



Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**Αντιμικροβιακή δράση μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων**

MSc Thesis

**Antibacterial activity of lactic acid bacteria metabolites**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Δήμητρα Μόσχου (20016)

Dimitra Moschou (20016)

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χούχουλα Δήμητρα

Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Food Sciences  
Department of Food Science and Technology

Master of Science

**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS

**Antibacterial activity of lactic acid bacteria metabolites**

NAME OF STUDENT

DIMITRA MOSCHOU

Registration Number

20016

Email: Dimitra.moschou91@gmail.com

SUPERVISOR

Houhoula Dimitra

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΜΠΣ:

**Δρ. Ιωάννης Τσάκης**

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **‘Αντιμικροβιακή δράση μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων’** που παρουσιάστηκε από την **ΔΗΜΗΤΡΑ ΜΟΣΧΟΥ**, υποψηφίας για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

---

Ημερομηνία

---

Όνομα επιβλέποντος  
Χούχουλα Δήμητρα

---

Ημερομηνία

---

Όνομα μέλους επιτροπής  
Κοντελής Σπυρίδων

---

Ημερομηνία

---

Όνομα μέλους επιτροπής  
Μπατρίνου Ανθυμία

## **Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright**

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων.

Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Μόσχου Δήμητρα

## Ευχαριστίες

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κυρία Χούχουλα Δήμητρα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και υποστήριξη της, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθ' όλη την διάρκεια αυτής.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω σε όλους τους συναδέλφους και συμφοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου, για την ηθική συμπαράστασή τους καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση πιθανής αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολικών προϊόντων των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι παθογόνων βακτηρίων τα οποία είναι άμεσα συνδεδεμένα με την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων. Η μελέτη χωρίστηκε σε δύο σκέλη.

Αρχικά μελετήθηκαν έντεκα διαφορετικοί μεταβολίτες οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηριακών στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*. Ανιχνεύτηκε η ελάχιστη συγκέντρωση εισαγωγής αυτών για την επίτευξη πλήρους θανάτωσης τους. Οι ουσίες 4-Hydroxybenzoic acid, phenyllactic acid (PLA), hydrocinnamic acid, salicylic acid και ferulic acid ήταν οι ουσίες που επέφεραν πλήρη θανάτωση σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσίασε η αντίσταση του βακτηριακού στελέχους *Enterococcus faecalis* έναντι των υπολοίπων βακτηριακών στελεχών στους μελετούμενους μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Στο δεύτερο σκέλος μελετήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος επώασης δυο ετοιμών παρασκευασμάτων οξυγαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή ποσότητας μεταβολιτών ικανής να μειώσουν την αρχική βακτηριακή συγκέντρωση που ενοφθαλμίστηκε. Βρέθηκε ότι το έτοιμο παρασκεύασμα που περιείχε περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσίασε σε πιο μικρούς χρόνους επώασης παραγωγή μεταβολιτών ποσότητας ικανής να θανατώσουν τα βακτηριακά στελέχη. Επίσης, και στο δεύτερο σκέλος επισημάνθηκε η αντοχή που επέδειξε ο *Enterococcus faecalis* σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν αφού χρειάστηκε παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας μεταβολικών προϊόντων για την επίτευξη της πλήρους θανάτωσης του.

**Λέξεις κλειδιά:** Οξυγαλακτικά βακτήρια, μεταβολίτες, μεταβολικά προϊόντα, αντιμικροβιακή δράση, παθογόνα βακτήρια.

## **Abstract**

The purpose of this master's thesis was to detect the potential antimicrobial activity of metabolic products of lactic acid bacteria against pathogenic bacteria which are directly linked to cause food poisoning. The study was divided into two parts.

Eleven different lactic acid bacteria metabolites were initially studied against four pathogenic bacterial strains *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*. The minimum input concentration of these metabolites to achieve their death was detected. The substances 4-Hydroxybenzoic acid, phenyl-lactic acid (PLA), hydrocinnamic acid, salicylic acid and ferulic acid were the substances that caused death in all the bacterial strains studied. Also of interest was the resistance of the *Enterococcus faecalis* bacterial strain against the rest of the bacterial strains to the studied metabolites of the lactic acid bacteria.

In the second part, the required incubation time of two prepared products of lactic acid bacteria was studied for the production of a quantity of metabolites capable of reducing the initial bacterial concentration that was inoculated. It was found that the prepared product which contained more lactic acid bacteria, presented in shorter incubation times the production of metabolites in an amount capable of killing the bacterial strains. Also, in the second part, the resistance shown by *Enterococcus faecalis* was highlighted in relation to the rest of the bacterial strains studied, since it required the production of a greater amount of metabolic products to achieve its death.

**Key words:** Lactic acid bacteria, metabolites, metabolic products, antimicrobial activity, pathogens bacteria

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	II
Περίληψη.....	III
Abstract .....	IV
Πίνακες .....	VIII
Γραφήματα .....	X
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή .....	1
Κεφάλαιο 2: Δυναμική βακτηρίων .....	3
<b>2.1. Τροφιμογενείς δηλητηριάσεις.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Διαφοροποίηση Βακτηρίων .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Gram Αρνητικά βακτήρια .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Εντεροβακτηρίδια .....	7
2.3.1.1 Escherichia coli .....	8
2.3.1.2 Salmonella enterica .....	9
2.3.2 Μη Ζυμωτικά Βακτήρια .....	10
<b>2.4. Gram θετικά βακτήρια .....</b>	<b>10</b>
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.4.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	12
2.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
Κεφάλαιο 3: Οξυγαλακτικά βακτήρια .....	15
<b>3.1 Μεταβολίτες οξυγαλακτικών βακτηρίων - Αντιμικροβιακές Ουσίες .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-hydroxybenzoic acid).....	18
3.1.2 DL-p-υδροξυ-φαινυλο-γαλακτικό οξύ (DL-p-hydroxyphenyl-lactic acid, OH-PLA)	
19	
3.1.3 Φαινυλο-γαλακτικό οξύ (phenyl-lactic acid, PLA) .....	20
3.1.4 Υδροξυκινναμωμικό οξύ (hydrocinnamic acid) .....	21



3.1.5	Μεθοξυκιναμωμικό οξύ (methylcinnamic acid) .....	23
3.1.6	Σαλικυλικό οξύ (salicylic acid) .....	24
3.1.7	1,2-διυδροξυβενζένιο (1,2-dihydroxybenzene).....	25
3.1.8	Καφεϊκό οξύ (caffeic acid).....	26
3.1.9	Βανιλικό οξύ (vanillic acid).....	27
3.1.10	Φερουλικό οξύ (ferulic acid) .....	28
Κεφάλαιο 4: Σκοπός .....		30
Κεφάλαιο 5: Υλικά – Μέθοδοι.....		31
<b>5.1</b>	<b>Υλικά και Αναλώσιμα</b> .....	31
5.1.1	Θρεπτικά υποστρώματα .....	31
5.1.2	Πρότυπα βακτηριακά στελέχη.....	31
5.1.3	Παρασκευάσματα οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	31
5.1.4	Χημικά αντιδραστήρια .....	32
5.1.5	Εξοπλισμός.....	32
<b>5.2</b>	<b>Μέθοδοι</b> .....	33
5.2.1	Παρασκευή αραιωτικών διαλυμάτων .....	33
5.2.2	Προετοιμασία μικροοργανισμών .....	34
5.2.3	Παρασκευή διαλύματος μικροοργανισμών κλίμακας McFarland 0.5 .....	35
5.2.4	Μεθοδολογία πειραματικού Μέρους Α .....	36
5.2.4.1	<i>Παρασκευή απαιτούμενων συγκεντρώσεων χημικών ουσιών.....</i>	36
5.2.4.2	<i>Παρασκευή εναιωρήματος παθογόνων βακτηριακών στελεχών.....</i>	37
5.2.4.3	<i>Μεθοδολογία .....</i>	37
5.2.5.1	<i>Προαγωγή παρασκευασμάτων οξυγαλακτικών βακτηρίων .....</i>	39
5.2.5.2	<i>Απομόνωση μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων.....</i>	39
5.2.5.3	<i>Παρασκευή εναιωρήματος παθογόνων βακτηριακών στελεχών.....</i>	40
5.2.5.4	<i>Μεθοδολογία .....</i>	40

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα .....	42
<b>6.1 Αποτελέσματα Πειράματος Μέρους Α</b> .....	42
6.1.1 4-Hydroxybenzoic acid .....	42
6.1.2 DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) .....	45
6.1.3 Phenyllactic acid (PLA) .....	47
6.1.4 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid .....	49
6.1.5 Hydrocinamic acid .....	51
6.1.6 Methylcinnamic acid .....	53
6.1.7 Salicylic acid.....	55
6.1.8 1,2 dihydroxybenzene (catechol).....	57
6.1.9 Caffeic acid .....	59
6.1.10 Vanillic acid.....	61
6.1.11 Feruric acid .....	63
<b>6.2 Αποτελέσματα Πειράματος Μέρους Β</b> .....	65
6.2.1 Σκεύασμα BioGaia ProTectis Family.....	65
6.2.2 Σκεύασμα Comfort Lactone .....	67
Κεφάλαιο 7: Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	69
Κεφάλαιο 8: Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	74
Αναφορές.....	75

## Πίνακες

Πίνακας 1. Παρουσίαση πρότυπων στελεχών και εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την προαγωγή της ανάπτυξής τους. (ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ, 2022) .....	35
Πίνακας 2. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	42
Πίνακας 3. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	45
Πίνακας 4. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας Phenyllactic acid (PLA) έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	47
Πίνακας 5. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	49
Πίνακας 6. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας hydrocinamic acid έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	51
Πίνακας 7. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας methylcinnamic acid έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	53
Πίνακας 8. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας salicylic acid έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	55
Πίνακας 9. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	57

Πίνακας 10. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας <i>caffeic acid</i> έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	59
Πίνακας 11. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας <i>vanillic acid</i> έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	61
Πίνακας 12. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας <i>feruric acid</i> έναντι των παθογόνων στελεχών <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Enterococcus faecalis</i> .....	63

## Γραφήματα

Γράφημα 1. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid. ....	44
Γράφημα 2. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA). ....	46
Γράφημα 3. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας Phenylactic acid. ....	48
Γράφημα 4. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid.....	50
Γράφημα 5. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας hydrocinamic acid.....	52
Γράφημα 6. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας methylcinnamic acid.....	54
Γράφημα 7. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας salicylic acid. ....	56
Γράφημα 8. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol). ....	58
Γράφημα 9. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας caffeic acid. ....	60
Γράφημα 10. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας vanillic acid. ....	62
Γράφημα 11. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας feruric acid.....	64
Γράφημα 12. Σχηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους <i>Staphylococcus</i> σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.....	69

Γράφημα 13. Σηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους <i>Enterococcus faecalis</i> σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.....	70
Γράφημα 14. Σηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους <i>Salmonella enterica</i> σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Γράφημα 15. Σηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους <i>Listeria monocytogenes</i> σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.....	72

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων αναγνωρίζεται ως πρωταρχικό ζήτημα δημόσιας ασφάλειας παγκοσμίως. Οι ασθένειες και οι θάνατοι που προκαλούνται από μολυσμένα τρόφιμα αποτελούν συνεχή απειλή για τη δημόσια υγεία και σημαντικό εμπόδιο για την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη. (Xiuting Wang Y. H., 2018)

Τα κύρια τροφιμογενή παθογόνα, βακτήρια, μύκητες, παράσιτα και ιοί, ευθύνονται για πολλές ασθένειες και ανακλήσεις τροφίμων παγκοσμίως κάθε χρόνο με επίμονο ετήσιο αριθμό θνησιμότητας. Η παρουσία ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό τοξινών που μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις και δηλητηρίαση. Για παράδειγμα, τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν τα αμινοξέα σε βιογενείς αμίνες όπως η ισταμίνη, η καδαβερίνη, η πουτρεσκίνη ή η τυραμίνη, οι οποίες έχουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο. (F. Özogul, 2018)

Παράλληλα η ανησυχητική παγκόσμια αύξηση της αντίστασης των μικροβιακών παθογόνων στα αντιβιοτικά καθώς και η εξάπλωσή τους κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας αποτελεί ζωτικής σημασίας γεγονός για όλους τους ενδιαφερόμενους φορείς που ασχολούνται με την ασφάλεια των τροφίμων και καθιστά αναγκαία την αναζήτηση νέων αντιμικροβιακών τεχνικών, οι οποίες θα μειώσουν την αντίσταση των παθογόνων σε αυτά. (Wiebke Jansen, 2019).

Οι στρατηγικές για τον έλεγχο των αλλοιωτικών και παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα περιλαμβάνουν τη διαχείριση τόσο εγγενών (pH, δραστηριότητα νερού, περιεκτικότητα σε NaCl, θρεπτικά συστατικά) όσο και εξωγενών παραγόντων όπως ο έλεγχος της θερμοκρασίας και τροποποιημένη ατμόσφαιρα κ.α. Η χρήση χημικών ουσιών (τόσο συνθετικών όσο και φυσικών) καθώς και αντιμικροβιακών ουσιών είναι επίσης απαραίτητη για τον έλεγχο των παθογόνων και την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων διατροφής. (Hafize Fidan T. E., 2022)

Επιπλέον, η αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών για φυσικά, έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, με μειωμένη έως και καθόλου χρήση συντηρητικών και πρόσθετων έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων, αποτελεσματικών εναλλακτικών λύσεων που μπορούν

να προσδώσουν στον καταναλωτή τρόφιμα με την ζητούμενη ποιότητα, φρεσκάδα και ασφάλεια. (J.G. LeBlanc, 2011)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για την ζύμωση διαφορών προϊόντων, θεωρούνται ως βιολογικές εναλλακτικές που μπορούν να ενισχύσουν τη συντήρηση των τροφίμων (γνωστή και ως βιοσυντήρηση). Αυτές οι βιοπροστατευτικές καλλιέργειες αναφέρεται ότι μειώνουν τα βακτηριακά φορτία και αναστέλλουν τα παθογόνα βακτήρια στο κρέας και στα φυτικά προϊόντα. Παράλληλα οι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που κυμαίνονται από απλά οργανικά οξέα έως πιο σύνθετες ενώσεις όπως τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί για το ανασταλτικό τους δυναμικό έναντι μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση καθώς και παθογόνων βακτηρίων. (Hafize Fidan T. E., 2022)

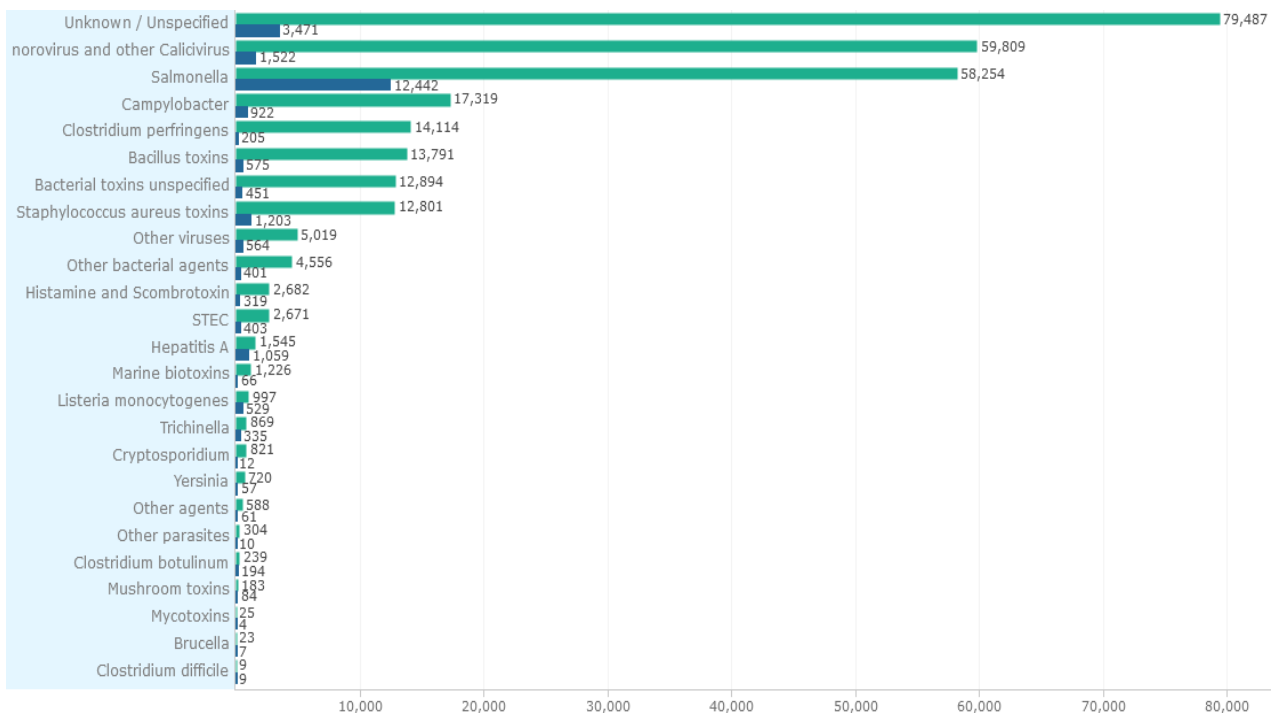


## Κεφάλαιο 2: Δυναμική βακτηρίων

### 2.1. Τροφιμογενείς δηλητηριάσεις

Κάθε χρόνο, χιλιάδες άνθρωποι υποφέρουν από τροφιμογενείς ασθένειες και αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα τροφιμογενών λοιμώξεων περιλαμβάνουν στομαχικές διαταραχές, πόνους, ναυτία, έμετο, διάρροια, πυρετό και αφυδάτωση. Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν μεταξύ ηπιών και σοβαρών ανάλογα τον παράγοντα που προκάλεσε την ασθένεια. Μερικές ασθένειες μπορεί να οδηγήσουν σε επιπτώσεις μακράς διάρκειας ή θάνατο. (CDC, 2020)

Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των κρουσμάτων καταγράφεται στα τμήματα υγείας διότι οι λοιμώξεις που οφείλονται σε ορισμένα παθογόνα δεν είναι γνωστές, με πολλούς ασθενείς να μην αναζητούν ιατρική φροντίδα. (S.V.Bhaskar, 2017)



Εικόνα 1. Αριθμός κρουσμάτων (■) και νοσηλείας σε νοσοκομείο (■) σε σχέση με κάθε αιτιολογικό παράγοντα όσον αφορά τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης των χρονολογικών ετών 2015-2020. (efsa, 2015-2020)

Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών περιλαμβάνουν τη παραγωγή μεγάλης κλίμακας τροφίμων, το διεθνές εμπόριο, τη παγκοσμιοποίηση της προσφοράς τροφίμων, τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, η μικροβιακή γονιδιωματική διαφοροποίηση/εμφάνιση νέων παθογόνων μικροοργανισμών.



## 2.2. Διαφοροποίηση Βακτηρίων

Η δυνατότητα διαφοροποίησης των βακτηριακών ειδών είναι σημαντική για ποικίλους λόγους, από τη διάγνωση μίας λοίμωξης, τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων καθώς και τον προσδιορισμό του είδους που προσδίδει σε ένα τρόφιμο τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του.

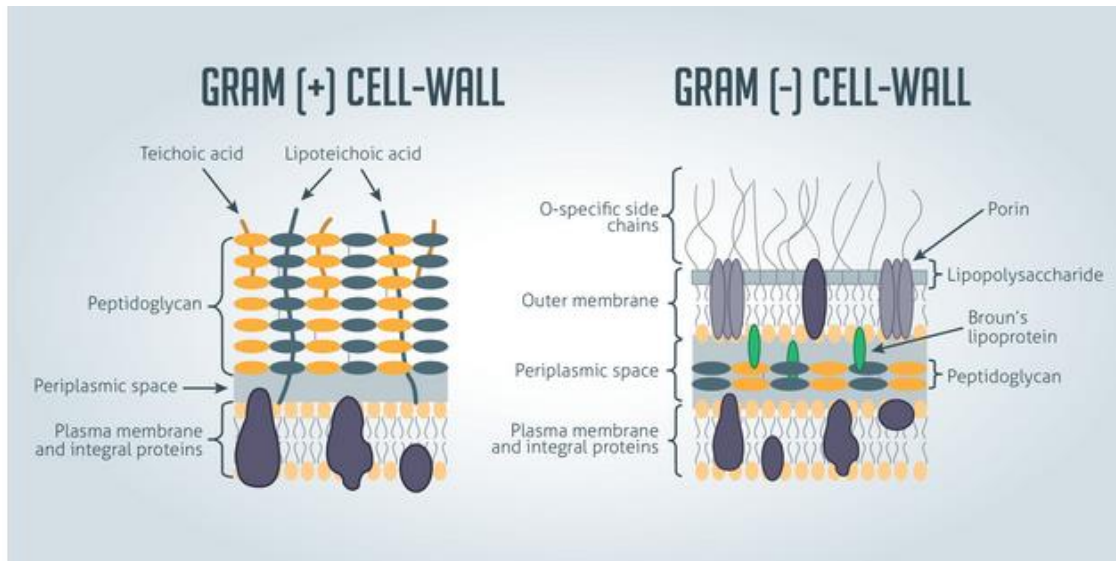
Τα βακτηριακά είδη, ακόμη και συγκεκριμένα στελέχη μπορούν να διαφοροποιηθούν χρησιμοποιώντας έναν αριθμό μοριακών τεχνικών με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος ή ακόμα και πιο παραδοσιακές τεχνικές που αφορούν τη διαφοροποίησή τους βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. (Steward, Karen, 2019)

Τα βακτήρια κατοικούν σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών περιβάλλοντων στα οποία αντιμετωπίζουν κυμαινόμενες φυσικές και χημικές καταπονήσεις. (Weibel, 2017) Η ικανότητα ανάπτυξης τους σε συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά και η προτίμηση σε περιβάλλοντα με υψηλό ή χαμηλό οξύγονο, συγκεκριμένου εύρους pH και ενεργότητα ύδατος συμβάλουν στην διαφοροποίησή τους. (Steward, Karen, 2019)

Υπάρχουν τρεις κύριοι μορφολογικοί τύποι βακτηριακών κυττάρων που διακρίνονται σε σφαιρικό (κόκκοι), ραβδοειδές (βάκιλοι) και σπειροειδές. (Young, 2006) Αναλόγως της σύνθεσης των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα Gram αρνητικά και τα Gram θετικά βακτήρια. Η τεχνική χρώσης κατά Gram αναπτύχθηκε το 1884 από τον Δανό βακτηριολόγο Hans Christian Gram. Τα δύο βασικά χαρακτηριστικά που οδηγούν στις διαφορετικές ιδιότητες οπτικοποίησης των θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram ειδών είναι το πάχος του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης και η παρουσία ή απουσία της εξωτερικής λιπιδικής μεμβράνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δομή του τοιχώματος επηρεάζει την ικανότητα του κυττάρου να συγκρατεί την κρυσταλλική βιολετί χρώση που χρησιμοποιείται στη διαδικασία χρώσης κατά Gram, η οποία μπορεί στη συνέχεια να οπτικοποιηθεί κάτω από ένα μικροσκόπιο φωτός. (Nasim Kashaf, 2016)

Το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την αρνητική επίδραση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων, ελέγχοντας το χαρακτηριστικό σχήμα των κυττάρων. (Kotarba, 2019)

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται απλοποιημένες οι διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος αυτών των δύο ομάδων.



