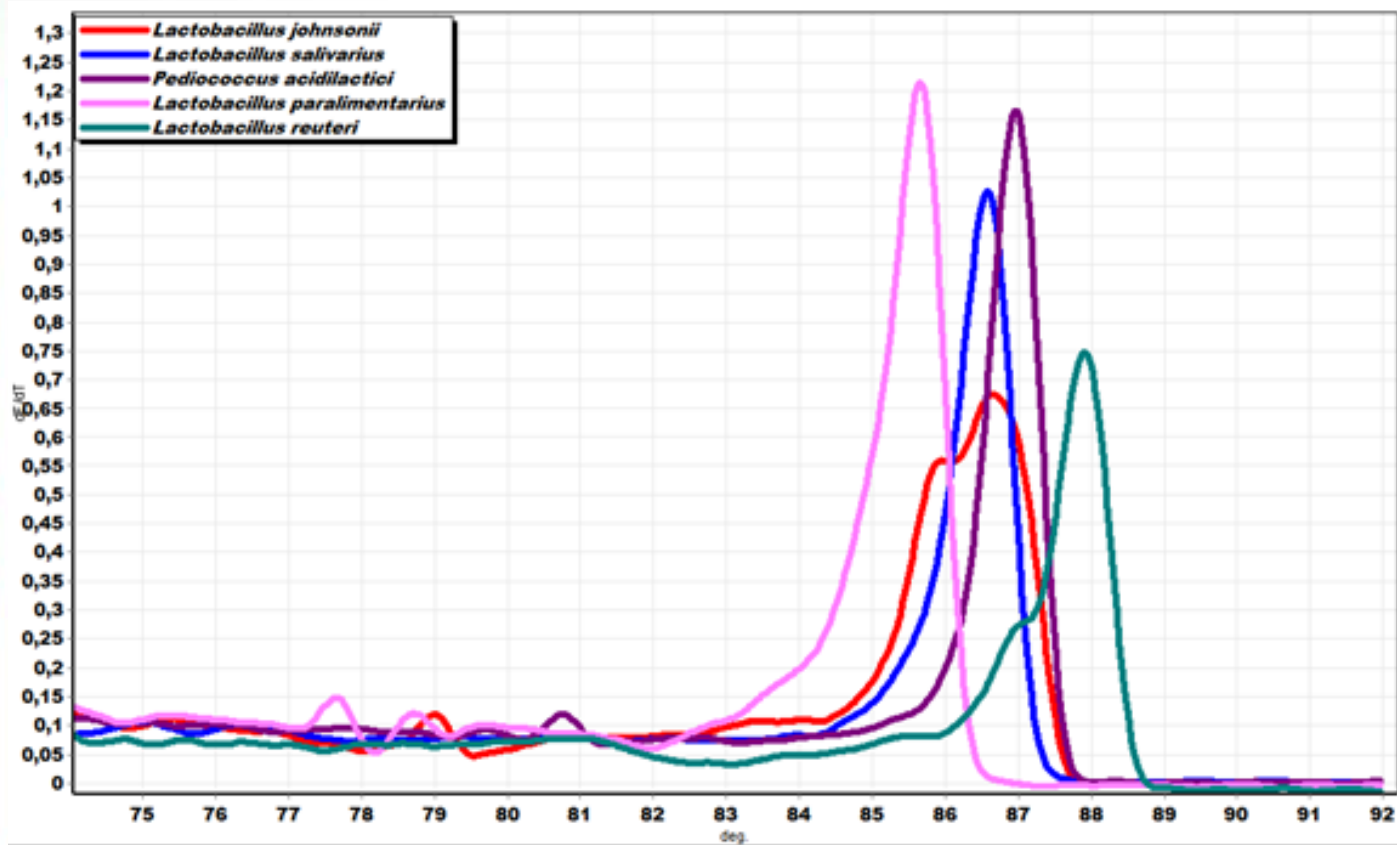


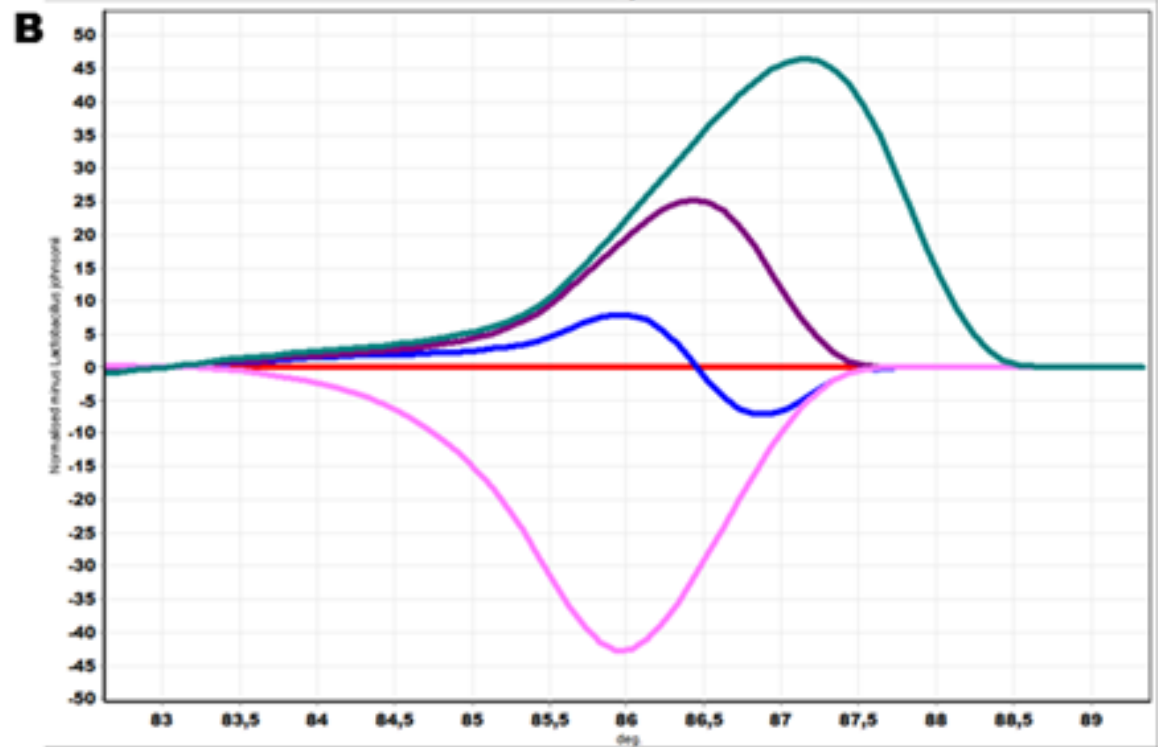