Εικόνα 3. Διαφορά στην δομή Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. (Steward, Karen, 2019)

### 2.3. Gram Αρνητικά βακτήρια

Τα Gram αρνητικά βακτήρια αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας στον κόσμο λόγω της υψηλής αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν μεγάλη κλινική σημασία επειδή θέτουν τους ασθενείς σε υψηλό κίνδυνο και είναι ικανά να οδηγήσουν σε υψηλή επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας. (Sirous Faraji Hormozi, 2018) Έχουν μια πληθώρα μηχανισμών που εμποδίζουν τη δράση των αντιβιοτικών. Κάποιοι από τους μηχανισμούς αντίστασης περιλαμβάνουν αντλίες εκροής, αλλαγή της θέσης πρόσδεσης των αντιβιοτικών, φράγμα διαπερατότητας της μεμβράνης, ένζυμα υποβιβασμού κλπ. (Oliveira & Reygaert., 2022) (Xian-Zhi Li, 2015)

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που βρίσκεται μεταξύ του κυττάρου και των εξωτερικών μεμβρανών, στην περιοχή που ονομάζεται περιπλασματικός χώρος. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης περιβάλλεται από μια εξωτερική λιπιδική μεμβράνη η οποία περιέχει πορίνες και λιποπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια καθώς και αλυσίδες λιποπολυσακχαριτών. (Kotarba, 2019)

Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης συμβάλλει στην κυτταρική ακεραιότητα και έχει πάχος 19–33 nm. (Weibel, 2017) Το περίπλασμα επιτρέπει στα Gram-αρνητικά βακτήρια να δεσμεύουν δυνητικά επιβλαβή για αυτά ένζυμα όπως η RNase ή η αλκαλική φωσφατά-

ση. Εξαιτίας αυτού, το περίπλασμα έχει ονομαστεί εξελικτικός πρόδρομος των λυσοσωμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων. (Thomas J. Silhavy, 2010)

Η εξωτερική μεμβράνη εκφράζει έναν ισχυρό επαγωγέα ανοσολογικής απόκρισης, τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ο οποίος αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές:

- έναν υδρόφιλο πολυσακχαρίτη.
- το αντιγόνο O (O-πολυσακχαρίτης), το οποίο αποτελείται από επαναλήψεις ολιγοσακχαριτών (μονάδες O), οι οποίες συνήθως περιέχουν δύο έως οκτώ υπολείμματα από ένα ευρύ φάσμα σακχάρων. Εμπλέκεται στην λοιμογόνο δράση παθογόνων στελεχών. (Yang Li, 2011)
- και μια υδρόφοβη περιοχή είναι γνωστή ως λιπίδιο A, το οποίο συμβάλει στην σταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης. (Livermore, 2012) (Weibel, 2017)

Παράλληλα, η εξωτερική μεμβράνη αποκλείει μεγάλα ή υδρόφοβα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοπεπτιδίων, της δαπτομυκίνης και της ριφαμπικίνης, και επιβραδύνει την είσοδο τους, αυξάνοντας τον μηχανισμό αντοχής τους έναντι της βακτηριοκτόνου δράσης τους. (Xian-Zhi Li, 2015) Αντίθετα, ενώσεις που είναι μικρότερες και συνήθως υδρόφιλες μπορούν να διεισδύσουν πιο εύκολα μέσω των καναλιών πορίνης. (Li X-Z, 2015)

Το ένζυμο β-λακταμάσης, το οποίο παράγεται από τα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες αντοχής έναντι ενός ευρύ φάσματος β-λακταμών που χρησιμοποιούνται στα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά, καθώς τα διασπούν και τα καταστρέφουν καθιστώντας τα μη αποτελεσματικά. (Nerino Allocati, 2013) (ESBL-producing Enterobacterales, 2019)

Όσον αφορά τα Gram αρνητικά βακτήρια δύο είναι οι μεγάλες ομάδες που είναι υπεύθυνες για τις περισσότερες κλινικές απομονώσεις, τα εντεροβακτηρίδια και τα μη ζυμωτικά βακτήρια.

### 2.3.1 Εντεροβακτηρίδια

Τα εντεροβακτηρίδια είναι μια ετερογενής ομάδα ευρέως διασκορπισμένη στη φύση. Αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% των Gram αρνητικών απομονώσεων με μια μυριάδα γενικών ειδών που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, της πνευμονίας, της διάρροιας, της μηνιγγί-

τιδας, της σήψης, του ενδοτοξικού σοκ και πολλών άλλων. Τα γενικά είδη που επηρεάζουν συχνά τον άνθρωπο είναι μεταξύ άλλων τα *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* και *Salmonella*. (Oliveira & Reygaert., 2022)

#### 2.3.1.1 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* (*E.coli*) είναι ένα Gram-αρνητικό, σε σχήμα ράβδου (βάκιλος), προαιρετικό αναερόβιο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριδίων. Διαθέτουν συγκεκριμένους παράγοντες προσκόλλησης που τους επιτρέπουν να αποικίζουν στο ξενιστή, τα ινίδια καθώς και πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης τους. (James B. Kaper, 2004) Η *Escherichia coli* είναι ένα βακτήριο που βρίσκεται συνήθως στο έντερο των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων. Η ευελιξία του βακτηρίου στις απαιτήσεις ανάπτυξης αντανακλάται στον ισχυρό πολλαπλασιασμό του σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών θερμοκρασίας, αλατιού, ωσμωτικού στρες, pH, οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. (Elizabeth A Mueller, 2019) (Antoine Delhay, 2016) Μεταδίδεται στον άνθρωπο κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, όπως ωμά ή μη καλά μαγειρεμένα προϊόντα κινιά, νωπό γάλα και μολυσμένα ωμά λαχανικά και ρίζες. (WHO, World Health Organization, 2018)

Τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* είναι αβλαβή, αποικίζουν ακίνδυνα στον γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας τους. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα στελέχη που έχουν εξελιχθεί αποκτώντας λοιμογόνους παράγοντες μέσω πλασμιδίων, τρανσποζονίων, βακτηριοφάγων κτλ. Αυτά τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάση των ορομάδων, των μηχανισμών παθογένειας, τα κλινικά συμπτώματα ή τους παράγοντες λοιμογόνου δράσης. Μεταξύ αυτών, το εντεροαιμορραγικό *E. coli* (EHEC) ορίζεται ως το παθογόνο στέλεχος της *E. coli* που παράγει την τοξίνη Shiga (STEC) και προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα. Αρκετοί ορότυποι EHEC σχετίζονται συχνά με ανθρώπινες ασθένειες όπως O26:H11, O91:H21, O111:H8, O157:NM και O157:H7, με το O157:H7 να αποτελεί τον πιο συχνά απομονωμένο ορότυπο EHEC. (Ji Youn Lim, 2010)

Το παθογόνο στέλεχος της *E. coli* που παράγει την τοξίνη Shiga (STEC) μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 7°C έως 50°C, με βέλτιστη θερμοκρασία 37 °C. Επίσης, μπορεί να αναπτυχθεί σε όξινα τρόφιμα, μέχρι και pH 4,4 και σε τρό-

φιμα με ελάχιστη ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ) 0,95. (WHO, World Health Organization, 2018) (T. Ross, 2003)

Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι, στις χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης καταγράφηκαν για το χρονολογικό διάστημα 2015 έως το 2020, 2544 περιπτώσεις λοίμωξης από το παθογόνο στέλεχος της *E. coli* που παράγει την τοξίνη Shiga (STEC) όπου οι 369 οδήγησαν σε νοσηλεία και 7 κατέληξαν. Στην Ελλάδα αντίστοιχα καταγράφηκαν 87 περιπτώσεις λοίμωξης και 1 περιστατικό νοσηλείας. (efsa, 2015-2020)

### 2.3.1.2 *Salmonella enterica*

Η *Salmonella* είναι ένα Gram αρνητικό, ραβδοειδές, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μη σπορογόνο που ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριδίων. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασιακό εύρος 5-45°C (με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C), σε εύρος pH 4,0–9,0. (Richard K. Gast, 2019)

Το γένος της *Salmonella* αποτελεί το πιο συνηθισμένο τροφιμογενές παθογόνο το οποίο μπορεί να μεταφερθεί στους ανθρώπους από την κατανάλωση μολυσμένων φαγητών ζωικής προέλευσης, όπως πουλερικά, αυγά, χοιρινό, ψάρι κα. Μερικοί ορότυποι της *Salmonella* περιορίζονται σε συγκεκριμένο ξενιστή ενώ άλλοι προσαρμόζονται στον εκάστοτε ξενιστή. Για να καταφέρει να παρακάμψει τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, χρησιμοποιεί πληθώρα εργαλείων όπως μαστίγια, κάψουλες, μηχανισμούς προσκόλλησης και έκκρισης. (Steven L.Percival, 2014) Ιδιαίτερα, η *Salmonella enterica*, αποτελεί το πιο παθογόνο είδος και περιλαμβάνει πάνω από 2600 ορότυπους που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής.

Γενικά, το βακτήριο εγκαθίσταται ως ξενιστής στις πεπτικές οδούς των ανθρώπων και ζώων, συνεπώς η παρουσία του αλλού όπως νερό, περιβάλλον και τροφή, αναπαραστά μόλυνση από κόπρανα και μη επαρκής υγειονομικές πρακτικές. (Steven L.Percival, 2014)

Πρόσφατα δεδομένα από Ηνωμένες Πολιτείες, Ευρωπαϊκές χώρες αλλά και χώρες χαμηλού ή μεσαίου εισοδήματος δείχνουν ότι οι περιπτώσεις *Salmonella* συνεχίζουν να αποτελούν τις πιο συχνές αιτίες τροφικής δηλητηρίασης παγκόσμια, καταδεικνύοντας την αποτυχία των προγραμμάτων ελέγχου της μόλυνσης κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας. Παράλληλα, η μεγάλη συχνότητα παρουσίας του *S. enterica* στις πεπτικές ο-

δούς των ζώων τροφής, δημιουργεί χρόνιους ή ασυμπτωματικούς φορείς που συνεχίζουν να αποβάλουν το βακτήριο μέσω των κοπράνων λειτουργώντας ως ρεζερβουάρ μελλοντικών μολύνσεων προϊόντων που έχουν αναπτυχθεί σε τέτοια περιβάλλοντα (Jajere, 2019)

Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι, στις χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης καταγράφηκαν για το χρονολογικό διάστημα 2015 έως το 2020, 4527 περιπτώσεις λοίμωξης από το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* όπου οι 873 οδήγησαν σε νοσηλεία και 8 κατέληξαν. (efsa, 2015-2020)

### 2.3.2 Μη Ζυμωτικά Βακτήρια

Τα μη ζυμωτικά βακτήρια, ανήκουν στους αρνητικά κατά Gram βακίλους και παρουσιάζουν χαμηλότερη συχνότητα απομόνωσης σε σύγκριση με τα Εντεροβακτηρίδια. Ωστόσο, αποτελούν σημαντική ομάδα βακτηρίων αφού προκαλούν σοβαρές και θανατηφόρες λοιμώξεις. Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και ευθύνονται για την πρόκληση ασθενειών είναι οι *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι αερόβιοι, μη σπορογόνοι και δεν είναι ικανοί να ζυμώσουν τα σάκχαρα. (Oliveira & Reygaert., 2022)

## 2.4. Gram θετικά βακτήρια

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν ένα παχύ αλλά πορώδες στρώμα πεπτιδογλυκάνης, τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα που είναι πολυσακχαρίτες ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με την πεπτιδογλυκάνη, και όλα μαζί περιβάλλουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη. (Kotarba, 2019)

Τα στρώματα πεπτιδογλυκάνης των Gram θετικών βακτηρίων αποτελούνται από έναν μακρομοριακό κυτταρικό «εξωσκελετό» που σταθεροποιεί το κυτταρικό τοίχωμα και παρέχει δομική ακεραιότητα στο κύτταρο. Αποτελείται από αλυσίδες πολυσακχαριτών διασυνδεδεμένες με πεπτίδια με πάχος 19–33 nm. (Weibel, 2017)

Εσωτερικά των στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης, διασχίζουν μακρά ανιονικά πολυμερή, που ονομάζονται τειχοϊκά οξέα, τα οποία αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από φωσφορική γλυκερόλη, φωσφορική γλυκοζυλεστέρα ή επαναλήψεις φωσφορικής ριβιτόλης.



(Thomas J. Silhavy, 2010) Τα τειχοϊκά οξέα αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της δομής και λειτουργίας. (Stephanie Brown, 2013)

Παράλληλα, τα Gram θετικά βακτήρια περιέχουν εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι σημαντικές για την επιβίωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων τόσο στο περιβάλλον όσο και για τη δημιουργία λοίμωξης. Ανάλογα με τον οργανισμό, οι πρωτεΐνες της επιφάνειας τους είναι εξελικτικά προσαρμοσμένες ώστε να αλληλοεπιδρούν με συγκεκριμένους συνδέτες στην επιφάνεια του στόχο τους. (Fischetti, 2019) Μερικές από αυτές περιέχουν έλικες που εκτείνονται εντός της μεμβράνης, άλλες είναι προσαρτημένες σε λιπιδικές άγκυρες που εισάγονται στη μεμβράνη. Αντίστοιχα, κάποιες συνδέονται ομοιοπολικά την πεπτιδογλυκάνη και άλλες συνδέονται με τα τειχοϊκά οξέα. (Thomas J. Silhavy, 2010)

Τα λιποτειχοϊκά οξέα (γλυκοπολυμερή) εκτείνονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη έως και τον εξωτερικό περίβλημα των κυττάρων. Τα λιποτειχοϊκά οξέα θεωρούνται απαραίτητα για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και συμβάλουν στην κατασκευή και την τοποθέτηση του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης, καθώς και στην κυτταρική ακεραιότητα. (Weibel, 2017)

Η αντιμικροβιακή αντίσταση μεταξύ των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ιδιαίτερα των *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* και *Streptococcus pneumoniae*, αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγείας διότι διαθέτουν πολλαπλούς μηχανισμούς αντίστασης. (Carmen Lozano, 2017)

#### 2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus* είναι ένα Gram θετικό σε σχήμα κόκκου, συμβιωτικό και ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει μεγάλο εύρος λοιμώξεων, από επιφανειακές μολύνσεις του δέρματος μέχρι πιθανώς θανατηφόρες ασθένειες. Δεν δημιουργεί σπόρια, αλλά μπορεί να μολύνει το φαγητό κατά την προετοιμασία και επεξεργασία του. Μπορεί να αναπτυχθεί σε αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια περιβάλλοντα, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (8-50°C), pH (4,2-9,3) και συγκεντρώσεις μέχρι 20 % NaCl και χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος (0,83-0,99). (Medved'ová A, 2019) Είναι οργανισμός με ανοχή στην ξήρανση και μπορεί να επιβιώσει σε ξηρά και στρεσογόνα περιβάλλοντα, όπως το

δέρμα και στους βλεννογόνους (κυρίως ρινική περιοχή), επιφάνειες αντικειμένων και ρούχα και να παραμείνει ενεργός για μεγάλη διάρκεια μετά την αρχική επαφή. (Jhalka Kadariya, 2014) (Taylor TA, 2022)

Ο *Staphylococcus aureus* παράγει μια μεγάλη ποικιλία εξωπρωτεϊνών που συμβάλουν στην ικανότητά του να αποικίζει ως ξενιστής και να προκαλεί σοβαρές ασθένειες. Σχεδόν όλα τα στελέχη εκκρίνουν μια ομάδα ενζύμων και κυτταροτοξινών που περιλαμβάνει τέσσερις αιμολυσίνες (άλφα, βήτα, γάμα και δέλτα), νουκλεάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, υαλουρονιδάση και κολλαγενάση. Ορισμένα στελέχη παράγουν μία ή και περισσότερες επιπλέον εξωπρωτεΐνες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, τις αποφολιδωτικές τοξίνες και λευκοσιδίνη. Καθεμία από αυτές τις τοξίνες είναι γνωστό ότι έχει ισχυρές επιδράσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά πολλές από αυτές έχουν και άλλες βιολογικές επιδράσεις. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αναστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή στο *S. aureus*. Τέλος, είναι υπεύθυνες για την πρόκληση της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης και του σύνδρομου του σταφυλοκοκκικού τοξικού σοκ. (Martin M. Dinges, 2000)

Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι, στις χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης καταγράφηκαν για το χρονολογικό διάστημα 2015 έως το 2020, 402 περιπτώσεις λοίμωξης από την τοξίνη του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* όπου οι 43 οδήγησαν σε νοσηλεία. (efsa, 2015-2020)

#### 2.4.2 *Enterococcus faecalis*

Αν και οι εντερόκοκκοι έχουν χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για αιώνες ως καλλιέργειες εκκίνησης στην παραγωγή τροφίμων, αναγνωρίζονται πλέον ως σοβαρά νοσοκομειακά παθογόνα που εκφράζουν αντοχή σε πολλά φάρμακα και πολυάριθμα λοιμογόνα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η εξάπλωση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων αύξησε σημαντικά τη θνησιμότητα και την επιβάρυνση της νόσου λόγω εντεροκοκκικής λοίμωξης εγείροντας ανησυχίες για την ασφάλεια για τη χρήση των εντερόκοκκων ως προβιοτικών. (Chiang, 2017)

Για αυτούς τους λόγους, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων διαπίστωσε ότι οι εντερόκοκκοι δεν πληρούσαν το καθεστώς «Πιστοποιημένο τεκμήριο ασφάλειας», μια απόφαση που αμφισβήτησε την καταλληλότητα αυτών των συστατικών

ως προβιοτικών. (Xingmin Wang, 2020) Ενώ δεν αποτελεί κίνδυνο σε υγιή άτομα, γίνεται παθογόνος σε άτομα σε ΜΕΘ ή άτομα σε νοσηλεία με υποκείμενες ασθένειες, κατασταλμένο ανοσοποιητικό ή ηλικιωμένους και αποτελούν την τρίτη πιο συχνή αιτία σηψαιμίας στις Ηνωμένες Πολιτείες και τέταρτη στην Ευρώπη. (Carmen Torres, 2018) (Murray, 1999)

Ο εντερόκοκκος είναι ένα Gram θετικό βακτήριο σε σχήμα κόκκου, το οποίο αρχικά είχε καταταχθεί ως στρεπτόκοκκος, αλλά από το 1984 αναγνωρίζεται ως ξεχωριστό είδος, ύστερα από μελέτες DNA-RNA. Τα περισσότερα είδη εντερόκοκκου μπορούν να αναπτυχθούν υπό παρουσία 6,5 % NaCl, ανέχεται εξαιρετικά αλκαλικά περιβάλλοντα (pH 9,6), σε θερμοκρασίες από 10 - 45°C και μπορούν να επιβιώσουν 30 λεπτά σε θερμοκρασία 60 °C. (Jean-Claude Ogier, 2008) (Mina Nasiri, 2022) (Christopher P. McHugh, 2004)

Οι *Enterococcus faecalis* και *E. faecium* υπάρχουν φυσιολογικά στην πεπτική μικροχλωρίδα των ανθρώπων στη γαστρεντερική οδό. Επιπρόσθετα, εντερόκοκκοι απομονώνονται συχνά σε φαγητά, φυτά, νερό ή χώμα, ως αποτέλεσμα εναπόθεσης κοπράνων σε αυτά τα περιβάλλοντα και της φυσικής τους αντοχής σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι *E. faecalis* και *E. faecium* απαντώνται συχνά σε προϊόντα γάλατος και τυριών καθώς και προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση. (Jean-Claude Ogier, 2008) (Mina Nasiri, 2022)

Οι εντερόκοκκοι περιέχουν πολλά γονίδια λοιμογόνου δράσης, όπως ουσίες συσσωμάτωσης, ζελατινάση, κυτταρολυσίνη, εντεροκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη, υαλουρονιδάση. (Xingmin Wang, 2020) Αναγνωρίζονται επίσης για την ικανότητά τους να ανταλλάσσουν γενετικές πληροφορίες μέσω κινητών γενετικών στοιχείων καθώς και για την αντοχή τους στα αντιβιοτικά. Η παραγωγή βιογονικών αμινών (π.χ. ισταμίνη και τυραμίνη) και ο σχηματισμός βιομεμβράνες είναι μεταξύ των άλλων κύριων λοιμωδών χαρακτηριστικών του εντεροκόκκου και το καθιστούν ανθεκτικό σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. (Mina Nasiri, 2022)

#### 2.4.3 *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Murray et al, που την ονόμασε *Bacterium monocytogenes* εξαιτίας χαρακτηριστικής μονοκυττάρωσης (η μονοπυρήνωσης) που βρέθηκε σε μολυσμένα εργαστηριακά κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Το

σύγχρονο όνομά της το πήρε από τον Pirie το 1940. Η πρώτη απομόνωση του βακτηρίου συνέβη το 1929 από τον Gill, που το απομόνωσε από πρόβατα, και τον Nyfeldt που το απομόνωσε από ανθρώπους. Από τότε, σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης καταγράφονται ειδικά σε εργάτες που έρχονται σε επαφή με νεκρά ζώα. (J M Farber, 1991)

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα αναγνωρισμένο τροφογενές παθογόνο ευρέως κατανεμημένο στη φύση, αποτελεί τον αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης, μιας από τις πιο θανατηφόρες τροφιμογενείς ασθένειες στον άνθρωπο, ειδικά μεταξύ των ομάδων υψηλού κινδύνου, όπως οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες γυναίκες και τα βρέφη (Sara Lomonaco, 2015)) Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί σε τρόφιμα όπως γάλα, παράγωγα γάλακτος, κοτόπουλο, κρέας, προϊόντα κρέατος, θαλασσινά, ψάρια, έτοιμες τροφές και λαχανικά. (M. S. SCHVARTZMAN, 2011) (Robert M. Hanes, 2022) Η πιο κοινή αιτία λιστερίωσης θεωρείται ότι είναι η κατάποση τροφής που έχει μολυνθεί από *L. monocytogenes* από ακάθαρτο εξοπλισμό παραγωγής τροφίμων.

Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, ψυχοτρόπο, Gram θετικό, μη σπορογόνο ραβδοειδές βακτήριο, με ικανότητα πρόκλησης ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα, ιδιαίτερα μολύνσεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Σε αντίθεση με τα περισσότερα επιβλαβή βακτήρια η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται αργά σε τρόφιμα που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψύξης. Μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος θερμοκρασιών μεταξύ -0.4-50 βαθμούς κελσίου (J M Farber, 1991) Η ικανότητα του να επιβιώνει και να αναπτύσσεται όταν εκτίθεται σε αντίξοες συνθήκες όπως μέτριο pH και μειωμένη θερμοκρασία, υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου καθώς και η ικανότητα του να παράγει βιομεμβράνες και να επιβιώνει σε υγρά περιβάλλοντα, καθιστά δύσκολο τον έλεγχο αυτού του μικροοργανισμού στα τρόφιμα. (C.Rodriguezab, 2021)

Οι περισσότερες χώρες στην Ευρώπη έχουν μεταξύ 0,1-10 περιστατικών λιστερίωσης ανά εκατομμύριο τον χρόνο. Λόγω της πολύ μεγάλης θνητότητας της, κατατάσσεται στις πιο συχνές αιτίες θανάτου από τροφιμογενή ασθένεια. (McLauchlin J., 2004) (WHO, Listeriosis, 2018)

### Κεφάλαιο 3: Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί έντονη τάση μείωσης της κατανάλωσης των επεξεργασμένων προϊόντων τροφίμων, η οποία έχει οδηγήσει στην αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων επεξεργασίας τροφίμων με εναλλακτικές, συμπεριλαμβανομένης της ενσωμάτωσης μικροοργανισμών, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια, και αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες που παράγονται εντός του περιβάλλοντος του τροφίμου (Vougiouklaki, 2021). Τα συγκεκριμένα βακτήρια αποτελούν ιδανική επιλογή για εμπορική αξιοποίηση λόγω του χαρακτηρισμού τους ως GRAS (Generally Regarded As Safe) και του Τεκμηρίου Αναγνωρισμένης Ασφάλειας (Qualified Presumption of Safety, QPS) από την Ευρωπαϊκή Ένωση. (Sarah Crowley, 2013)

Η βιοσυντήρηση των τροφίμων με χρήση καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση, με σκοπό την αντικατάσταση των χημικών συντηρητικών στα τρόφιμα. Τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί από αρχαιότατων χρόνων στη ζύμωση προϊόντων τροφίμων και αποτελούν μία αποτελεσματική λύση για την επιμήκυνση του χρόνου ζωής και της ασφάλειας ενός προϊόντος τροφίμου χωρίς να επιδρούν αρνητικά στα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία του τροφίμου. (Vougiouklaki, 2021)

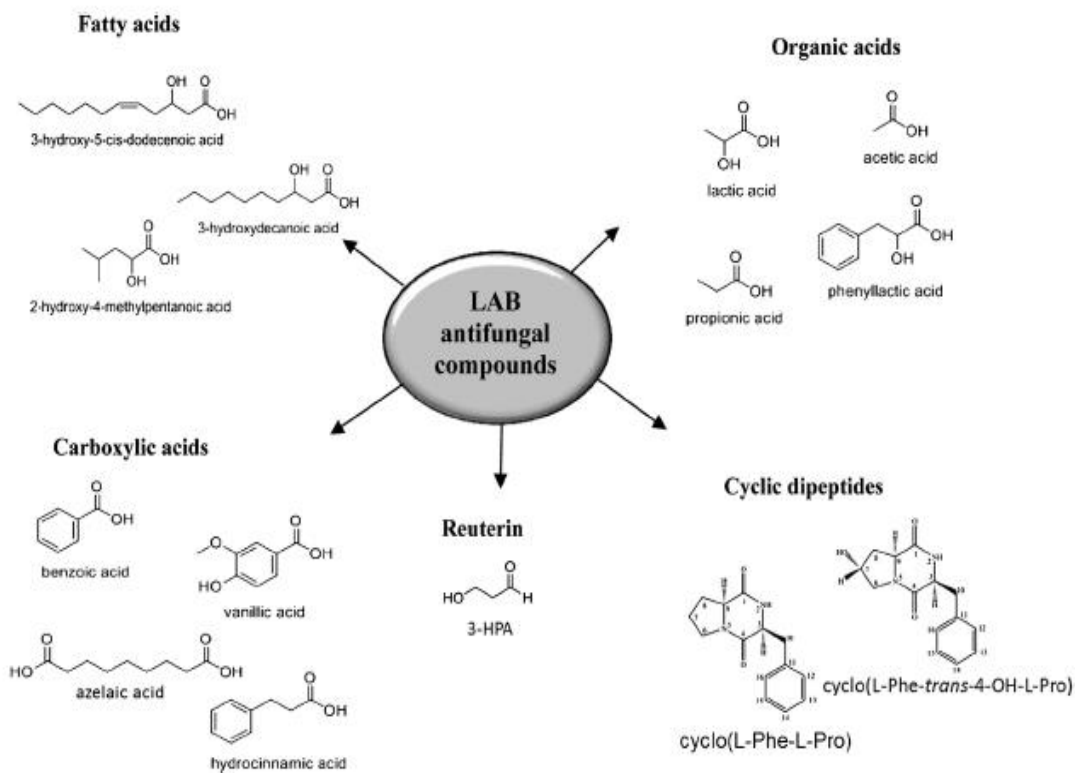
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα θετικών κατά Gram, μη αυτοκινούμενων, αεροανθεκτικών, ραβδομόρφων ή κοκκόμορφων μικροοργανισμών, που δε σχηματίζουν σπόρια και παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν κατά τη ζύμωση υδατανθράκων. Με βάση την αρχική ταξινόμηση των βακτηρίων, διακρίνονται τα εξής τέσσερα κύρια γένη που εμπλέκονται στις ζυμώσεις των τροφίμων: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. (Wessels, 2004)

Παρόλα αυτά, ύστερα από επαναταξινομήσεις, η αρχική αυτή ομαδοποίηση τροποποιήθηκε και εν τέλει τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται στα ακόλουθα γένη: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weisella*. Όπως αναφέρθηκε, τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες ως παράγοντες βιοσυντήρησης και έτσι, έχουν βασικό ρόλο σε ένα μεγάλο εύρος ζυμώσεων τροφίμων συμπεριλαμβανόμενων

βανομένων του γάλακτος, των κρεάτων, των λαχανικών και των ζυμαριών, μέσω πρόκλησης ταχείας όξυνσης της πρώτης ύλης. (T.V. Plavec, 2020)

Εκτός από τις ιδιότητές τους ως μέσα συντήρησης των τροφίμων, ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν προβιοτικές ιδιότητες. Πολλά στελέχη του γένους *Lactobacillus* αξιοποιούνται συχνά για τον προβιοτικό τους χαρακτήρα.

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν τροποποίηση της ανοσοποιητικής απόκρισης, ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και παραγωγή φυσικών αντιμικροβιακών και αντιμικητιακών ουσιών για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται οι κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. (Sarah Crowley, 2013)



Εικόνα 4. Χημικές δομές διαφόρων αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

### 3.1 Μεταβολίτες οξυγαλακτικών βακτηρίων - Αντιμικροβιακές Ουσίες

Κατά τη γαλακτική ζύμωση, τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν διάφορες ενώσεις όπως οργανικά οξέα, διακετύλιο, υπεροξείδιο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες ή βακτηριοκτόνες πρωτεΐνες. Τα συγκεκριμένα μεταβολικά προϊόντα έχουν θετική επίδραση στη γεύση, στην οσμή, στο χρώμα και στην υφή των τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών, παρατείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής του τροφίμου.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ ως τελικά προϊόντα ζύμωσης κατά το μεταβολισμό υδατανθράκων. Η παραγωγή αυτών των ασθενών οργανικών οξέων οδηγεί σε ένα όξινο περιβάλλον το οποίο περιορίζει γενικών την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων πολλών παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. (Sarah Crowley, 2013)

Η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων οφείλεται στη συνδυαστική δράση των ουδέτερων μορίων και των ιόντων. Κατά την προσθήκη ενός οξέος στο περιβάλλον του τροφίμου, ανάλογα με το pH του τροφίμου, τη σταθερά  $pK_a$  του οξέος και τη θερμοκρασία, μερικά μόρια ιοντίζονται ενώ άλλα παραμένουν ουδέτερα. (Hafize Fidan T. E., 2022) Έτσι, με την προσθήκη των οξέων αυτών επιτυγχάνεται μείωση του pH σε επίπεδα κάτω από το εύρος ανάπτυξης και μεταβολικής αναστολής. (Sarah Crowley, 2013)

Το κάθε οξύ παρουσιάζει διαφορετική αντιμικροβιακή δράση, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι ο συνδυασμός συγκεκριμένων οξέων οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, το οξικό οξύ θεωρείται ότι έχει συνεργιστική δράση με το γαλακτικό οξύ στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων. Παρόλα αυτά, το οξικό οξύ χαρακτηρίζεται πιο δραστικό λόγω της υψηλότερης τιμής  $pK_a$  που συνεπάγεται μεγαλύτερο βαθμό ιοντισμού εντός των κυττάρων. Η χαμηλότερη αντιμικροβιακή δράση του γαλακτικού οξέος οφείλεται πιθανόν στη χαμηλή  $pK_a$  του.

Η αντιμικροβιακή δράση των ουδέτερων μορίων επιτυγχάνεται μέσω ιοντισμού των μορίων στο κυτόπλασμα που λαμβάνει χώρα μετά τη διέλευσή τους μέσω της μεμβράνης. Τα ιόντα  $H^+$  που απελευθερώνονται μετά τον ιοντισμό μειώνουν τη διαμεμβρανική βαθμίδα πρωτονίων, εξουδετερώνουν την πρωτονιεργετική δύναμη και μειώνουν το εσωτερικό pH, προκαλώντας μετουσίωση των πρωτεϊνών και απώλεια βιωσιμότητας. Επιπλέον, η διείδυση γαλακτικού οξέος εντός των κυττάρων μέσω της μεμβράνης οδηγεί

σε μείωση του ενδοκυτταρικού pH. Σε πρόσφατη μελέτη, έχει βρεθεί ότι το γαλακτικό και το οξικό οξύ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 17.5 mM, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των στελεχών *Cladosporium sp.* YS1 και *Penicillium crustosum* YS2. (Baek, 2012)

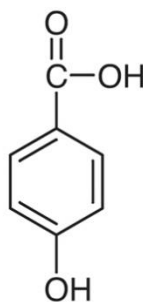
Το προπιονικό οξύ έχει επίσης αντιμικροβιακή δράση, κυρίως έναντι μυκήτων και ζυμών, με τιμή pKa ίση με 4.87, υψηλότερη από την αντίστοιχη του οξικού οξέος (pKa 4.76). Διάφορα οργανικά οξέα-μεταβολίτες οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν αξιοποιηθεί ως αναστολείς μικροβιακής ανάπτυξης, ενώ θεωρείται ότι λαμβάνουν χώρα και συνεργιστικά φαινόμενα. Για παράδειγμα, ένα μίγμα οξικού, φορμικού, προπιονικού, βουτυρικού, καπροϊκού και η-βαλερικού οξέος, παραγόμενο από το στέλεχος *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, έχει βρεθεί ότι έχει ευρεία αντιμικροβιακή δράση. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν, επίσης, και άλλα καρβοξυλικά οξέα που μπορούν να δράσουν ως αντιμικροβιακές ουσίες. Εννέα καρβοξυλικά οξέα, συμπεριλαμβανομένων του D-γλυκουρονικού οξέος, του σαλικυλικού οξέος και τριών παραγώγων κινναμωμικού οξέος έχουν απομονωθεί ως αντιμικροβιακές ενώσεις από το στέλεχος *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280. (Sarah Crowley, 2013)

Άλλα καρβοξυλικά οξέα όπως βενζοϊκό, βανιλικό, αζεαλικό, υδροξυκινναμωμικό και υδροξυβενζοϊκό οξύ έχουν απομονωθεί ως αντιμικροβιακές ουσίες από το στέλεχος *Weisella cibaria* PS2 και τρία στελέχη του γένους *Lactobacillus* (Brosnan B., 2012).

#### 3.1.1 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-hydroxybenzoic acid)

Το βενζοϊκό οξύ, τα άλατα και οι εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν το μεγαλύτερο εύρος αντιμικροβιακής δράσης και είναι χρήσιμα έναντι πολλών αλλοιογόνων βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών. Το βενζοϊκό οξύ έχει πολύ καλή δράση όσον αφορά την παρεμπόδιση βακτηρίων που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση ή σχηματίζουν σπόρια όταν χρησιμοποιείται σε φυσιολογικές ποσότητες σε τρόφιμα με χαμηλές τιμές pH, αλλά δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη διατήρηση των τροφίμων έναντι αλλοιογόνων βακτηρίων τα οποία είναι πιο ανθεκτικά.



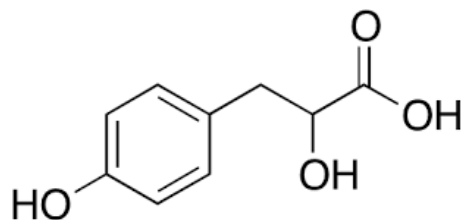


Εικόνα 5. Χημική δομή 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος.  
(wikidata, n.d.)

Σε τρόφιμα με pH 2,5-4 θεωρείται καταλληλότερο το βενζοϊκό οξύ, ενώ οι εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος είναι πιο αποτελεσματικοί σε τρόφιμα με τιμές pH από 7 και πάνω. Ωστόσο, δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί έναντι βακτηρίων και ειδικά έναντι αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Έτσι, σε σχετικά όξινα προϊόντα, όπου οι ζύμες και οι μύκητες αποτελούν τις κυριότερες αιτίες αλλοίωσης προτιμάται η χρήση βενζοϊκού οξέος και αλάτων αυτού (Wedzicha 2003). Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι σε συγκεντρώσεις άνω των 2,5mg/ml έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Ganoderma boninense*. (Khim Phin Chong, 2009)

### 3.1.2 DL-p-υδροξυ-φαιnyλο-γαλακτικό οξύ (DL-p-hydroxyphenyl-lactic acid, OH-PLA)

Το DL-p-υδροξυ-φαιnyλο-γαλακτικό οξύ είναι ένα 2-υδροξυ καρβοξυλικό οξύ και συγκεκριμένα ένα γαλακτικό οξύ, όπου ένα από τα μεθυλιωμένα υδρογόνα έχει αντικατασταθεί από μια 4-υδροξυφαιnyλική ομάδα.



Εικόνα 6. Χημική δομή DL-p-υδροξυ-φαιnyλο-γαλακτικού οξέος.  
(Merck, DL-p-Hydroxyphenyllactic acid structure, n.d.)

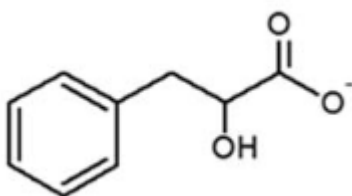
Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την παραγωγή του συγκεκριμένου οξέος, ως έναν νέο αντιμικροβιακό συστατικό, σε καλλιέργεια *Lactobacillus sp.*, βρέθηκε ότι το

συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος είχε την ικανότητα να παράγει 4-υδροξυ-φαινυλο-γαλακτικό οξύ σε ποσότητες 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Η προσθήκη τυροσίνης και 4-υδροξυ-φαινυλο-πυρουβικού οξέος κατά τη διάρκεια της επώασης παρατηρήθηκε ότι μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την παραγωγή, με την προσθήκη 4-υδροξυ-φαινυλο-πυρουβικού οξέος να οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερες ποσότητες OH-PLA από την προσθήκη τυροσίνης, παράγοντας ποσότητες έως και 1,26  $\text{mg}/\text{ml}$ . (Mu W, 2010)

Σε μια άλλη έρευνα εξετάστηκε μέσω HPLC ανάλυσης σε 29 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, ευρέως χρησιμοποιούμενων στην παραγωγή προϊόντων ζύμωσης, η ικανότητα 29 διαφορετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν φαινυλο-γαλακτικό (PLA) και 4-υδροξυ-φαινυλο-γαλακτικό (OH-PLA) οξύ. (Francesca Valerio, 2006).

Στα στελέχη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc citreum*, και σε κάποια από τα στελέχη *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* παρατηρήθηκε παραγωγή μεταβολιτών. Η αύξηση της συγκέντρωσης φαινυλαλανίνης και η προσθήκη μικρών ποσοτήτων τυροσίνης στην καλλιέργεια βελτίωσε την παραγωγή PLA από το στέλεχος *Lactobacillus plantarum*. (Francesca Valerio, 2006)

### 3.1.3 Φαινυλο-γαλακτικό οξύ (phenyl-lactic acid, PLA)



Εικόνα 7. Χημική δομή φαινυλο-γαλακτικού οξέος. (Xiuting Wang Y. H., 2018)

Το φαινυλο-γαλακτικό οξύ (PLA) που ονομάζεται επίσης  $\beta$ -φαινυλογαλακτικό οξύ, 3-φαινυλογαλακτικό οξύ ή 2-υδροξυ-3-φαινυλοπροπανοϊκό οξύ, είναι ένα πολύτιμο οργανικό οξύ ευρέως παρεβρισκόμενο στη φύση. Έχει αναφερθεί ευρέως ως αντιμικροβιακή ουσία, η οποία έχει ευρεία αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση και είναι, πιθανόν, ένα από τα πιο μελετημένα αντιμυκητιασικά οργανικά οξέα που παράγονται από τα

οξυγαλακτικά βακτήρια. Έχουν παρατηρηθεί βακτηριοκτόνες δράσεις έναντι τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. Το PLA έχει επανειλημμένα απομονωθεί ως ο παράγοντας αναστολής μυκητιακής ανάπτυξης σε πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια και συνήθως έχει συνεργιστική δράση μαζί με άλλους μεταβολίτες. (Xiuting Wang Y. H., 2018)

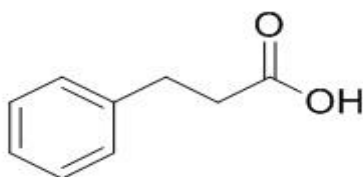
Η χαμηλή τοξικότητά του και η έλλειψη κάποιας αισθητής οσμής κάνει το PLA μία καλή εναλλακτική για τον περιορισμό της αλλοίωσης των τροφίμων, πιθανόν σε συνδυασμό με συμπληρωματικές εφαρμογές. Παράλληλα, αποτελεί ένα ιδανικό αντισηπτικό που έχει λάβει μεγάλη προσοχή στη βιομηχανία τροφίμων, για τον έλεγχο μικροβιακών ρύπων. Η παραγωγή PLA από οξυγαλακτικά βακτήρια περιγράφηκε πρώτη φορά από τους (Paola Lavermicocca, 2000), οι οποίοι απομόνωσαν αυτή την ουσία από το εναίωμα του στελέχους *Lactobacillus plantarum*. Αποτελεί ένα υποπροϊόν του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης σε βακτήρια γαλακτικού οξέος, στα οποία η φαινυλαλανίνη τρανσαμινώνεται σε φαινυλοπυρουβικό οξύ (PPA) και ύστερα σε PLA. (Xiuting Wang Y. H., 2018)

Ένα μεγάλο εύρος στελεχών του γένους *Lactobacillus*, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus fermentum* έχουν βρεθεί ότι μπορούν να παράγουν PLA ως αντιμικροβιακή ουσία, με τα επίπεδα παραγωγής του να διαφέρουν από περίπτωση σε περίπτωση. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η αντικατάσταση της πεπτόνης στο MRS με το υγρό παραπροϊόν που προκύπτει από την επεξεργασία του καλαμποκιού, ως μοναδική πηγή αζώτου, βελτιώνει την παραγωγή του PLA από οξυγαλακτικά βακτήρια. (Sarah Crowley, 2013)

#### 3.1.4 Υδροξυκινναμωμικό οξύ (hydrocinnamic acid)

Τα παράγωγα υδροξυκινναμωμικού οξέος είναι μια σημαντική κλάση πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες προέρχονται από το Mavolanate-Shikimate μονοπάτι βιοσύνθεσης στα φυτά. Διάφορες απλές φαινυλικές ενώσεις όπως το κινναμωμικό οξύ, το πικουμαρικό, το φερουλικό, το καφεϊκό, το χλωρογενικό και το ροζμαρινικό οξύ ανήκουν στη συγκεκριμένη τάξη. Οι συγκεκριμένες ενώσεις κατέχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και

αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καθώς και έχουν δείξει πιθανά θεραπευτικά οφέλη σε περιπτώσεις διαβήτη και υπερλιπιδαιμίας. (Md Ashraful Alam, 2016)



Εικόνα 8. Χημική δομή υδροξυκινναμωμικού οξέος. (Merck, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid structure, n.d.)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα φαινολικά οξέα αναστέλλουν την βακτηριδιακή ανάπτυξη μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως η αλλαγή της διαπερατότητας της μεμβράνης, την αλλαγή της ροής καλίου στο κύτταρο, προκαλώντας διαρροή νουκλεοτιδίων, αλλαγή του επιφανειακού φορτίου το βακτηρίου, και μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες και στο DNA. (Soyer, 2019)

Σε έρευνα αξιολογήθηκε η ικανότητα αντίστασης των βακτηρίων ως προς φαινολικά οξέα. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης αντίστασης 2 τύπων βακτηρίων, ενός *Staphylococcus aureus* με αντίσταση στην μεθικιλίνη, και ενός χωρίς αντίσταση, σε 2 τύπους φαινολικών οξέων και σε ένα αντιβιοτικό. Στην αρχή του πειράματος υπολογίστηκαν οι ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής ανάπτυξης (MICs) των βακτηρίων του βανιλικού οξέος, του 2-υδροξυκινναμωμικού οξέος και της βανκομυκίνης και βρέθηκαν 2,5 mg/mL βανιλικού οξέος, 1,6 mg/mL 2-HCA, και 0.01 mg/mL βανκομυκίνης αντίστοιχα και για τα δύο βακτήρια. (Soyer, 2019)

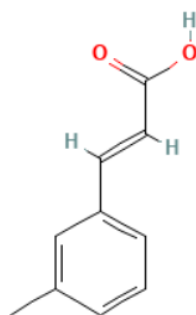
Σε άλλη έρευνα διαπιστώθηκε ότι το π-κουμαρικό οξύ ανέστειλε αποτελεσματικά την ανάπτυξη όλων των ελεγχόμενων βακτηρίων, με τιμές μεταξύ 10 - 80 µg/ml π-κουμαρικού οξέος να έχουν την ικανότητα να αυξάνουν σημαντικά την διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και της μεμβράνης πλάσματος στα βακτήρια, οδηγώντας σε απώλεια της λειτουργίας φραγής. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το π-κουμαρικό οξύ μπορεί να επικολλήσει στη φωσφορική περιοχή της διπλής αλυσίδας DNA και να παρεμβληθεί στις αυλακώσεις αυτής, και με αυτό τον τρόπο να επηρεάσει την αντιγραφή και έκφραση. Αποδείχθηκε έτσι ότι το π-κουμαρικό οξύ έχει διπλό μηχανισμό δράσης ενάντια στα

βακτήρια. Πρώτον διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και προσδένεται στο βακτηριακό γονιδιωματικό DNA αναστέλλοντας κυτταρικές λειτουργίες, οδηγώντας έτσι σε κυτταρικό θάνατο. (Zaixiang Lou, 2012)

Άλλη χρήση των υδροξυκιναμμωμικών οξέων είναι ως συστατικά σε ενεργές μεμβράνες συσκευασίας, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Συγκεκριμένα αυτές οι μεμβράνες μπορεί να παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ικανότητες, ικανότητες απορρόφησης υγρασίας και καθαρισμού του διοξειδίου του άνθρακα και του αιθυλενίου. Σε έρευνα εξετάστηκε ο εμπλουτισμός του Chitosan (CS), ενός θετικά ιονισμένου πολυσακχαρίτη με τρία διαφορετικά είδη υδροξυκιναμμωμικού οξέος (π-κουμαρικό, καφεϊκό και φερουλικό). Τα ποσοστά εμβολιασμού της CS ήταν 73, 68, 129, 42 και 91,75 mg/g αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι μεταξύ των τριών εμβολιασμένων μεμβρανών, η μεμβράνη που ήταν εμβολιασμένη με καφεϊκό οξύ εμφάνισε τη μεγαλύτερη μηχανική αντοχή και αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επιπλέον, η συσκευασία με τη συγκεκριμένη μεμβράνη κατόρθωσε να επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του χοιρινού σε 10 μέρες στους 4 °C. (Huimin Yong, 2021)

### 3.1.5 Μεθοξυκιναμμωμικό οξύ (methylcinnamic acid)

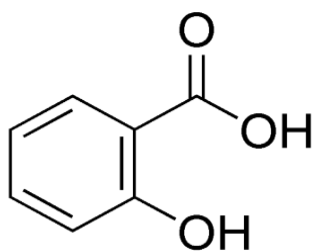
Τα μεθοξυκιναμμωμικά οξέα είναι κιναμμωμικά οξέα, τα οποία έχουν υποκαταστάτη μεθυλίου σε συγκεκριμένη θέση στο δακτύλιο φαινυλίου.



Εικόνα 9. Χημική δομή μεθοξυκιναμμωμικού οξέος.  
(ChemSpider, n.d.)