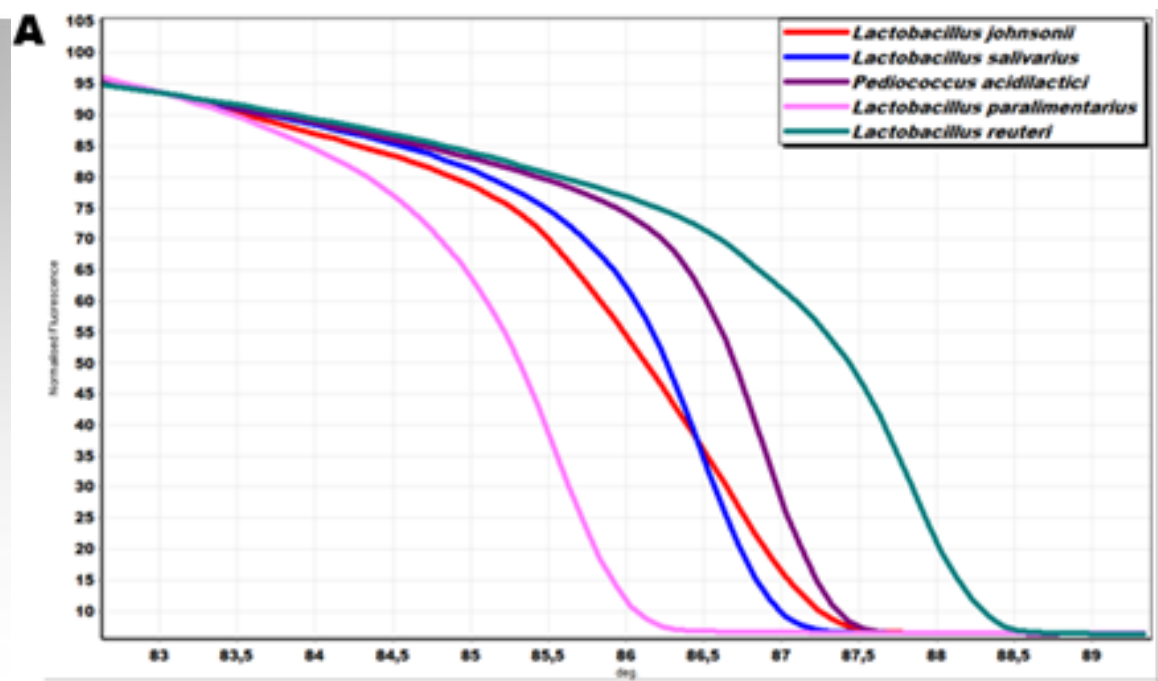
HRM analysis