Παράγωγα του μεθοξυκιναμωμικού οξέος έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμυκητιασική δράση έναντι των μυκήτων των γενών *Trametes*, *Lenzites*, and *Laetiporus*, οι οποίοι αναγνωρίζονται ως βασικοί μύκητες δασικής φθοράς (Sen-Sung Cheng, 2008)

### 3.1.6 Σαλικυλικό οξύ (salicylic acid)



Εικόνα 10. Χημική δομή σαλικυλικού οξέος. (Salicylic acid chemical structure, 2020)

Το σαλικυλικό οξύ, ένα φαινολικό οξύ με αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία υδροξυλομάδα ή μία λειτουργική ομάδα, είναι μία ενδογενής φυτική ορμόνη που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των φυτών και την κυτταρική σηματοδότηση. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την αντιμικροβιακή δράση του έναντι συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε γεωργικά προϊόντα μετά τη συγκομιδή, όπως τα στελέχη *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* και *Rhizopus stolonifer*. (Argus Cezar da Rocha Neto, 2015)

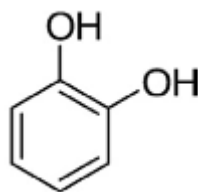
Το σαλικυλικό οξύ χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακός παράγοντας σε τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα. Αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση θρόμβων στο αίμα και στη μείωση της χοληστερόλης. Το συγκεκριμένο οξύ χρησιμοποιείται σε μικρές ποσότητες ως συντηρητικό τροφίμων και ως αντισηπτικό. (Burak DEMİRHAN, 2019)

Έχει μελετηθεί η εισαγωγή σαλικυλικού οξέος σε πολυμερή. Το πολυμερές HBPE στο οποίο είχε εισαχθεί ποσότητα σαλικυλικού οξέος εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων (*Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus*) και μυκήτων (*Aspergillus niger*) που μελετήθηκαν, εκτός από την περίπτωση μικροοργανισμών όπως το κατά Gram αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* και την ζύμη *Candida albicans*. (Prabu, 2018)

Τέλος, μέσω *in vitro* έρευνών έχει σημειωθεί ότι η προσθήκη σαλικυλικού οξέος επιτυγχάνει μείωση του σχηματισμού βιομεμβανών, του βακτηρικού πολλαπλασιασμού καθώς και επαγωγή των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. (Leon Iri Kurferwasser, 2003) Παράλληλά προκαλεί μετρήσιμη λιπιδική βλάβη και κυτταρική αποδιοργάνωση. Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται μια ασφαλής για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία ουσία και μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική λύση για μυκητοκτόνα. (Argus Cezar da Rocha Neto, 2015)

### 3.1.7 1,2-διυδροξυβενζένιο (1,2-dihydroxybenzene)

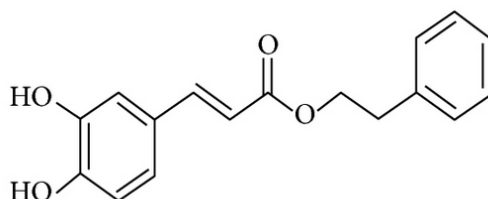
Το 1,2-διυδροξυβενζένιο, το οποίο συχνά αναφέρεται ως πυροκατεχόλη ή κατεχόλη, είναι ένα φαινολικό οξύ το οποίο εντοπίζεται συχνά σε δεσμευμένη μορφή σε φαγητά ως τμήμα σύνθετων δομών όπως οι λιγνίνες και οι υδρολυόμενες τανίνες και περιγράφεται ως μια αντιμυκητησιακή ένωση.



Εικόνα 11. Χημική δομή κατεχόλης. (Jing Wanga, 2019)

Η κατεχόλη που περιέχει τέσσερα άλατα ιμιδαζολίου και οκτώ άλατα βενζιμιδαζολίου, τα οποία έχουν μελετηθεί ως προς την αντιμικροβιακή δράση τους έναντι αρνητικών κατά Gram και θετικών κατά Gram βακτηρίων όπως και έναντι στελεχών μυκήτων. Στην *in vitro* έρευνα που πραγματοποιήθηκε τα άλατα βενζιμιδαζολίου εμφανίζουν ισχυρότερη ανασταλτική δράση από τα άλατα ιμιδαζολίου έναντι όλων των βακτηριακών και μυκητιακών στελεχών. Παράλληλα, τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων, το οποίο αποδίδεται στην σύσταση της εξωτερική μεμβράνη τους. (Mert O. Karatas, 2020)

### 3.1.8 Καφεϊκό οξύ (caffeic acid)



Εικόνα 12. Χημική δομή του φαιναιθυλεστέρα του καφεϊκού οξέος.  
(Ghulam Murtaza, 2014)

Το καφεϊκό οξύ, επίσης γνωστό ως 3,4-διυδροξυκινναμωμικό οξύ, ανήκει στα μη φλαβονοειδή χλωρογενικά οξέα και αποτελεί μια πολύτιμη αρωματική ένωση (φαιναιθυλεστέρα) που διαθέτει πολλές σημαντικές φαρμακευτικές δραστηριότητες. (Zhang, 2012) (Dharmendra KumarMaurya, 2010)

Συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος βρίσκονται σε αφθονία στον καφέ, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα έλαια και το τσάι. (Farhan Ahmed Khan, 2016) Λαχανικά όπως κολοκυθάκια, μελιτζάνα, μπρόκολο, κρεμμύδι, σπανάκι, αρακάς, πράσινη πιπεριά, μπάμιες, λάχανο, γλυκοπατάτες καθώς και η πρόπολη και βότανα όπως ρίγανη (55,1ppm), δεντρολίβανο (42,2ppm), φασκόμηλο (41,0ppm), βασιλικός (32,0ppm) και κόλιανδρος (12,9ppm) αποδεδειγμένα φέρουν συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος. (Adriana Dillenburg Meinhart, 2019)

Παράλληλα, ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει αναφερθεί για την ικανότητα βιοσύνθεσης καφεϊκού οξέος. Έχει μελετηθεί η ελεγχόμενη παραγωγή καφεϊκού οξέος χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο ρυθμιστικό σύστημα για τον έλεγχο των γονιδίων που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του *S. cerevisiae* με αποτέλεσμα την επίτευξη βιοσύνθεσης καφεϊκού οξέος 222,7 ppm. (Pingping Zhou, 2021)

Έχουν διεξαχθεί πειράματα *in vitro* και *in vivo*, που αποδεικνύουν αναρίθμητες φυσιολογικές επιδράσεις του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων της, όπως αντιβακτηριακή δράση, αντική δράση, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδη δράση, αντιδιαβητική δράση, καρδιοπροστατευτική δραστηριότητα, ηπατοπροστατευτική δραστηριότητα, αντικαρκινική δραστηριότητα. (Espíndola KMM, 2019)

Το καφεϊκό οξύ δρα ως πρωτογενές και δευτερογενές αντιοξειδωτικό (μικτό αντιοξειδωτικό). Ως πρωταρχικό αντιοξειδωτικό δρα διακόπτοντας τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών αναστέλλοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αντίθετα, ως δευτερεύον αντιοξειδω-

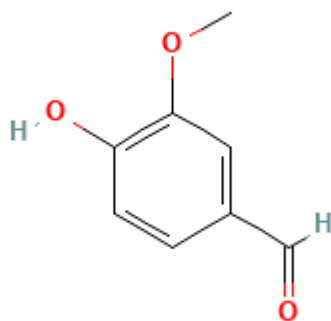


τικό (προοξειδωτικό), δρα ως χηλικός παράγοντας, σχηματίζοντας σύμπλοκα με μέταλλα (κυρίως σίδηρο και χαλκό), αναστέλλοντας την αποσύνθεση των υπεροξειδίων, μειώνοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την προσβολή τους σε λιπίδια, αμινοξέα πρωτεϊνών, διπλό δεσμό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και βάσεων DNA, αποφεύγοντας έτσι το σχηματισμό βλαβών και απώλειας κυτταρικής ακεραιότητας. (Espíndola KMM, 2019) (Isabel Medina, 2012)

Παράλληλα, υπάρχουν πολλές μελέτες που καταδεικνύουν την αντιμικροβιακή δράση του καφεϊκού οξέος έναντι των *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Haemophilus influenzae* και δείχνουν ότι το RNA, το DNA και οι κυτταρικές πρωτεΐνες είναι πιθανοί στόχοι του. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το καφεϊκό οξύ έχει πολλά υποσχόμενη μυκητοκτόνο δράση. Η αντιμικροβιακή δράση του καφεϊκού οξέος αποδίδεται στην ουσία Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) που περιέχει το καφεϊκό οξύ καθώς και στη σύνθεση δραστικών ειδών οξυγόνου που προκαλούν βλάβη στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων, όπως πρωτεΐνες πορίνης και λιπιδικές στοιβάδες. (Rasha AlSheikh, 2022) (Ghulam Murtaza, 2014) Επιπλέον, το καφεϊκό οξύ μπορεί να προκαλέσει στρες σε ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου και να οδηγήσουν σε βλάβες των πρωτεϊνών και του DNA των βακτηρίων. (Sun Lee, 2012)

### 3.1.9 Βανιλικό οξύ (vanillic acid)

Το βανιλικό οξύ (4-υδροξυ-3-μεθοξυ βενζοϊκό οξύ) είναι ένα αρωματικό φαινολικό οξύ με μοριακό βάρος 168.14 g/mol και ελαφρά κίτρινη απόχρωση. Αποτελεί μία οξειδωμένη μορφή της βανιλίνης και αναδύει ένα ευχάριστο άρωμα. Χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας στις βιομηχανίες τροφίμων. (Neha Sharma, 2020)



Εικόνα 13. Δομή βανιλικού οξέος. (PubChem, 2022)

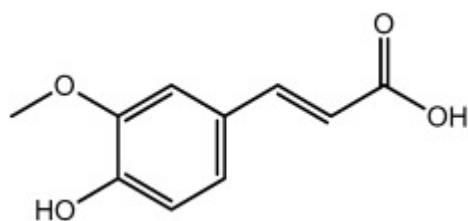
Εκτός από αρωματικές ιδιότητες, το βανιλικό οξύ παρουσιάζει αρκετές βιοδραστικές ιδιότητες. Είναι ιδιαίτερα γνωστό για τις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις έναντι ζυμομυκήτων, μούχλας και βακτηρίων. Η βανιλίνη έχει επίσης αναφερθεί ότι διαθέτει, αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Για το λόγο αυτό μελετάται σε διάφορες φαρμακολογικές εφαρμογές. (Neha Sharma, 2020)

Το βανιλικό οξύ έχει αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση. Μέσω *in vitro* ερευνών έχει παρατηρηθεί ισχυρή αναστολή των θετικών κατά Gram βακτηρίων όπως *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, όπως και των κατά Gram αρνητικών στελεχών *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *E. coli*. (PASCAL DELAQUIS, 2004)

Μέσω των *in vitro* μελετών διαπιστώθηκε ότι το βανιλικό οξύ εμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων ρυθμίζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών τους και την ικανότητα βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι μπορεί να προκαλέσει σοβαρή διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης, με κάποιες περιπτώσεις να παρουσιάζουν και πλήρη διαχωρισμό της κυτταρικής μεμβράνης από το κυτταρικό τοίχωμα. Πιθανός μηχανισμός δράσης του βανιλικού οξέος αποτελεί η μείωση του ενδοκυτταρικού pH των βακτηρίων, των επίπεδων ATP, του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης, και του σχηματισμού βιομεμβανών. (Weidong Qian, 2019)

#### 3.1.10 Φερουλικό οξύ (ferulic acid)

Το φερουλικό οξύ (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) είναι ένα φαινολικό οξύ που υπάρχει στους σπόρους, τα φυτά, τόσο στην ελεύθερη μορφή του, όσο και συζευγμένο με τους πολυσακχαρίτες, τις γλυκοπρωτεΐνες, τις πολυαμίνες, τη λιγνίνη και τα υδροξυλιπαρά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. (Naresh Kumar, 2014) Έχει χαμηλή τοξικότητα και μπορεί να απορροφηθεί και να μεταβολιστεί εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό. (Shiyi Ou, 2004)



Εικόνα 14. Δομή φερουλικού οξέος. (Ramón Ordoñez, 2022)

Διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιμυκητιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαγγειακές δραστηριότητες. Αποτελεί παράγοντα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και ταυτόχρονα αναστολέα ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών. (Khatkar, 2013)

Παράλληλα, έχει ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης σε θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ζυμομύκητες. Μέσω των *in vitro* μελετών έχουν διαπιστωθεί ισχυρές ανασταλτικές επιδράσεις έναντι της ανάπτυξης ορισμένων μικροβίων που αποικίζουν στην μικροχλωρίδα του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter kosaserico*, και *Shigella*. Ο αντιμικροβιακός μηχανισμός του φερουλικού οξέος αποδίδεται στην αναστολή της αρυλαμίνης N-ακετυλοτρανσφεράσης στα βακτήρια. (Shiyi Ou, 2004)

Τέλος, χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών. (Ramón Ordoñez, 2022)

## Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση πιθανής αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι παθογόνων βακτηρίων τα οποία είναι άμεσα συνδεδεμένα με την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων.

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών χωρίστηκε σε δύο σκέλη:

### Μέρος Α

Αρχικά, μελετήθηκαν τέσσερα διαφορετικά παθογόνα βακτήρια και έντεκα διαφορετικοί μεταβολίτες οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι συγκεντρώσεις των οποίων κυμάνθηκαν αναλόγως των αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης που εμφάνιζαν στο κάθε παθογόνο βακτήριο. Επίσης, μελετήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη που απαιτείται για την πλήρη θανάτωση του κάθε βακτηριακού στελέχους καθώς και οι διαφοροποιήσεις τις οποίες εμφάνισαν τα παθογόνα βακτήρια μεταξύ τους σε σχέση με την ανθεκτικότητα τους έναντι των μεταβολιτών.

### Μέρος Β

Απομονώθηκαν οι μεταβολίτες από δύο διαφορετικά έτοιμα παρασκευάσματα ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων και μελετήθηκε η ύπαρξη πιθανής αντιμικροβιακής δράσης των παραγόμενων μεταβολιτών τους καθώς και ο απαιτούμενος χρόνος επώασης αυτών για την παραγωγή ποσότητας μεταβολιτών ικανής να μειώσουν την αρχική βακτηριακή συγκέντρωση.

## Κεφάλαιο 5: Υλικά – Μέθοδοι

### 5.1 Υλικά και Αναλώσιμα

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων ήταν απαραίτητη η χρησιμοποίηση των ακόλουθων υλικών και αναλωσίμων καθώς και η χρήση συγκεκριμένου εξοπλισμού.

#### 5.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα

- CHROMagar SALMONELLA PLUS, Bioprepare
- CHROMagar S. AUREUS, Bioprepare
- CHROMagar LISTERIA, Bioprepare
- Listeria Agosti Ottavianni Agar, Bioprepare
- CHROMagar ENTEROCOCCUS, Bioprepare
- CHROMagar ORIENTATION, Bioprepare
- CHROMagar ECC, Bioprepare
- MRS broth, Bioprepare
- Stock culture broth, Bioprepare

#### 5.1.2 Πρότυπα βακτηριακά στελέχη

- *Salmonella enterica* ATCC# 14028, Bioprepare
- *Staphylococcus aureus* ATCC# 25923, Bioprepare
- *Listeria monocytogenes* ATCC# 19115, Bioprepare
- *Enterococcus faecalis* ATCC# 29212, Bioprepare
- *Escherichia coli* ATCC# 2592, Bioprepare

#### 5.1.3 Παρασκευάσματα οξυγαλακτικών βακτηρίων

- No 2. BioGaia ProTectis Family (*Lactobacillus reuteri*)
- No 3. Comfort Lactone (*Lactobacillus rhamnoses*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifibacterium lactis*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifibacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*)

#### 5.1.4 Χημικά αντιδραστήρια

- Sodium chloride anhydrous, Sigma - Aldrich
- McFarland 0.5, Biomerieux
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH 4
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH 7
- 4-Hydroxybenzoic acid
- DL-p-hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA)
- Phenyllactic acid (PLA)
- hydrocinnamic acid
- 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid
- Methylcinnamic acid
- Salicylic acid
- 1,2 dihydroxybenzene (catechol)
- Caffeic acid
- Vanillic acid
- Feruric acid

#### 5.1.5 Εξοπλισμός

- Επωαστικός κλίβανος
- Vortex
- Πιπέτες
- Φυγόκεντρος
- Θερμόμετρο
- Υγρός κλίβανος αποστείρωσης
- pH μέτρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Ψυγείο
- Κατάψυξη

## 5.2 Μέθοδοι

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων χωρίστηκε σε δύο σκέλη.

- Στο πρώτο σκέλος (Μέρος Α) μελετήθηκαν χημικές ουσίες, που αποδεδειγμένα μέσω επιστημονικών ερευνών αποτελούν μεταβολικά προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ανιχνεύτηκε η ελάχιστη συγκέντρωση της κάθε χημικής ουσίας που απαιτείται για την πλήρη θανάτωση των υπό εξέταση βακτηριακών παθογόνων στελεχών.
- Στο δεύτερο σκέλος απομονώθηκαν οι μεταβολίτες από παρασκευάσματα ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση στους αντίστοιχα υπό εξέταση βακτηριακά παθογόνα στελέχη.

Για την διεκπεραίωση των παραπάνω πειραμάτων (Μέρος Α και Μέρος Β) χρειάστηκε η παρασκευή συγκεκριμένων διαλυμάτων, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά στις ενότητες 5.2.1, 5.2.2 και 5.2.3 της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Στην ενότητα 5.2.4 αναλύονται ξεχωριστά τα επιπλέον αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν καθώς και η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων του Μέρους Α. Αντίστοιχα, η μεθοδολογία και τα επιπλέον αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν για την διεκπεραίωση του Μέρους Β των πειραμάτων αναφέρονται αναλυτικά στη ενότητα 5.2.5.

### 5.2.1 Παρασκευή αραιωτικών διαλυμάτων

Για την παρασκευή των αραιωτικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Sodium chloride anhydrous της εταιρίας Sigma-Andrich. Παρασκευάστηκε διάλυμα NaCl σε συγκέντρωση 0,9% και ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος ώστε να βρίσκεται σε τιμή pH μεταξύ 6 και 7. Η τιμή pH του παρασκευασμένου διαλύματος επιβεβαιώθηκε με την βοήθεια τη συσκευής pHμέτρου η οποία είχε βαθμονομηθεί με ρυθμιστικά διαλύματα pH 4 και pH 7.

Ύστερα, το διάλυμα διανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, σε ποσότητα 9ml, και οι δοκιμαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν προς αποστείρωση σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης για 20 λεπτά στους 121°C.

Τα αποστειρωμένα αραιωτικά διαλύματα NaCl 0,9% τοποθετήθηκαν στο ψυγείο ως την ημέρα χρήσης τους. Πριν την χρησιμοποίησή τους, τα αραιωτικά αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

### 5.2.2 Προετοιμασία μικροοργανισμών

Τα πρότυπα στελέχη μικροοργανισμών τοποθετήθηκαν σε ειδικά σωληνάρια υγρής αποθήκευσης καλλιεργειών (stock culture broth, της εταιρίας Biorprepare), τα οποία περιείχαν 1ml θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptic Soy Broth) εμπλουτισμένο με 20% (v/v) γλυκερόλη και ύστερα φυλάσσονταν σε θερμοκρασίες κατάψυξης μέχρι την χρήση τους. Τα πρότυπα στελέχη αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, πριν χρησιμοποιηθούν.

Για την ανάπτυξη των πρότυπων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός τους από τα ειδικά σωληνάρια υγρής αποθήκευσης καλλιεργειών που είχαν παρασκευασθεί. Ύστερα τα εμβολιασμένα θρεπτικά υποστρώματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 – 48 ώρες.

Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα περιείχαν, πέραν των πεπτονών, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων που χρησιμοποιούνται για την προαγωγή των μικροοργανισμών και εκλεκτικούς παράγοντες αναστολής, όπως και χρωμογόνα υποστρώματα τα οποία διασπώνται από τα μικροβιακά ένζυμα και απελευθερώνουν αδιάλυτες έγχρωμες ενώσεις οι οποίες προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προαγωγή της ανάπτυξης των μικροβιακών στελεχών που μελετήθηκαν καθώς και ο χρωματισμός των αποικιών ανά στέλεχος και εκλεκτικό υπόστρωμα.



Πίνακας 1 Παρουσίαση πρότυπων στελεχών και εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την προαγωγή της ανάπτυξής τους. (ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ, 2022)

<b>Πρότυπα βακτηριακά στελέχη</b>	<b>Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα</b>	<b>Χρωματισμός αποικιών</b>
<i>Salmonella enterica</i> , ATCC 14028	CHROMagar SALMONELLA PLUS	Μοβ
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923	CHROMagar S. aureus	Καφέ
<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC 19115	CHROMagar LISTERIA	Πράσινες
	Listeria Agosti Ottavianni Agar	Πράσινες
<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212	CHROMagar ENTEROCOCCUS	Έντονη ροζ
	CHROMagar™ ORIENTATION	Γαλαζοπράσινες
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 2592	CHROMagar ECC	Γαλαζοπράσινες

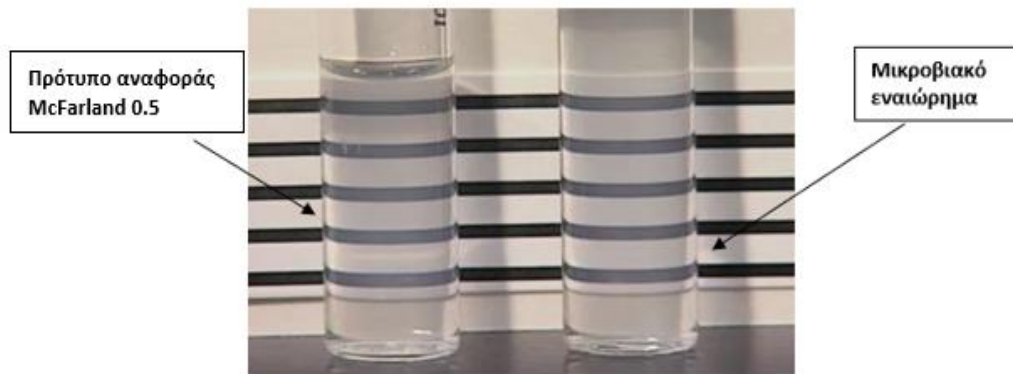
### 5.2.3 Παρασκευή διαλύματος μικροοργανισμών κλίμακας McFarland 0.5

Τα πρότυπα McFarland παρασκευάζονται με την ανάμειξη καθορισμένων ποσοτήτων χλωριούχου βαρίου και θειικού οξέος. Η ανάμειξη των δύο αυτών ενώσεων σχηματίζει ένα ίζημα θειικού βαρίου το οποίο αναλόγως την κλίμακα της θολερότητάς του λειτουργεί σαν πρότυπο αναφοράς για τον σχηματισμό συγκεκριμένης συγκέντρωσης πληθυσμού μικροβιακών κύτταρων (Lozano Guzmán Eduardo, 2018). Η κλίμακα McFarland 0.5 αποτελεί την πιο συχνώς χρησιμοποιούμενη κλίμακα για την ανίχνευση ανασταλτικής επίδρασης των αντιβιοτικών και αντιστοιχεί σε κατά προσέγγιση κυτταρική πυκνότητα  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml (E. Gayathiri., 2018).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αποφασίστηκε να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή δράση των μεταβολιτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε εναιώρημα βακτηριακών παθογόνων στελεχών κλίμακας McFarland 0.5.

Για κάθε μικροβιακό στέλεχος που εξετάστηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, μετά την ολοκλήρωση της επώασης του για 24 με 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C, παρασκευάστηκε μικροβιακό εναιώρημα κλίμακας McFarland 0.5. Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα McFarland 0.5, της εταιρίας Biomerieux, για την ρύθμιση της θολερότητας των μικροβιακών εναιωρημάτων. Τα αποστειρωμένα αραιωτικά διαλύματα 0,9% NaCl των 9ml, εμβολιαστήκαν με το αντίστοι-

χο μικροβιακό στέλεχος και ρυθμίστηκε η θολερότητα τους ώστε οπτικά να αντιστοιχεί με την θολερότητα του πρότυπου αναφοράς McFarland 0.5 (Βλέπε Εικόνα 15.).



Εικόνα 15. Απεικόνιση ρύθμισης θολερότητας μικροβιακού εναιωρήματος σε κλίμακα McFarland 0,5. (Tankeshwar, 2022)

## 5.2.4 Μεθοδολογία πειραματικού Μέρους Α

### 5.2.4.1 Παρασκευή απαιτούμενων συγκεντρώσεων χημικών ουσιών

Οι χημικές ενώσεις που μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των παθογόνων στελεχών, αποτελούν μεταβολικά προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και πήραν την ακόλουθη αρίθμηση:

- 4-Hydroxybenzoic acid
- DL-p-hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA)
- Phenyllactic acid (PLA)
- hydrocinnamic acid
- 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid
- Methylcinnamic acid
- Salicylic acid
- 1,2 dihydroxybenzene (catechol)
- Caffeic acid
- Vanillic acid
- Feruric acid

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα των 10ml συγκέντρωσης 300ppm από την κάθε χημική ουσία που αναφέρθηκε και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασίες ψυγείου μέχρι το επόμενο στάδιο των πειραμάτων.

Ύστερα, τα πειράματα για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών ξεκίνησαν από τις συγκεντρώσεις 50, 100 και 150 ppm από τα ομογενοποιημένα διαλύματα 300ppm που είχαν παρασκευασθεί. Αναλόγως των αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης που εμφάνιζαν στο κάθε παθογόνο βακτήριο τροποποιήθηκαν αντίστοιχα και οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών με σκοπό να βρεθεί η ελάχιστη συγκέντρωση μεταβολίτη που απαιτείται για την πλήρη θανάτωση του κάθε βακτηριακού στελέχους αρχικής συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml.

#### 5.2.4.2 Παρασκευή εναιωρήματος παθογόνων βακτηριακών στελεχών

Στο Μέρος Α του πειράματος παρασκευάστηκαν εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml σύμφωνα με την κλίμακα McFarland 0.5 από :

- *Salmonella enterica*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus faecalis*

#### 5.2.4.3 Μεθοδολογία

Σε ένα Eppendorf χωρητικότητας 600μl τοποθετήθηκαν 200μl χημικής ουσίας συγκέντρωσης 50 ppm (No1 που αντιστοιχεί στην χημική ουσία 4-Hydroxybenzoic acid) και 100μl παρασκευασμένου εναιωρήματος συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml από το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella enterica* ATCC# 14028. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για την χημική ουσία No1 στις συγκεντρώσεις 100ppm και 150ppm.

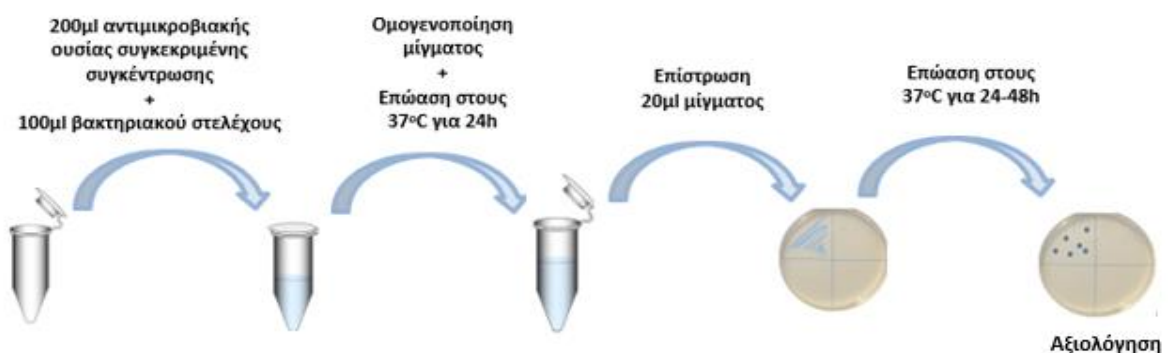
Παράλληλα, παρασκευάσθηκε και ένα δείγμα αναφοράς (control) σε ένα ακόμα Eppendorf, στο οποίο τοποθετήθηκαν 200 μl απεσταγμένο νερό και 100μl παρασκευασμένου εναιωρήματος συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml από το βακτηριακό στέλεχος *Sal-*

*monella enterica* ATCC# 14028.

Εφόσον τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν με την βοήθεια της συσκευής vortex, τα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 ώρες.

Μετά το πέρας των 24 ωρών τα Eppendorf αφαιρέθηκαν από τον επωαστικό κλίβανο και ομογενοποιήθηκαν ξανά με την βοήθεια της συσκευής vortex. Παράλληλα, το εκλεκτικό υπόστρωμα CHROMagar SALMONELLA PLUS είχε αφεθεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με την βοήθεια ενός ανεξίτηλου μαρκαδούρου χωρίστηκε η βάση του τρυβλίου σε 4 τεταρτημόρια. Στο 1<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20μl από το δείγμα αναφοράς, στο 2<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20μl από το μίγμα με συγκέντρωση 50ppm της χημικής ουσίας No1, στο 3<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20μl από το μίγμα συγκέντρωσης 100ppm της χημικής ουσίας No1 και στο 4<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20μl από το μίγμα συγκέντρωσης 150ppm της χημικής ουσίας No1. Το κάθε τεταρτημόριο είχε επισημανθεί αναλόγως με την συγκέντρωση του μίγματος το οποίο είχε επιστρωθεί σε αυτό.

Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα αφέθηκε ώστε να απορροφηθεί εντελώς το μίγμα που επιστρώθηκε στη επιφάνεια του και ύστερα τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 με 48 ώρες. Ο χρόνος επώασης του εμβολισμένου εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος καθορίστηκε από τον σχηματισμό ευανάγνωστων αποικιών στην επιφάνεια του τρυβλίου.



Εικόνα 16. Απεικόνιση βημάτων για την αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης μεταβολιτών πειραματικού μέρους Α.

Αναλόγως των αποτελεσμάτων που λαμβάνονταν, ρυθμιζόταν αντίστοιχα και η συγκέντρωση της χημικής ουσίας ως την επίτευξη της πλήρους θανάτωσης του βακτηριακού στελέχους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα βακτηριακά στελέχη *Staphy-*

*lococcus aureus* ATCC# 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC# 19115, και *Enterococcus faecalis* ATCC# 29212 καθώς και για τις υπόλοιπες χημικές ουσίες που αναφέρονται στην ενότητα 5.2.4.1.

## 5.2.5 Μεθοδολογία Πειράματος Μέρους Β

### 5.2.5.1 Προαγωγή παρασκευασμάτων οξυγαλακτικών βακτηρίων

Χρησιμοποιήθηκαν δισκία ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων:

- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnoses*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifibacterium lactis*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifibacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*

Για την ανάκτηση των υπάρχοντων οξυγαλακτικών βακτηρίων, το έτοιμο δισκίο οξυγαλακτικών βακτηρίων κονιορτοποιήθηκε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου γουδιού και γουδοχειριού. Ύστερα, το κονιορτοποιημένο δισκίο τοποθετήθηκε σε έτοιμο εκλεκτικό υγρό υπόστρωμα MRS για την προαγωγή των υπαρχόντων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το μίγμα ύστερα από την ομογενοποίηση του τοποθετήθηκε για επώαση σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C.

Σε χρονικά διαστήματα μία ώρα, δύο ωρών, τριών ωρών, 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημέρων από την αρχική επώαση, λαμβανόταν επαρκές δείγμα σε φιαλίδια Eppendorf και τοποθετούταν στο ψυγείο.

### 5.2.5.2 Απομόνωση μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Ύστερα από την συλλογή των απαραίτητων δειγμάτων, τα δείγματα απομακρύνονταν από το ψυγείο και αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά.

Πραγματοποιούταν ομογενοποίηση των δειγμάτων με την βοήθεια της συσκευής vortex και ύστερα τα δείγματα τοποθετούνταν στην φυγόκεντρο.

Σκοπός αυτού του σταδίου ήταν η καθίζηση των κυττάρων των οξυγαλακτικών

βακτηρίων και η συλλογή των παραγμένων μεταβολιτών, που ύστερα από το στάδιο φυγοκέντρησης βρίσκονταν στο υπερκείμενο του διαχωρισμένου πια μίγματος.

#### 5.2.5.3 Παρασκευή εναιωρήματος παθογόνων βακτηριακών στελεχών

Στο Μέρος Β του πειράματος παρασκευάστηκαν εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml σύμφωνα με την κλίμακα McFarland 0.5 από:

- *Salmonella enterica*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus faecalis*
- *Escherichia coli*

#### 5.2.5.4 Μεθοδολογία

Σε ένα Eppendorf χωρητικότητας 600ml τοποθετήθηκαν 200 ml από το απομονωμένο μίγμα μεταβολιτών της ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων και 100ml παρασκευασμένου εναιωρήματος συγκέντρωσης  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml από το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella enterica* ATCC# 14028. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα βακτηριακά στελέχη που αναφέρθηκαν στην ενότητα 5.2.5.3 καθώς και για τους μεταβολίτες των 2 διαφορετικών παρασκευασμάτων που είχαν συλλεχθεί σε χρονικά διαστήματα μία ώρα, δύο ωρών, τριών ωρών, 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημέρων από την αρχική τους επώαση.

Εφόσον τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν με την βοήθεια της συσκευής vortex, τα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 ώρες.

Μετά το πέρας των 24 ωρών τα Eppendorf αφαιρέθηκαν από τον επωαστικό κλίβανο και ομογενοποιήθηκαν ξανά με την βοήθεια της συσκευής vortex. Παράλληλα, το εκλεκτικό υπόστρωμα που αντιστοιχεί για την προαγωγή της ανάπτυξης του αντίστοιχου βακτηριακού στελέχους που χρησιμοποιήθηκε είχε αφεθεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με την βοήθεια ενός ανεξίτηλου μαρκαδόρου χωρίστηκε η βάση του τρυβλίου σε 4 τεταρτημόρια. Στο 1<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20ml από το δείγμα αναφοράς, στο 2<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20ml από το μίγμα με μεταβολίτες 24 ωρών, στο 3<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20ml από το μίγμα μεταβολιτών 10 ημερών

και στο 4<sup>ο</sup> τεταρτημόριο επιστρώθηκαν 20μl από το μίγμα μεταβολιτών 20 ημερών. Το κάθε τεταρτημόριο είχε επισημανθεί αναλόγως με τον χρόνο επώασης των παρασκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και είχαν επιστρωθεί σε αυτό.

Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα αφέθηκε ώστε να απορροφηθεί εντελώς το μίγμα που επιστρώθηκε στη επιφάνεια του και ύστερα τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 με 48 ώρες. Ο χρόνος επώασης του εμβολισμένου εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος καθορίστηκε από τον σχηματισμό ευανάγνωστων αποικιών στην επιφάνεια του τρυβλίου.

## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

### 6.1 Αποτελέσματα Πειράματος Μέρους Α

Στην παρούσα ενότητα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των 11 μεταβολικών προϊόντων που μελετήθηκαν έναντι των παθογόνων βακτηριακών στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*. Σκοπός των πειραματικών μετρήσεων ήταν η εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης της υπό εξέταση αντιμικροβιακής ουσίας η οποία θα επιφέρει την πλήρη θανάτωση των παθογόνων μικροβιακών στελεχών.

#### 6.1.1 4-Hydroxybenzoic acid

Στον Πίνακα 2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

Πίνακας 2. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

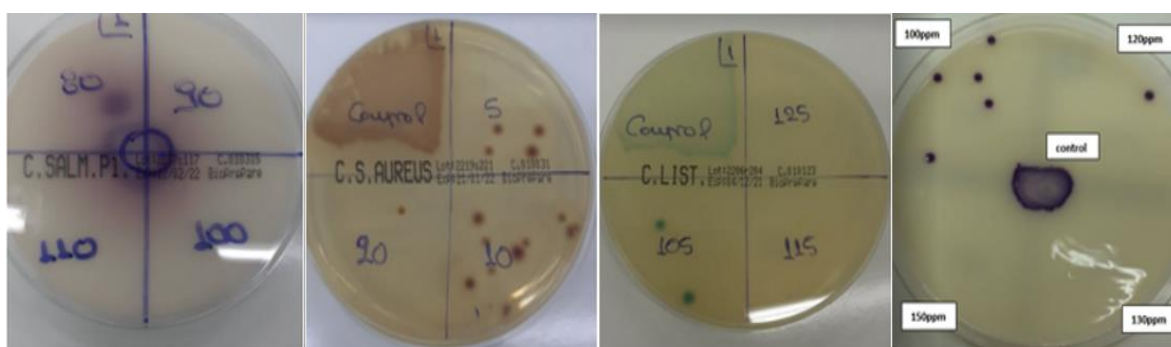
Ουσία:	4-Hydroxybenzoic acid												
	ppm	Μικροοργανισμοί											
		<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	160									0	0		
	150	0	0		0	0		0	0		0	0	
	140									0	0		
	130						0	0		0			
	125				0	0		0	0				
	120									4/1	380	2.58	
	115						0	0					
	110	0	0										
	105							5/1/2	400	2.6			
	100	0	0		0	0		52	7800	3.89	10/12/5	1350	3.13
	90	0	0										
	80	1	150	2.18							34	5100	3.71
	75				0	0		95	14250	4.15			
	70	24	3600	3.56									
	60	42	6300	3.8							48	7200	3.86
	50	109	16350	4.21	0	0					TNTC		
	30				0	0							
20				1	150	2.18							
10				11	1650	3.22							
5				50	7500	3.88							
0			8.17			8.17			8.17			8.17	



Με βάση τα παραπάνω πειράματα που διεξάχθηκαν, βρέθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid που απαιτείται για την πλήρη θανάτωση των βακτηριακών στελεχών.

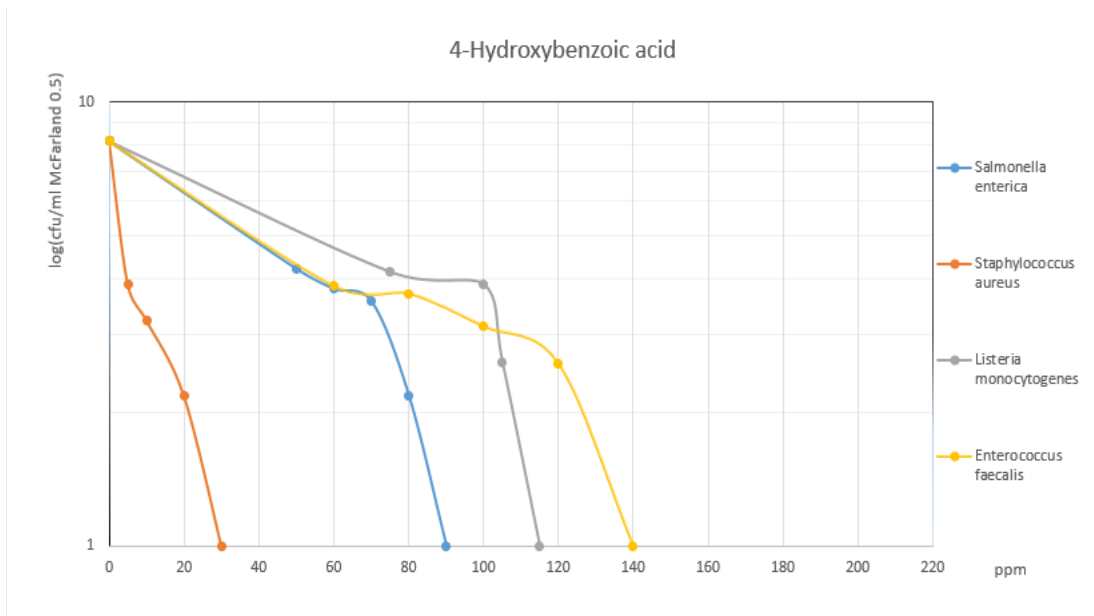
Το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία 4-Hydroxybenzoic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 30ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Αντίθετα, η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσιάστηκε από το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου για την πλήρη αναστολή του απαιτήθηκαν 130ppm της αντιμικροβιακής ουσίας. Την δεύτερη σε σειρά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα την παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* με 115ppm της ουσίας να απαιτούνται για την πλήρη αναστολή του και το τρίτο στην σειρά την παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* με πλήρη αναστολή στα 90ppm.

Στην Εικόνα 17. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος ξεχωριστά όσον αφορά την ουσία 4-Hydroxybenzoic acid.



Εικόνα 17. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Με βάση τα πειράματα που διεξάχθηκαν, μελετήθηκε και η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου ελέγχου απεικονίζονται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 4-Hydroxybenzoic acid.

### 6.1.2 DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA)

Στον Πίνακα 3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας 4 DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

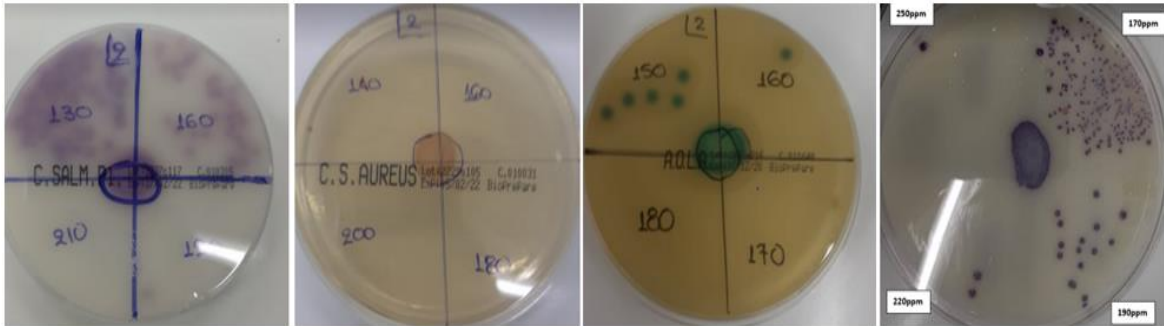
Πίνακας 3. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA)											
Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	ppm	Μικροοργανισμοί											
		<i>Salmonella enterica</i>			<i>S. aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
250										1	150	2.18	
220										2	300	2.48	
210	0	0											
200				0	0								
190	1	150	2.18	0	0					15	2250	3.35	
180				0	0		0	0		55	8250	3.92	
170				0	0		0	0		110	16500	4.22	
160	26	3900	3.59	0,0	0		1	150	2.18	143	21450	4.33	
150				1	150	2.18	6	900	2.95				
140	52	7800	3.89	2,2,6	500	2.70							
130	64	9600	3.98				18	2700	3.43				
120				9	1350	3.13							
110	111	16650	4.22										
100	TNTC			43,7,18	3400	3.53							
75	TNTC			TNTC									
50	TNTC			TNTC									
0			8.17			8.17			8.17			8.17	

Με βάση τα παραπάνω πειράματα που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 160ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 170ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 210ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 250ppm δεν παρου-

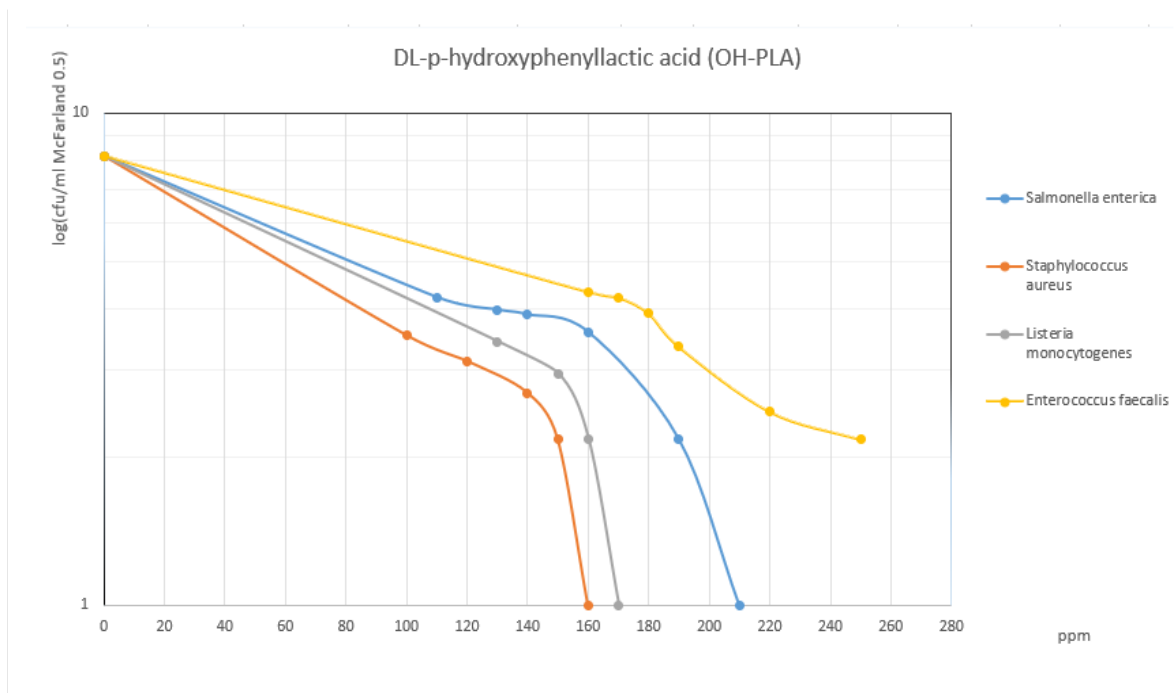
σίασε πλήρη αναστολή αλλά μειώθηκε κατά 6 λογαριθμικούς κύκλους από την αρχική συγκέντρωση του.

Στην Εικόνα 18. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος ξεχωριστά, όσον αφορά την ουσία DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA).



Εικόνα 18. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA) παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 2.



Γράφημα 2. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας DL-p-hydroxyphenyl lactic acid (OH-PLA).

### 6.1.3 Phenyllactic acid (PLA)

Στον Πίνακα 4. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας Phenyllactic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

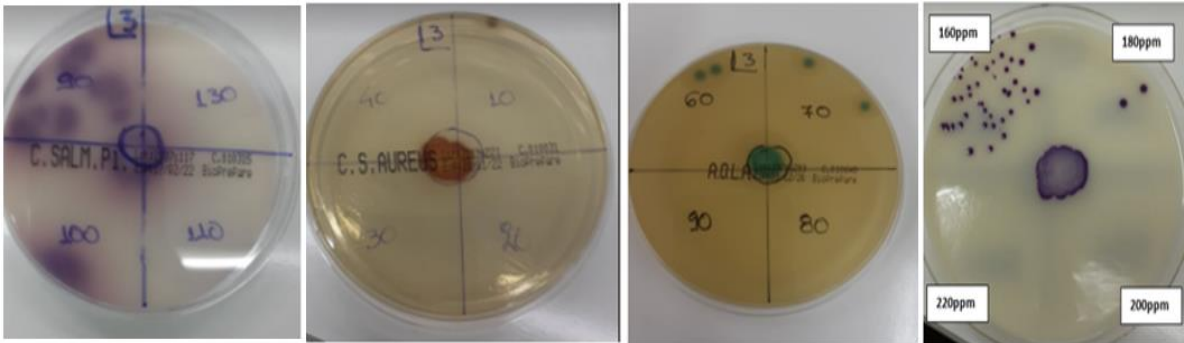
Πίνακας 4. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας Phenyllactic acid (PLA) έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		phenyllactic acid (PLA)											
Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	R.P.E	Μικροοργανισμοί											
		<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
220										0	0		
200	0	0								0	0		
180										2	300	2.48	
170	0	0								3	450	2.65	
160										37	5550	3.74	
150	0	0		0	0		0	0		44	6600	3.82	
140	0	0											
130	0/0	0											
125				0	0		0	0					
115	0	0											
110	0	0		0	0		0	0		TNTC			
100	1	150	2.18										
95							0	0					
90	11	1650	3.22										
85							0	0					
80	44	6600	3.82	0	0		0	0					
70				0	0		2	300	2.48				
60				0	0		3	450	2.65				
50				0	0		53	7950	3.90	TNTC			
40				0	0								
20				0	0								
10				1	150	2.18							
0			8.17			8.17			8.17			8.17	

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία Phenyllactic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 20ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 80ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη

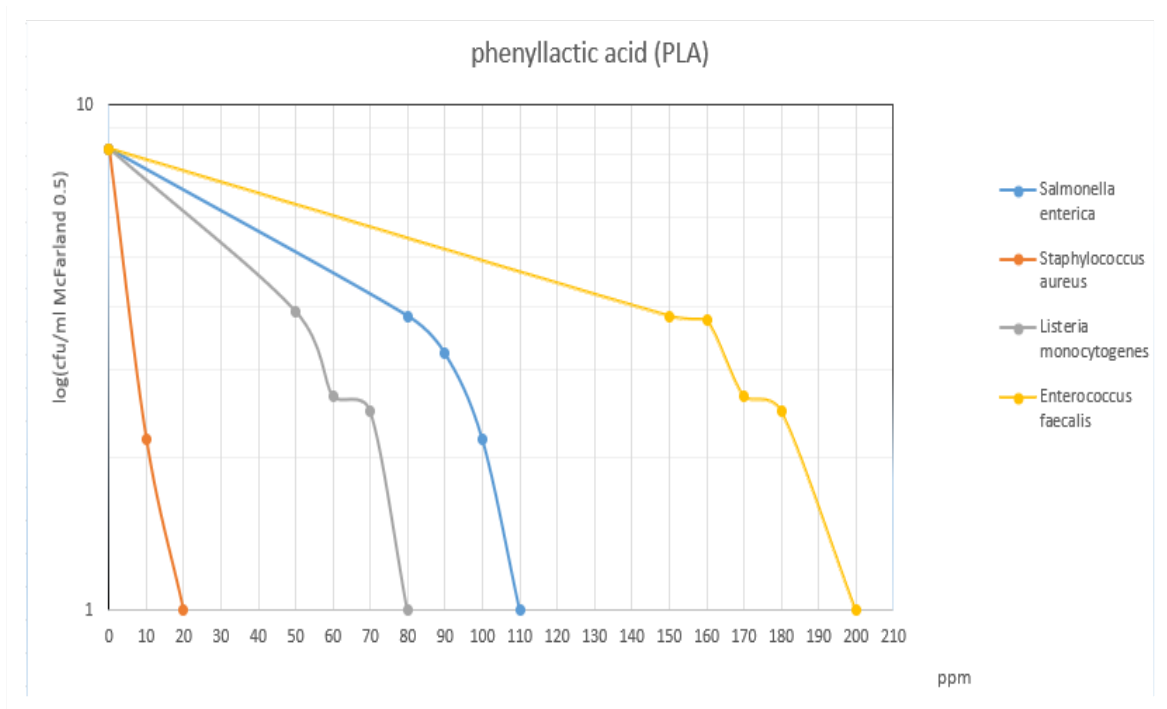
αναστολή στα 110ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 200ppm παρουσίασε πλήρη αναστολή.