- 29 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων αναζωογονήθηκαν
- 29 εκχυλίσματα DNA
- 5 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων:
 - *Lactobacillus salivarius*
 - *Lactobacillus reuteri*
 - *Pediococcus acidilactici*
 - *Lactobacillus paralimentarius*
 - *Lactobacillus johnsonii*



Species	Peak 1	Peak 2
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	85.95±0.1	86.65±0.3
<i>Lactobacillus salivarius</i>	86.58±0.1	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	86.97±0.2	
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	85.65±0.2	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	87.9±0.1	







	Isolates	IDENTIFICATION		
		API 50CH	SEQUENCING	HRM
1	5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
2	7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
3	27	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
4	40	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
5	41	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
6	42	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
7	43	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
8	45	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
9	46	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
10	47	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
11	48	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
12	49	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
13	51	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
14	53	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
15	54	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
16	55	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
17	56	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
18	58	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
19	59	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
20	63	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
21	64	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
22	65	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
23	66	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
24	68	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
25	69	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
26	70	<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
27	71	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	<i>Lactobacillus reuteri</i>
28	73	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	<i>Lactobacillus reuteri</i>
29	74	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>

A microscopic view of numerous rod-shaped bacteria, likely Bacillus or Clostridium species, arranged in various orientations. The bacteria are light purple or pinkish in color and have a slightly textured surface. They are set against a light blue background with a dark blue border. The text 'Συμπεράσματα' is overlaid in the center.

Συμπεράσματα



- Απομονώθηκαν στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από σφάγια ορνιθίων με αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Salmonella spp.* και *L. monocytogenes*
- Ασφαλή από πλευράς παραγωγής ισταμίνης και τυραμίνης
- Αυτόχθονη χλωρίδα των σφαγίων ορνιθίων και επομένως δεν τίθεται θέμα προσαρμογής τους



- Η μέθοδος αναστολής διπλής επίστρωσης είναι ιδανική για ένα screening των οξυγαλακτικών βακτηρίων με αντιμικροβιακές ιδιότητες
- Η ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων μόνο με βιοχημικά test είναι αναξιόπιστη
- Η HRM analysis αποδείχθηκε αξιόπιστη και τα αποτελέσματα της ταυτίζονται με αυτά από την αλληλούχιση του DNA

HRM analysis:

- Κατάλληλη για μεγάλο αριθμό στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων
- Χαμηλό κόστος
- Κατηγοριοποιεί τα στελέχη με βάση το melting profile τους
- Αλληλούχιση ενός στελέχους από κάθε ομάδα βακτηρίων με κοινό melting profile
- Το melting profile ταυτοποιημένων οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως reference για την ταυτοποίηση αγνώστων στελεχών χωρίς να χρειαστεί ταυτοποίηση με αλληλούχιση DNA.





Ο συνδυασμός της **μεθόδου αναστολής διπλής επίστρωσης** μαζί με τα **API 50CH, PCR** και **HRM analysis** μπορεί να εφαρμοστεί για την **απομόνωση** και **ταυτοποίηση** οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν την προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως **προβιοτικά**



1. Ioannis Sakaridis, Nikolaos Soultos, Chrysostomos Dovas, Ekaterini Papavergou, Ioannis Ambrosiadis and Paulos Koidis (2012) *Isolation and identification of lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against Salmonella spp. and Listeria monocytogenes*. *Anaerobe* 18, 62 – 66.
2. Ioannis Sakaridis, Ioannis Ganopoulos, Nikolaos Soultos, Panagiotis Madesis, Anagnostis Argiriou and Athanasios Tsaftaris. *Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from poultry carcasses by High Resolution Melting (HRM) analysis and comparison with API 50 CH micro-kits and ribosomal DNA sequencing* (Under review- *Anaerobe*).

Ευχαριστώ πολύ για
την προσοχή σας!