Στην Εικόνα 19. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος ξεχωριστά, όσον αφορά την ουσία Phenyllactic acid.



Εικόνα 19. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας Phenyllactic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας Phenyllactic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στην Γράφημα 3.



Γράφημα 3. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας Phenyllactic acid.

#### 6.1.4 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid

Στον Πίνακα 5. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

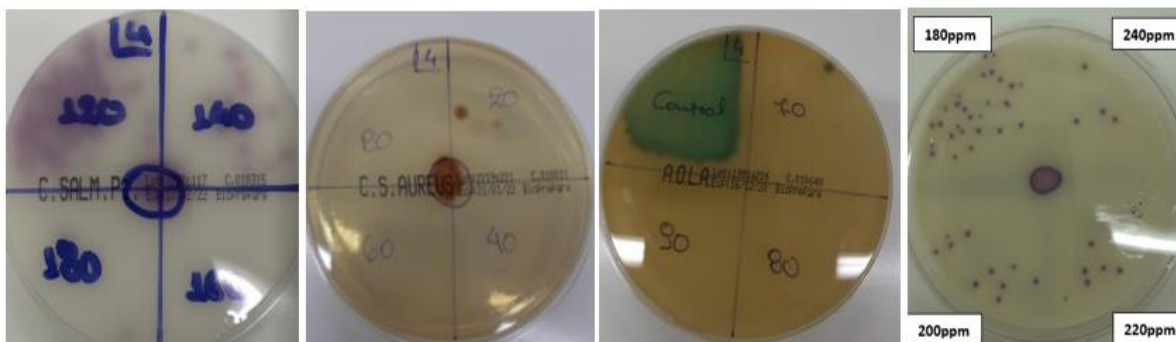
Πίνακας 5. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid											
ppm	ppm	Μικροοργανισμοί											
		<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	240										4	600	2.78
	220										6	900	2.95
	200	0	0								9	1350	3.13
	190										18	2700	3.43
	180	0	0								23	3450	3.54
	170										24	3600	3.56
	160	2	300	2.48	0	0							
	155	1	150	2.18									
	150	4	600	2.78	0	0		0	0		32	4800	3.68
	145	6	900	2.95									
	140	19/17	2700	3.43									
	130							0	0		48/42	6750	3.83
	125				0	0							
	120	76	11400	4.06				0	0				
	110							0	0				
	100	94	14100	4.15	0	0		0	0		146	21900	4.34
	90							0	0				
	80							0	0				
	75				0	0		5	750	2.88	184	27600	4.44
	70							11	1500	3.18			
50										TNTC			
40				0	0								
20				1	150	2.18							
0			8.17			8.17			8.17			8.17	

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 40ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 80ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 180ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα πα-

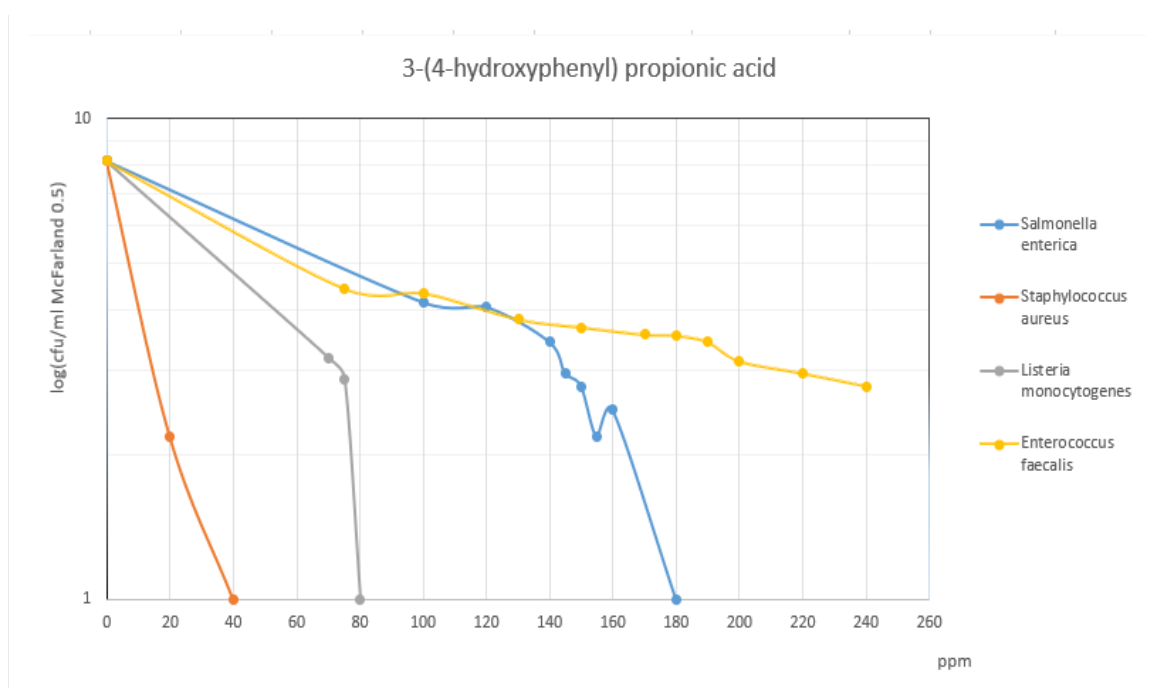
ρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 240ppm δεν παρουσίασε πλήρη αναστολή αλλά μειώθηκε κατά 5 λογαριθμικούς κύκλους από την αρχική συγκέντρωση του.

Στην Εικόνα 20. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 20. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 4.



Γράφημα 4. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid.



### 6.1.5 Hydrocinamic acid

Στον Πίνακα 6. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας hydrocinamic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

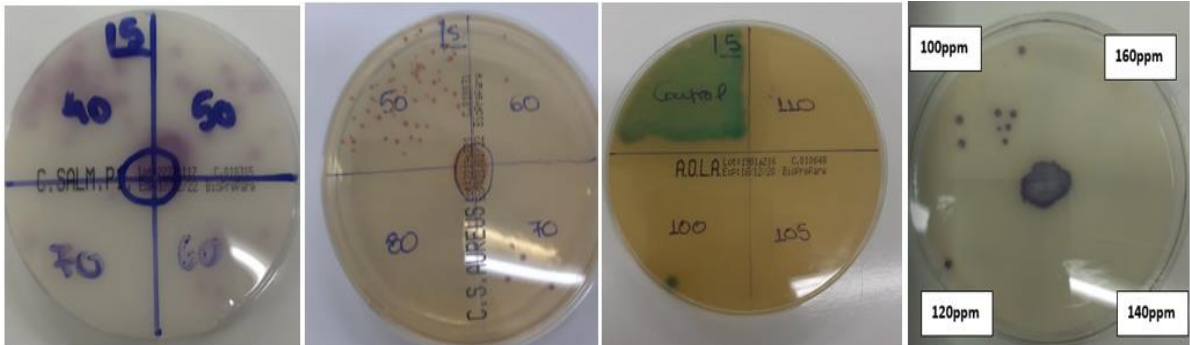
Πίνακας 6. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας hydrocinamic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		hydrocinamic acid											
ppm	ppm	Μικροοργανισμοί											
		<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
		200	0	0								0	0
180													
160										0	0		
150	0	0											
140										0	0		
130													
120										1	150	2.18	
110	0	0					0	0					
105							0	0					
100	0	0		0			1/5	450	2.65	8	1200	3.08	
90	0	0											
80				0			26	3900	3.59				
70	0/3	230	2.36	0/3	230	2.36							
60	4/1	380	2.58	4/2	450	2.65	69	10350	4.01				
50	18/2/12	1600	3.20	5/20	1880	3.27				TNTC			
40	14/41	4130	3.62	31	4650	3.67	145	21750	4.34				
30	TNTC			33	4950	3.69							
25				85	12750	4.11							
15				TNTC									
5				TNTC									
0			8.17			8.17			8.17			8.17	

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία hydrocinamic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 80ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* υπέστη πλήρη αναστολή στα 90ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 105ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτη-

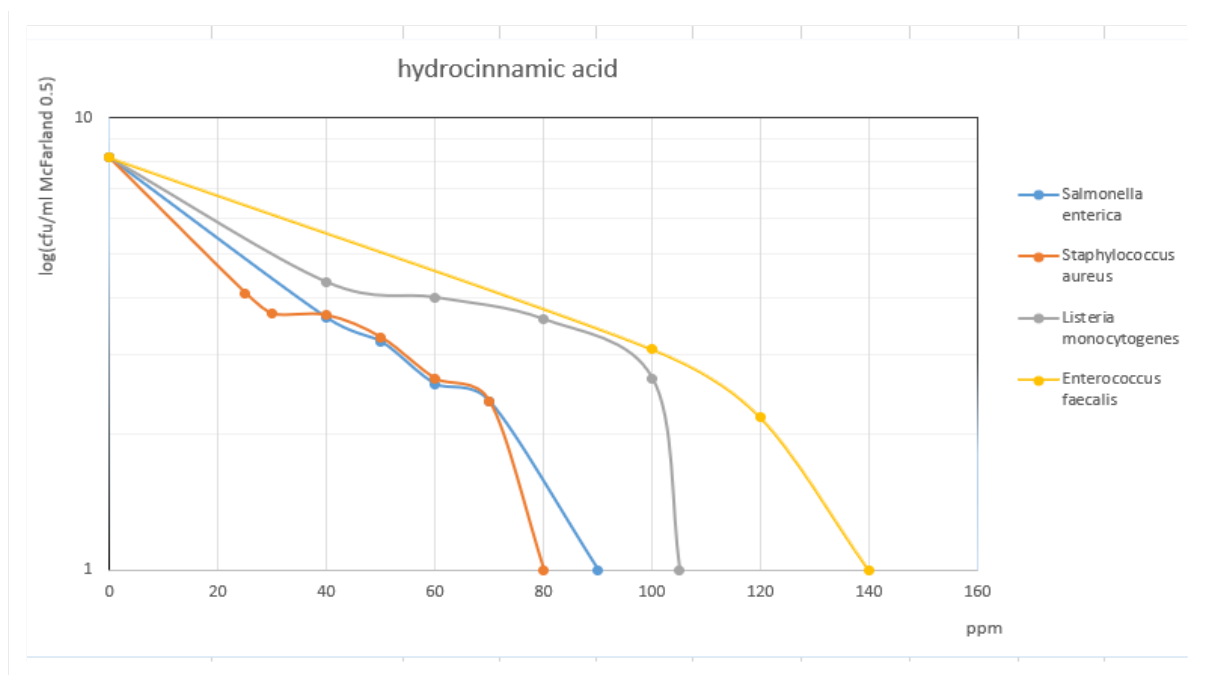
ριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 140ppm υπέστη πλήρη αναστολή.

Στην Εικόνα 21. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 21. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας hydrocinnamic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας hydrocinnamic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 5.



Γράφημα 5. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας hydrocinnamic acid.

### 6.1.6 Methylcinnamic acid

Στον Πίνακα 7. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας methylcinnamic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

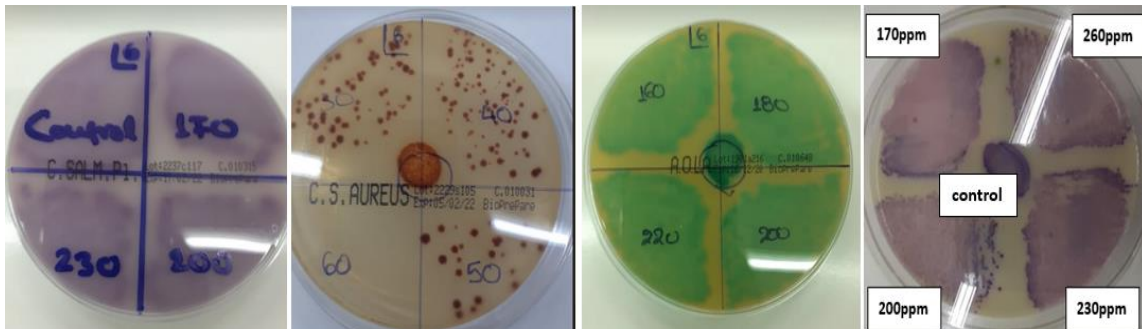
Πίνακας 7. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας methylcinnamic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		methylcinnamic acid				
Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	ppm	Μικροοργανισμοί				
		<i>Salmonella enterica</i>	<i>S.aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
		cfu/plate	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate
260						TNTC
230	TNTC					TNTC
220						TNTC
210	TNTC					
200	TNTC					TNTC
190	TNTC					TNTC
180	TNTC					TNTC
170	TNTC					TNTC
160						TNTC
150	TNTC	0	0			TNTC
140						
130						
125		0	0			TNTC
110						
100		0	0			TNTC
80		0	0			
75						TNTC
60		0	0			
50		24	3600	3.56		
40		32	4800	3.68		
30		54	8100	3.91		
20		87	13050	4.12		
0				8.17		

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία methylcinnamic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 50ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη δεν υπέστησαν κάποια εμφανή μικροβιολογική αναστολή σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 220ppm.

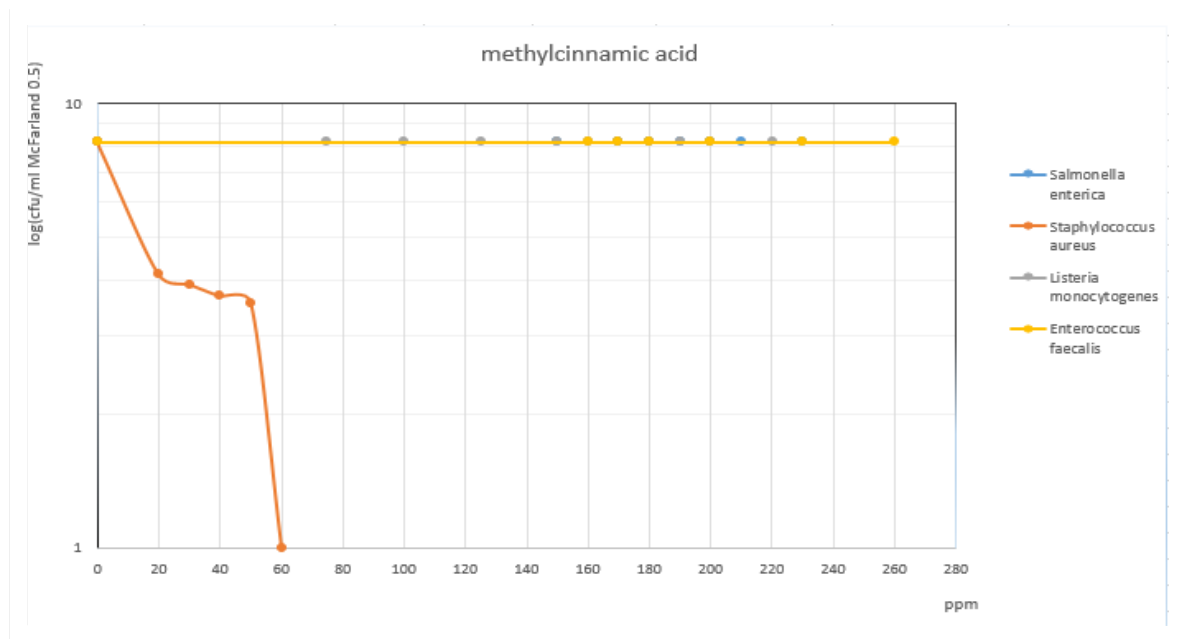
Στην Εικόνα 22. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βα-

κτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 22. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας methylcinnamic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας methylcinnamic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 6.



Γράφημα 6. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας methylcinnamic acid.

### 6.1.7 Salicylic acid

Στον Πίνακα 8. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας salicylic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

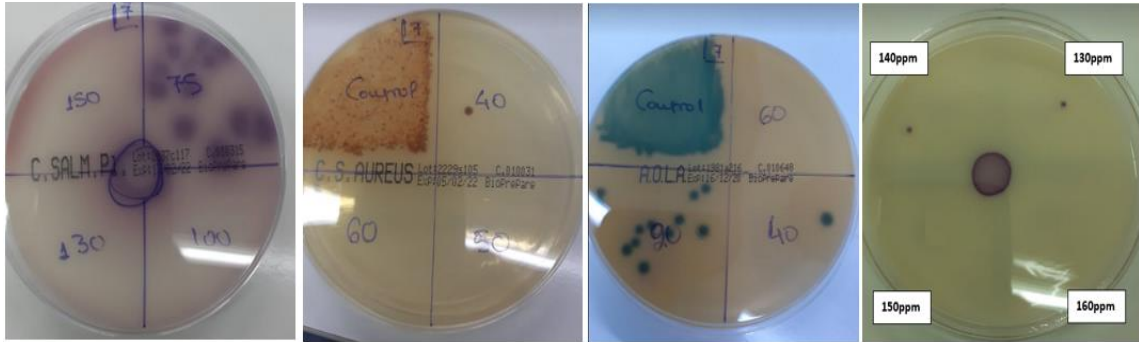
Πίνακας 8. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας salicylic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		salicylic acid										
ΡΡΗΜ	Μικροοργανισμοί											
	<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
200	0	0										
180									0	0		
170	0	0							0	0		
160									0	0		
150	0	0		0	0		0	0	0	0		
140	0	0							1/1	150	2.18	
130	0	0							1	150	2.18	
120				0	0		0	0	4	600	2.78	
110									10	1500	3.18	
100	0	0		0	0		0	0	13	1950	3.29	
80									24	3600	3.56	
75	17	2550	3.41	0	0		0	0				
60				0	0		0	0				
50				0	0							
40				1	150	2.18	1	150	2.18			
35				1	150	2.18						
30							3	450	2.65			
25				94	14100	4.15						
20							10	1500	3.18			
15				187	28050	4.45						
5				TNTC								
0			8.17			8.17			8.17			8.17

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία salicylic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 50ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 60ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 100ppm. Τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος

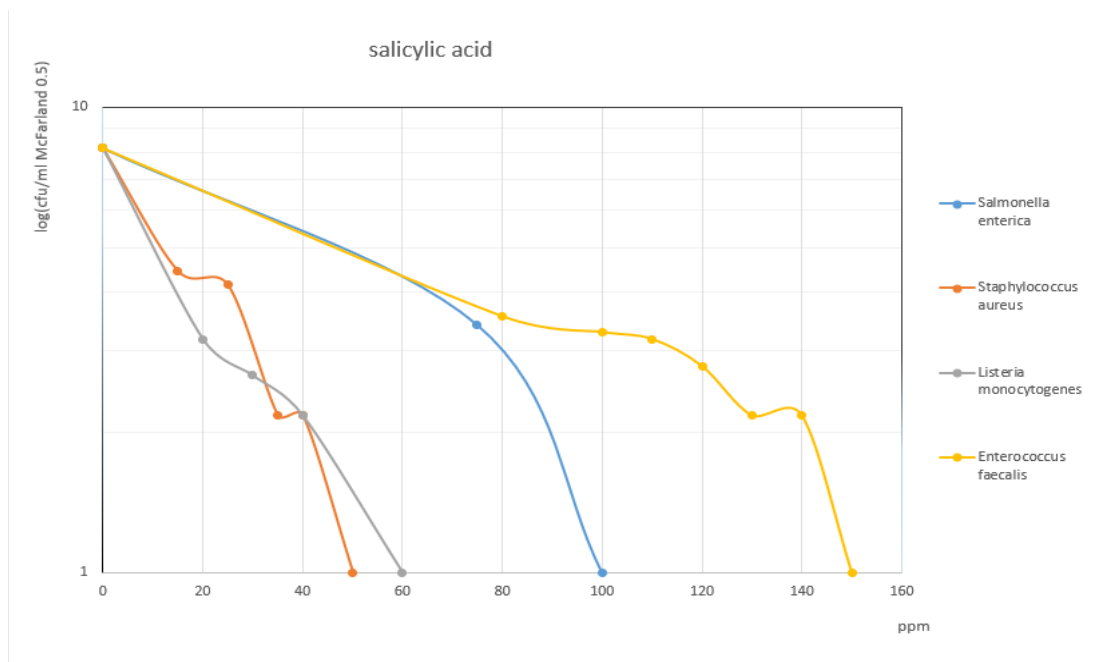
*Enterococcus faecalis*, όπου στα 150ppm υπέστη πλήρη αναστολή.

Στην Εικόνα 23. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 23. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας salicylic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Τέλος, η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας salicylic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 7.



Γράφημα 7. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας salicylic acid.

### 6.1.8 1,2 dihydroxybenzene (catechol)

Στον Πίνακα 9. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

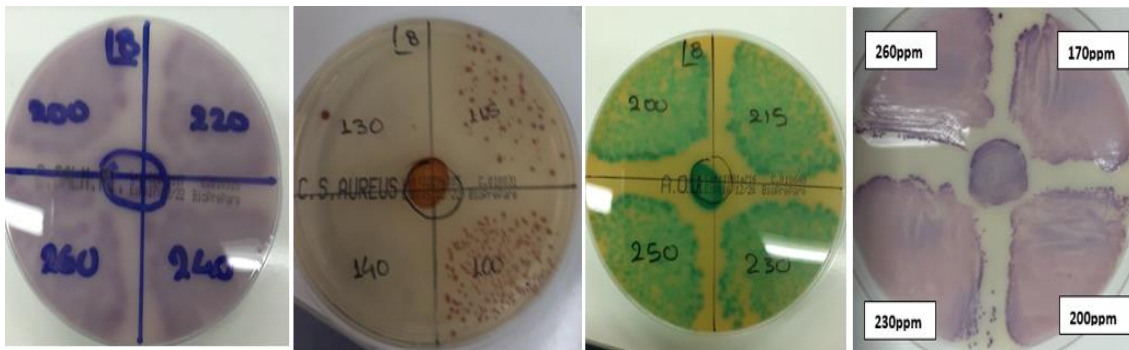
Πίνακας 9. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		1,2 dihydroxybenzene (catechol)								
PPM	Συγκεντρώσεις προτύπου σε (ppm)	Μικροοργανισμοί								
		<i>Salmonella enterica</i>				<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
		cfu/plate	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/plate
		10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>							
260		TNTC							TNTC	
250		TNTC	3	450	2.65				TNTC	
240		TNTC								
230		TNTC	7	1050	3.02				TNTC	
220		TNTC								
210		TNTC	35	5250	3.72				TNTC	
200		TNTC	TNTC						TNTC	
190									TNTC	
180									TNTC	
170									TNTC	
160									TNTC	
150		TNTC	TNTC			0	0		TNTC	
140						0	0			
130						2	300	2.48		
125						31	4650	4	TNTC	
115						74	11100	4.05		
110										
100		TNTC	TNTC			207	31050	4.49	TNTC	
75									TNTC	
50						TNTC			TNTC	
0					6.18			8.17		

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία 1,2 dihydroxybenzene (catechol) την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 140ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη δεν υπέστησαν κάποια εμφανή μικροβιολογική αναστολή σε συγκεντρώσει της τάξεως των 250ppm. Παράλληλα, το

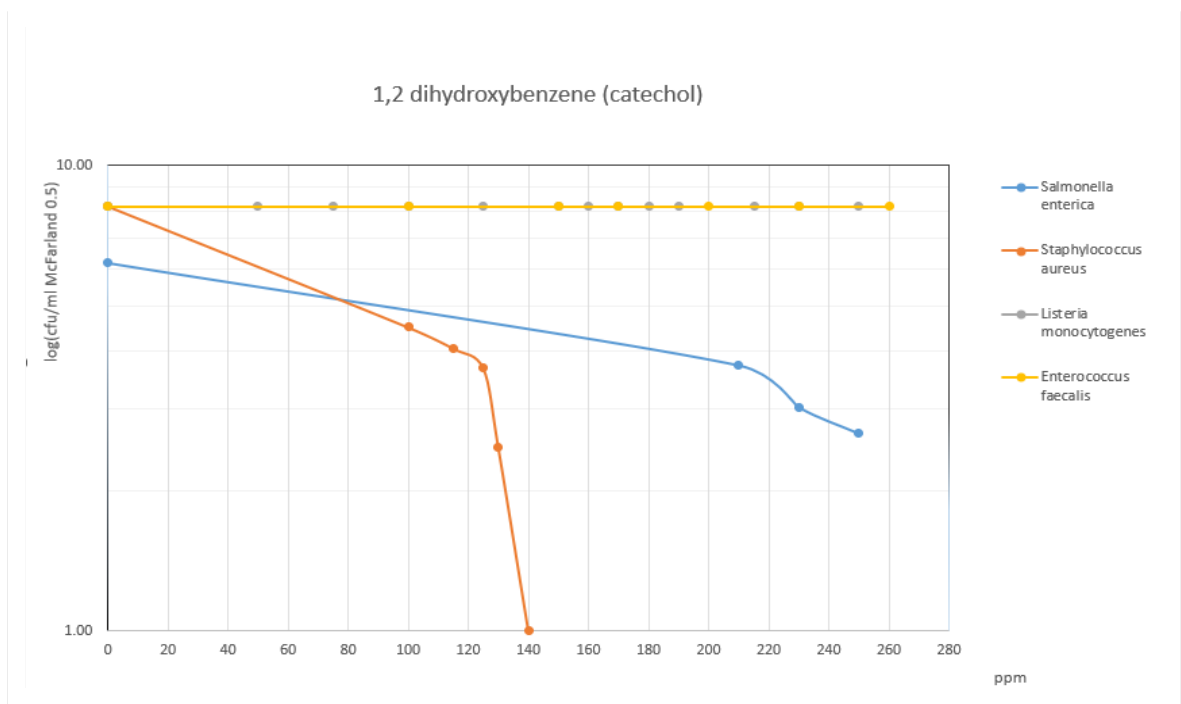
βακτηριακό στέλεχος *Salmonella enterica* εξετάσθηκε ως προς την πιθανή αναστολή του από αρχική συγκέντρωση  $10^6$ cfu/ml, το οποίο δεν παρουσίασε πλήρη αναστολή έναντι της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) στα 250ppm αλλά μειώθηκε κατά 3 λογαριθμικούς κύκλους από την αρχική συγκέντρωσή του.

Στην Εικόνα 24. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 24. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Τέλος, η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol) παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 8.



Γράφημα 8. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας 1,2 dihydroxybenzene (catechol).



### 6.1.9 Caffeic acid

Στον Πίνακα 10. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας caffeic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

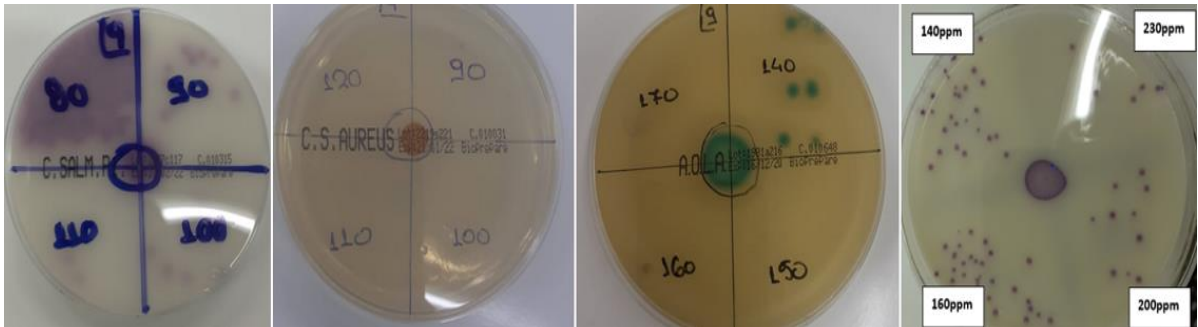
Πίνακας 10. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας caffeic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:	caffeic acid											
ppm	Μικροοργανισμοί											
	<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
230										4	600	2.78
200										10	1500	3.18
180										21	3150	3.50
160				0	0		0	0		28/24	3900	3.59
150				0	0		0	0				
140				0	0		7	1050	3.02	39	5850	3.77
130	0	0										
125				0	0		17	2550	3.41	42	6300	3.80
120										55	8250	3.92
110	0/0/3	150	2.18									
105				0	0							
100	4/6/0	500	2.70	0	0		23	3450	3.54	72	10800	4.03
95				0	0							
90	28/13	6150	3.79	1	150	2.18						
80	273	40950	4.61	6	900	2.95						
75							51	7650	3.88	94	14100	4.15
70				34	5100	3.71						
65				27	4050	3.61						
60				3/37	3000	3.48						
50				22/11/19/42	3525	3.55				TNTC		
40				45/46	6825	3.83						
30				69	10350	4.01						
20				194	29100	4.46						
0			8.17			8.17			8.17			8.17

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία caffeic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 95ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* υπέστη πλήρη αναστολή στα 130ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 150ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 230ppm δεν παρουσίασε πλήρη αναστολή αλ-

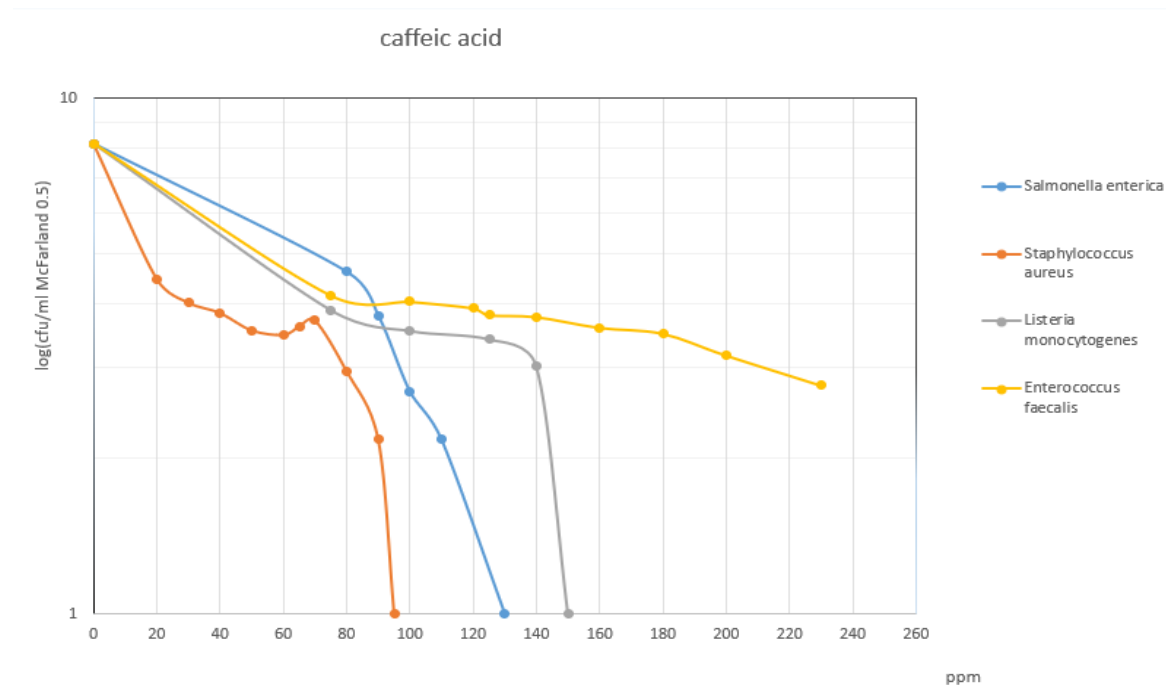
λά μειώθηκε κατά 5 λογαριθμικούς κύκλους από την αρχική συγκέντρωση του.

Στην Εικόνα 25. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 25. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας *caffeic acid* έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Τέλος, η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας *caffeic acid* παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 9.



Γράφημα 9. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας *caffeic acid*.

### 6.1.10 Vanillic acid

Στον Πίνακα 11. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας vanillic acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

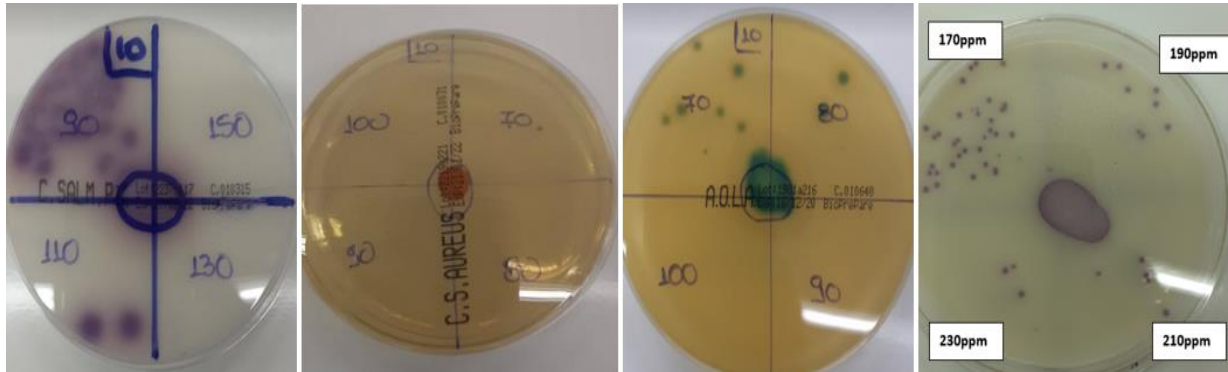
Πίνακας 11. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας vanillic acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		vanillic acid										
ΡΡΡΕ	Μικροοργανισμοί											
	<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
230										4	600	2.78
210										5	750	2.88
190										8	1200	3.08
170										30	4500	3.65
150	0	0										
140										10	1500	3.18
130	0	0										
125										37	5550	3.74
120							0	0		67	10050	4.00
110	2	300	2.48				0	0				
100				0	0		0	0		77	11550	4.06
95	48	7200	3.86									
90	74	11100	4.05	0	0		0	0				
85												
80	115	17250	4.24	0	0		3	450	2.65			
75										94	14100	4.15
70	TNTC			0/1	80	1.90	7	1050	3.02			
60				0/14	1050	3.02	25	3750	3.57			
50	TNTC			18/54	5400	3.73				TNTC		
40				56/86	10650	4.03	33	4950	3.69			
30				>300								
0			8.17			8.17			8.17			8.17

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία vanillic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 80ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 90ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 130ppm. Αντίθετα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis*, όπου στα 230ppm δεν παρουσίασε πλήρη αναστολή αλ-

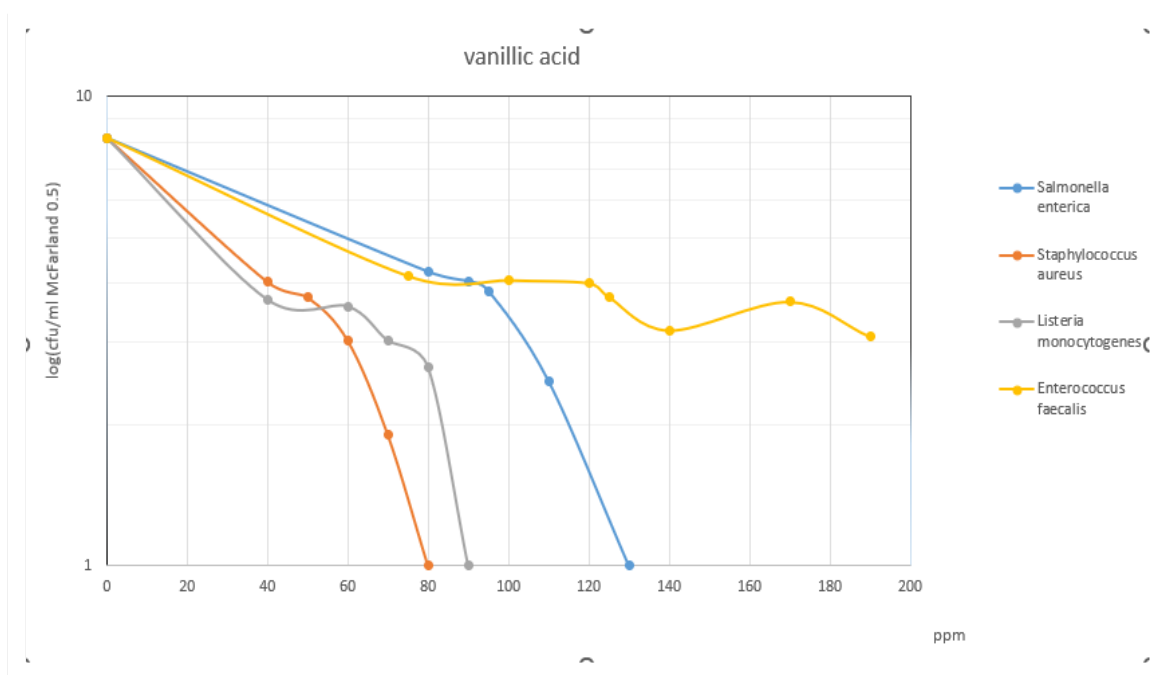
λά μειώθηκε κατά 5 λογαριθμικούς κύκλους από την αρχική συγκέντρωση του.

Στην Εικόνα 26. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 26. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας vanillic acid έναντι *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Τέλος, η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας vanillic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 10.



Γράφημα 10. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας vanillic acid.

### 6.1.11 Feruric acid

Στον Πίνακα 12. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πειραματικές δοκιμές της ουσίας Feruric acid έναντι των προαναφερόμενων παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

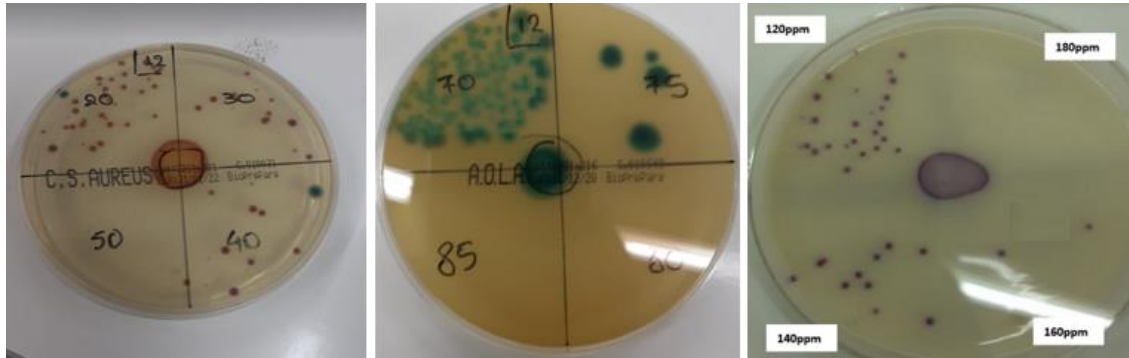
Πίνακας 12. Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας feruric acid έναντι των παθογόνων στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Ουσία:		Feruric acid										
ppm	Μικροοργανισμοί											
	<i>Salmonella enterica</i>			<i>S.aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log (cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)	cfu/plate	cfu/ml McFarland 0.5	log(cfu/ml McFarland 0.5)
180	0	0								0	0	
170	0	0										
165	2	300	2.48									
160	17/5	1650	3.22							2	300	2.48
155	12	1800	3.26									
150	40	6000	3.78	0	0		0	0				
140										10	1500	3.18
125				0	0		0	0				
120										31/22	3980	3.60
110	53	7950	3.90									
100	57	8550	3.93	0	0		0	0		51	7650	3.88
90	91	13650	4.14									
85							0	0				
80							0	0				
75				0	0		0/4/4	400	2.60			
70	131	19650	4.29				85	12750	4.11	72	10800	4.03
60							111	16650	4.22			
50				0	0		270	40500	4.61	93	13950	4.14
40				9	1350	3.13	TNTC					
30				13	1950	3.29						
20				33	4950	3.69						
0			8.17			8.17			8.17			8.17

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος με την μικρότερη ανθεκτικότητα στην ουσία vanillic acid την παρουσίασε ο *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση 40ppm υπέστη πλήρη αναστολή. Το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes* υπέστη πλήρη αναστολή στα 80ppm της ουσίας ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* παρουσίασε πλήρη αναστολή στα 170ppm. Τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος

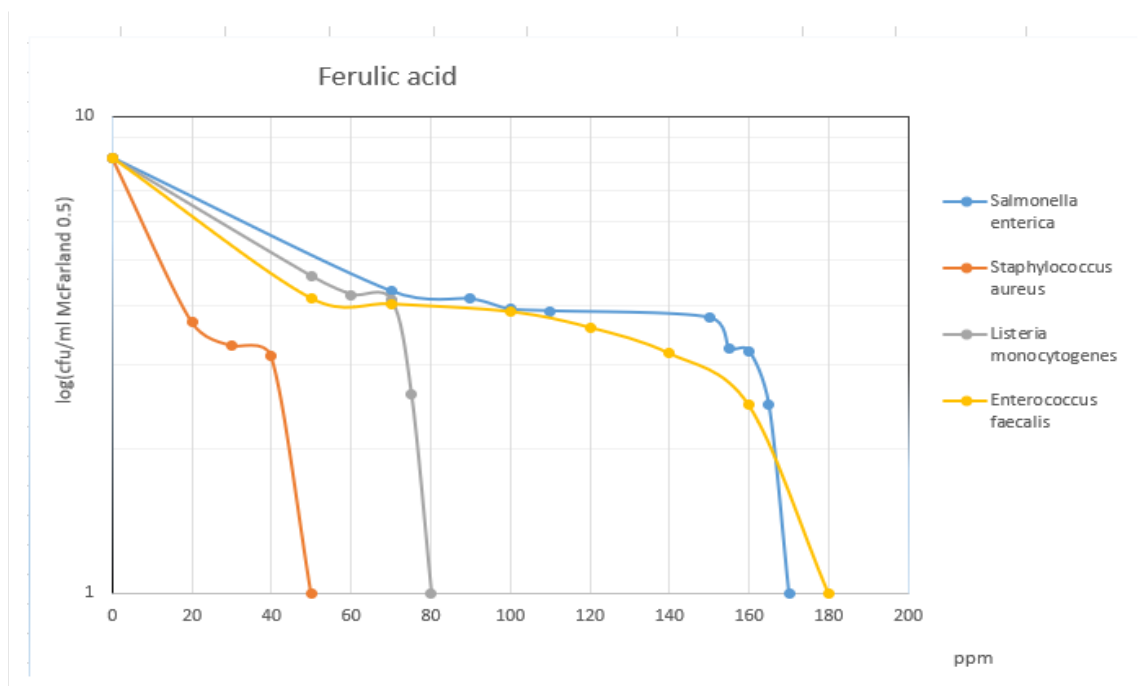
*Enterococcus faecalis*, όπου στα 180ppm παρουσίασε πλήρη αναστολή.

Στην Εικόνα 27. απεικονίζονται τα in vitro αποτελέσματα των τελικών μετρήσεων που οδήγησαν στην εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης συγκέντρωσης για το κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 27. Απεικόνιση τελικών αποτελεσμάτων αντιμικροβιακής δράσης της ουσίας ferulic acid έναντι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis*.

Τέλος, η λογαριθμική μείωση του κάθε στελέχους σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας Ferulic acid παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 11.



Γράφημα 11. Απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης κάθε βακτηριακού στελέχους που μελετήθηκε σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ουσίας ferulic acid.

## 6.2 Αποτελέσματα Πειράματος Μέρους Β

Στην παρούσα ενότητα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των 2 σκευασμάτων ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι των παθογόνων βακτηριακών στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* και *Escherichia coli*. Σκοπός των πειραματικών μετρήσεων ήταν η εύρεση πιθανής αντιμικροβιακής δράσης των παραγόμενων μεταβολιτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και ο απαιτούμενος χρόνος επώασης αυτών για την παραγωγή ποσότητας μεταβολιτών ικανής να μειώσουν την αρχική βακτηριακή συγκέντρωση που τοποθετήθηκε.

### 6.2.1 Σκεύασμα BioGaia ProTectis Family

Το σκεύασμα BioGaia ProTectis Family περιέχει κάψουλες με το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus reuteri*. Ύστερα από την πραγματοποίηση των απαιτούμενων πειραματικών βημάτων, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά στην Ενότητα 5.2.5, παρουσιάζονται στην Εικόνα 28. τα in vitro αποτελέσματα για την παραγωγή μεταβολιτών σε χρόνους επώασης μηδέν, μίας ώρας και δύο ωρών.



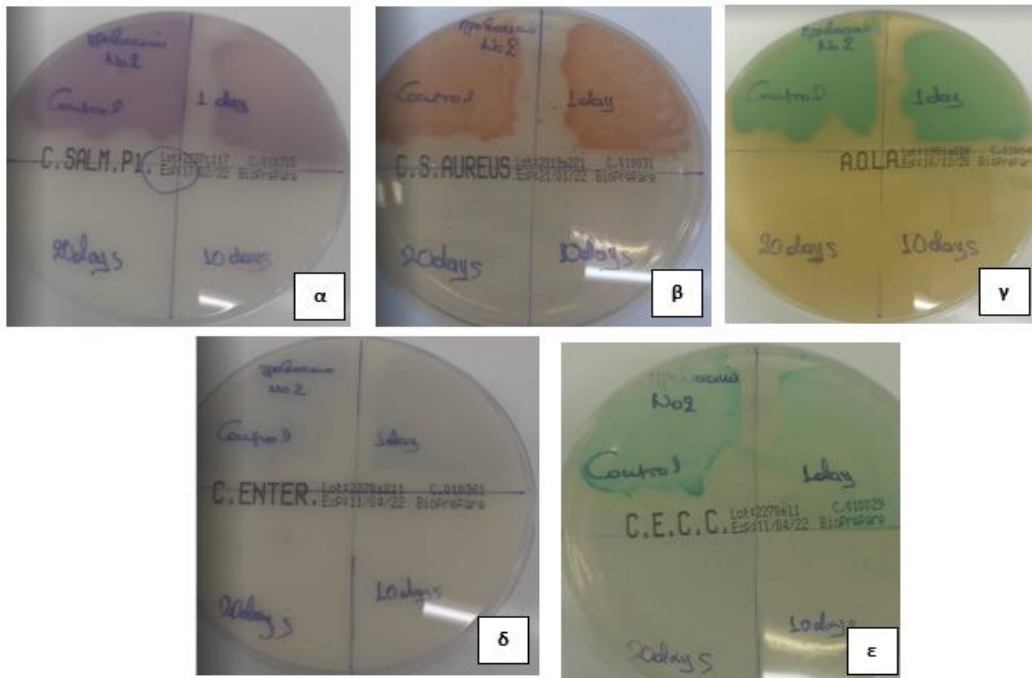
Εικόνα 28. Απεικόνιση in vitro αποτελεσμάτων από τους παραγόμενους μεταβολίτες σε χρόνο επώασης 0 , 1 ώρας και 2 ωρών του σκευάσματος που περιείχε το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus reuteri* έναντι των βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο χρόνος επώασης της έτοιμης κάψουλας με το περιεχόμενο οξυγαλακτικό βακτήριο δεν ήταν επαρκής, έτσι ώστε να παραχθεί ικανή ποσότητα μεταβολιτών για να μειώσει την αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* που εισήχθησαν.

Για αυτό τον λόγο συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι μεταβολίτες του παρασκευά-



σματος σε χρόνους επώασης 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημερών. Τα in vitro αποτελέσματα για κάθε βακτηριακό στέλεχος που μελετήθηκε παρουσιάζονται στην Εικόνα 29.



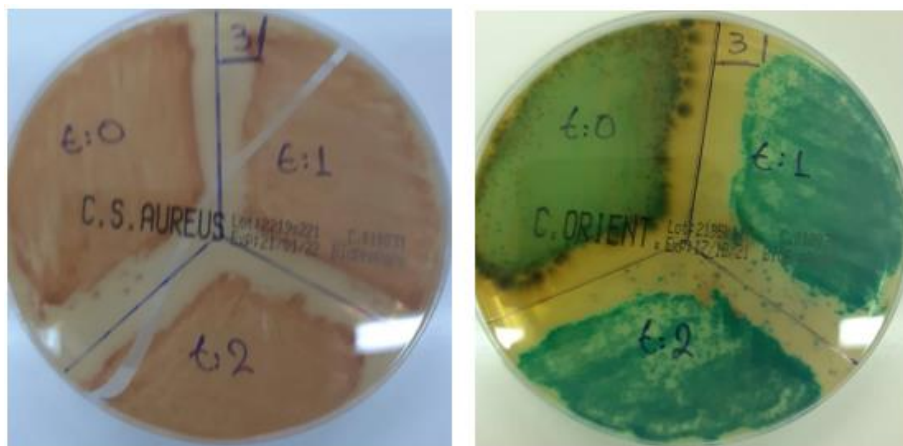
Εικόνα 29. Απεικόνιση in vitro αποτελεσμάτων από τους παραγόμενους μεταβολίτες 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημερών του σκευάσματος που περιείχε το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus reuteri* έναντι (α) *Salmonella enterica*, (β) *Staphylococcus aureus*, (γ) *Listeria monocytogenes*, (δ) *Enterococcus faecalis* και (ε) *Escherichia coli*.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν, βρέθηκε ότι οι μεταβολίτες του παρασκευάσματος με χρόνο επώασης 10 ημερών ήταν ικανοί να επιφέρουν πλήρη θανάτωση σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν.



### 6.2.2 Σκεύασμα Comfort Lactone

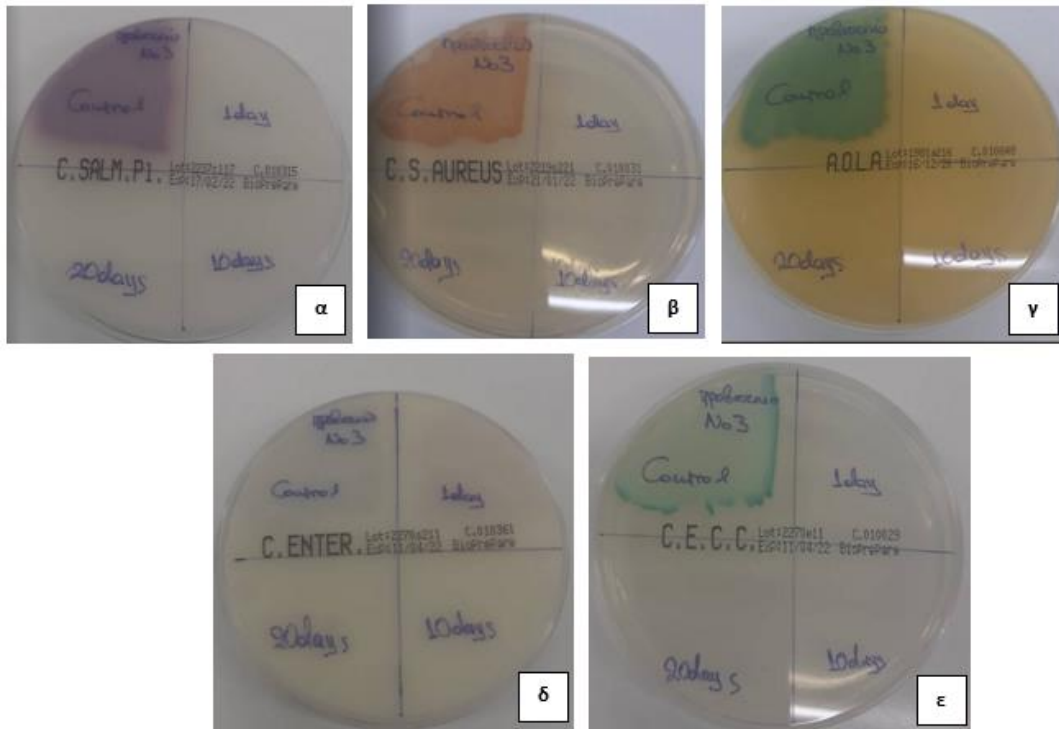
Το σκεύασμα Comfort Lactone περιέχει κάψουλες ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*). Ύστερα από την πραγματοποίηση των απαιτούμενων πειραματικών βημάτων, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά στην Ενότητα 5.2.5, παρουσιάζονται στην Εικόνα 30. τα *in vitro* αποτελέσματα για την παραγωγή μεταβολιτών σε χρόνους επώασης μηδέν, μίας ώρας και δύο ωρών.



Εικόνα 30. Απεικόνιση *in vitro* αποτελεσμάτων από τους παραγόμενους μεταβολίτες σε χρόνο επώασης 0, 1 ώρας και 2 ωρών του σκευάσματος που περιείχε ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων Comfort Lactone έναντι των βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο χρόνος επώασης της έτοιμης κάψουλας με το περιεχόμενη ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν ήταν επαρκής, έτσι ώστε να παραχθεί ικανή ποσότητα μεταβολιτών για να μειώσει την αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* που εισήχθησαν.

Για αυτό τον λόγο συλλέχθηκαν και εξετάσθηκαν οι μεταβολίτες του παρασκευάσματος σε χρόνους επώασης 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημερών. Τα *in vitro* αποτελέσματα για κάθε βακτηριακό στέλεχος που μελετήθηκε παρουσιάζονται στην Εικόνα 31.



Εικόνα 31. Απεικόνιση *in vitro* αποτελεσμάτων από τους παραγόμενους μεταβολίτες 24 ωρών, 10 ημερών και 20 ημερών του σκευάσματος που περιείχε ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων *Comfort Lactone* έναντι (α) *Salmonella enterica*, (β) *Staphylococcus aureus*, (γ) *Listeria monocytogenes*.

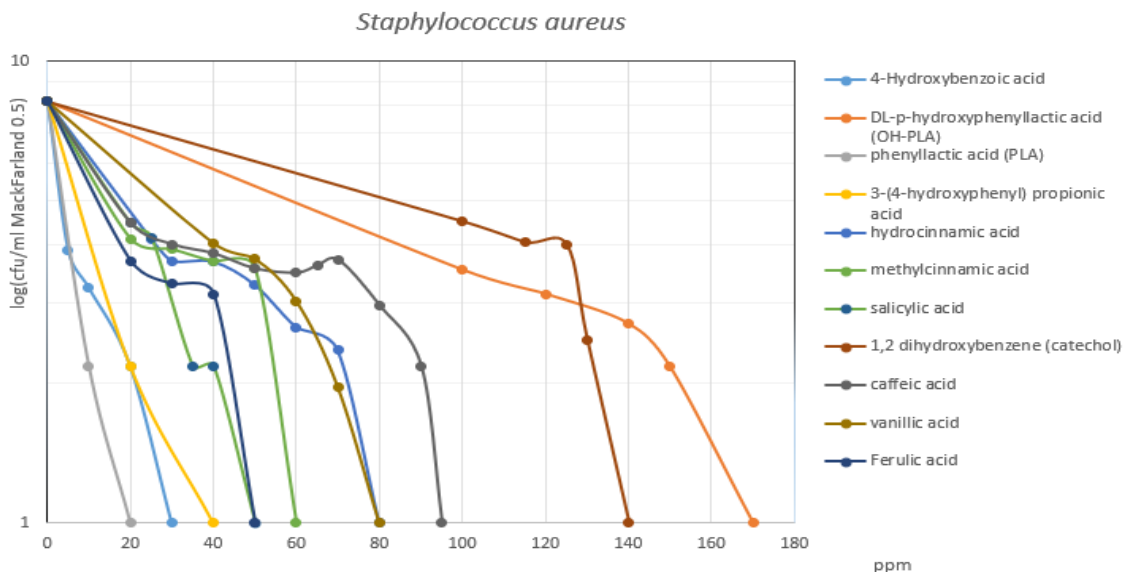
Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν, βρέθηκε ότι οι μεταβολίτες του παρασκευάσματος με χρόνο επώασης 24 ωρών ήταν ικανοί να επιφέρουν πλήρη θανάτωση σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν εκτός του του βακτηριακού στελέχους *Enterococcus faecalis* που χρειάστηκε παραγωγή μεταβολιτών 10 ημερών για την θανάτωσή του.

## Κεφάλαιο 7: Συζήτηση και Συμπεράσματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δράση έντεκα μεμονωμένων μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και οι μεταβολίτες έτοιμων παρασκευασμάτων ομάδας οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι συγκεκριμένης συγκέντρωσης παθογόνων βακτηριακών στελεχών.

Ύστερα από την πραγματοποίηση των πειραμάτων του Α Μέρους, συμπεραίνεται ότι:

- Το βακτηριακό στέλεχος *Staphylococcus aureus* εμφάνισε την μεγαλύτερη ευπάθεια στους μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων.
- Η επίτευξη λογαριθμικής μείωσης για το βακτηριακό στέλεχος *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το σύνολο των μεταβολιτών που μελετήθηκαν παρουσιάζεται αναλυτικά στο Γράφημα 12.

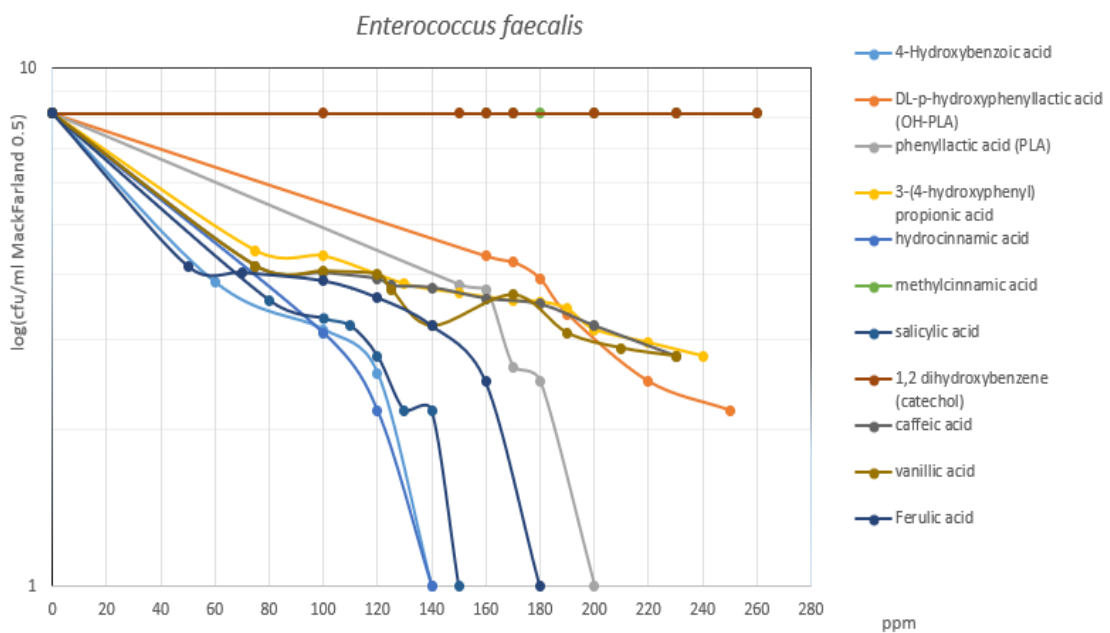


Γράφημα 12. Σχηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους *Staphylococcus aureus* σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.

- Η ουσία phenyllactic acid παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Staphylococcus aureus*, όπου σε συγκέντρωση μόλις 20ppm επίφερε τη πλήρη θανάτωση του. Αντίθετα, η ουσία DL-p-hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA) χρειάστηκε 170ppm για τη πλήρη θανάτωση του.
- Αντίθετα, το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis* παρουσίασε τη μεγαλύ-

τερη ανθεκτικότητα από τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν. Χρειάστηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών για να μπορέσουν να επιφέρουν πλήρη θανάτωση του με κάποιους μεταβολίτες να επιτυγχάνουν μικρή έως και καθόλου λογαριθμική μείωση.

- Η επίτευξη λογαριθμικής μείωσης για το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis* σε σχέση με το σύνολο των μεταβολιτών που μελετήθηκαν παρουσιάζεται αναλυτικά στο Γράφημα 13.

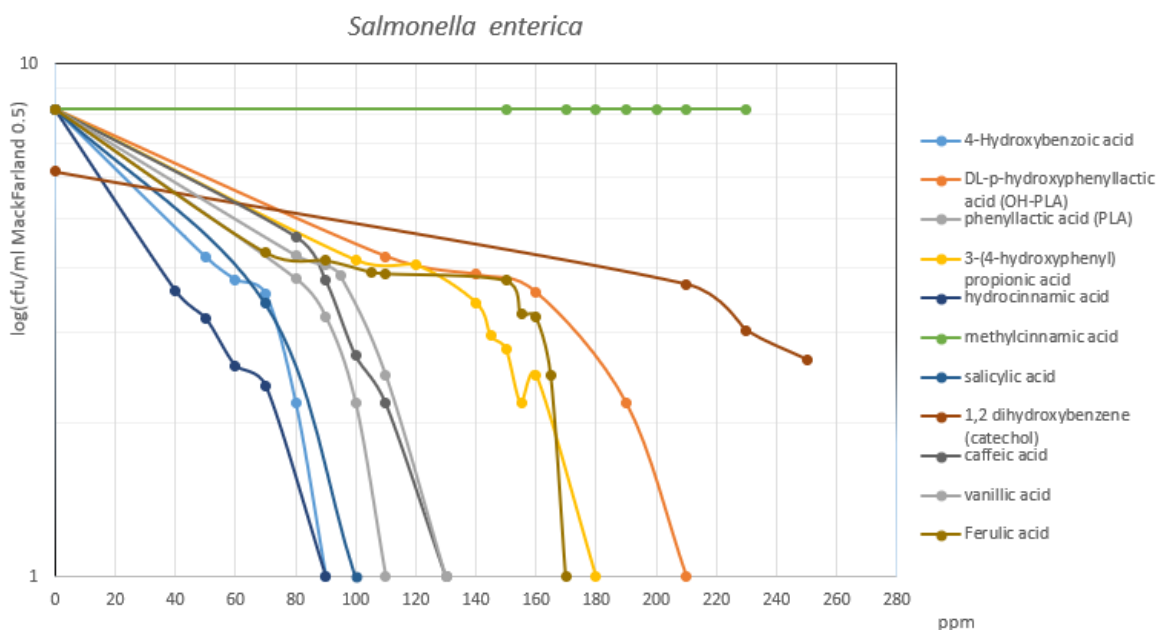


Γράφημα 13. Σχηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους *Enterococcus faecalis* σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.

- Οι ουσίες methylcinnamic acid και 1,2 dihydrobenzene (catechol) δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Enterococcus faecalis*. Οι ουσίες, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, caffeic acid και vanillic acid με συγκεντρώσεις μεταξύ 230 και 240ppm δεν επέφεραν πλήρη θανάτωση του βακτηριακού στελέχους αλλά λογαριθμική μείωση της τάξεως των 5 λογαριθμικών κύκλων, ενώ η ουσία DL-p-hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA) επέφερε μείωση 6 λογαριθμικών κύκλων σε συγκέντρωση 250ppm. Αντίθετα, οι ουσίες που εμφάνισαν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ήταν 4-Hydroxybenzoic acid, hydrocinnamic acid και salicylic acid, που σε συγκεντρώσεις μεταξύ 140 και 150ppm επέφεραν πλήρη θανάτωση στο βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus fae-*

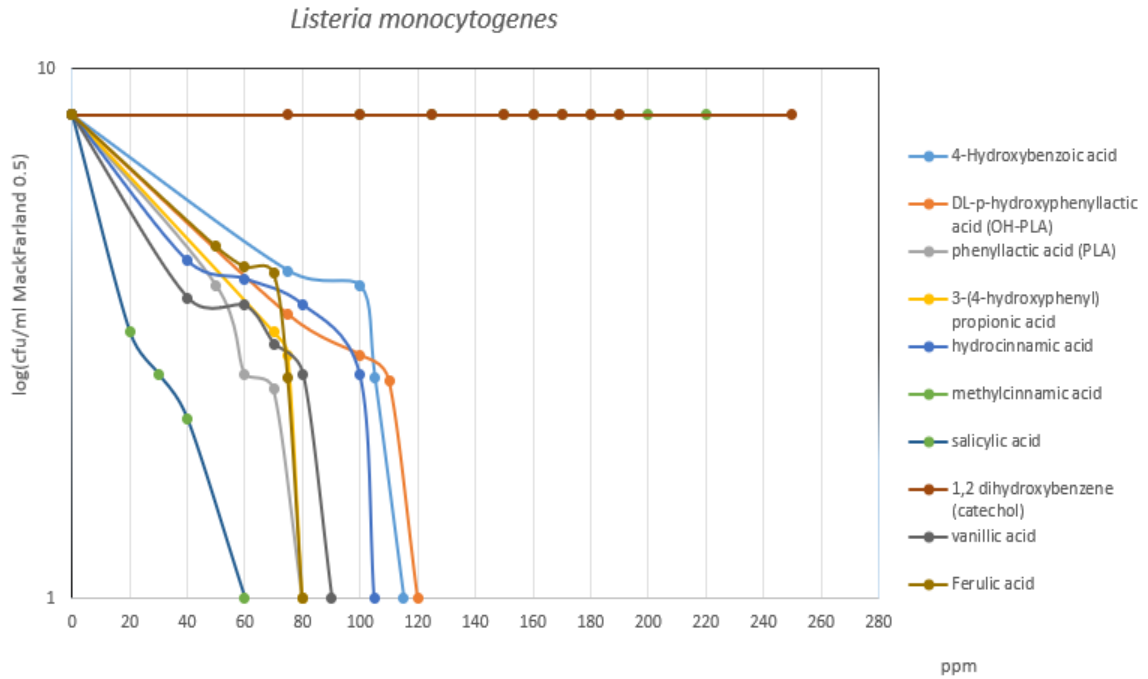
calis.

- Τα βακτηριακά στελέχη *Salmonella Enterica* και *Listeria monocytogenes* εμφάνισαν παραπλήσια ανθεκτικότητα έναντι το ουσιών που μελετήθηκαν. Με την *Listeria monocytogenes* να εμφανίζει σε κάποιες από αυτές τις ουσίες ταχύτερη λογαριθμική μείωση.
- Η επίτευξη λογαριθμικής μείωσης για το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella Enterica* σε σχέση με το σύνολο των μεταβολιτών που μελετήθηκαν, παρουσιάζεται αναλυτικά στο Γράφημα 14.



Γράφημα 14. Σχηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους *Salmonella enterica* σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.

- Οι ουσίες methylcinnamic acid και 1,2 dihydroxybenzene (catechol) δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Salmonella Enterica*. Αντίθετα, οι ουσίες που εμφάνισαν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ήταν 4-Hydroxybenzoic acid, hydrocinnamic acid και salicylic acid, που σε συγκεντρώσεις μεταξύ 90 και 100ppm επέφεραν πλήρη θανάτωση του.
- Όσον αφορά το βακτηριακό στέλεχος *Listeria monocytogenes*, η επίτευξη λογαριθμικής μείωσης της σε σχέση με το σύνολο των μεταβολιτών που μελετήθηκαν, παρουσιάζεται αναλυτικά στην Γράφημα 15.



Γράφημα 15. Σχηματική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης του βακτηριακού στελέχους *Listeria monocytogenes* σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν.

- Οι ουσίες methylcinnamic acid και 1,2 dihydroxybenzene (catechol) δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Listeria monocytogenes*. Αντίθετα, η ουσία που εμφάνισε την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση ήταν salicylic acid, που σε συγκεντρώσεις μόλις των 60ppm επέφεραν την πλήρη θανάτωση του. Οι ουσίες phenyllactic acid (PLA), 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, ferulic acid και vanillic acid εμφάνισαν την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση, όπου σε συγκεντρώσεις μεταξύ 80 και 90ppm επέφεραν την πλήρη θανάτωση του.
- Οι ουσίες 4-Hydroxybenzoic acid, phenyllactic acid (PLA), hydrocinnamic acid, salicylic acid και ferulic acid ήταν οι ουσίες που επέφεραν πλήρη θανάτωση σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν.

Ύστερα από την πραγματοποίηση των πειραμάτων του Β Μέρους, συμπεραίνεται ότι:

- Οι μεταβολίτες των παρασκευασμάτων οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι και των πέντε βακτηριακών στελεχών που μελετή-

- θηκαν.
- Ο χρόνος επώασης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, μικρότερου των 2 ωρών, δεν ήταν επαρκής για την παραγωγή μεταβολιτών ικανής ποσότητας έτσι ώστε να επιφέρουν θανάτωση της αρχικής συγκέντρωσης των βακτηριακών στελεχών.
  - Το σκεύασμα Comfort Lactone που περιείχε ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacillus rhamnoses*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifibacterium lactis*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifibacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*) παρουσίασε σε πιο μικρού χρόνους επώασης παραγωγή μεταβολιτών ποσότητας ικανής να θανατώσουν τα βακτηριακά στελέχη απ' ότι το σκεύασμα BioGaia ProTectis Family που περιείχε μόνο το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus reuteri*.
  - Το σκεύασμα Comfort Lactone παρήγαγε εντός 24 ωρών επαρκή ποσότητα μεταβολιτών για την πλήρη θανάτωση των βακτηριακών στελεχών *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.
  - Το βακτηριακό στέλεχος *Enterococcus faecalis* παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα υπόλοιπα στελέχη και δεν επιτεύχθηκε θανάτωση του με την προσθήκη μεταβολιτών 24 ωρών επώασης. Ο ακριβής χρόνος για την θανάτωση του βακτηριακού στέλεχος *Enterococcus faecalis* δεν ανιχνεύτηκε με ακρίβεια, διότι εξαρχής είχαν ληφθεί δείγματα μεταβολιτών σε χρόνους επώασης 24ωρών, 10 ημερών και 20 ημερών. Η επίτευξη θανάτωσης του κυμαίνεται μεταξύ μεταβολιτών με χρόνους επώασης 10 ημερών ή και λίγο παραπάνω από 24 ώρες.
  - Το σκεύασμα BioGaia ProTectis Family δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση σε μεταβολίτες που είχαν παραχθεί εντός των 24 ωρών. Η πλήρης θανάτωσης τους επήλθε με την εισαγωγή μεταβολιτών με χρόνους επώασης 10 ημερών. Και πάλι, ο ακριβής χρόνος που χρειάστηκε για την πλήρη θανάτωση των βακτηριακών στελεχών δεν ανιχνεύτηκε με ακρίβεια και κυμαίνεται μεταξύ μεταβολιτών με χρόνους επώασης 10 ημερών ή και λίγο παραπάνω από 24 ώρες.

## Κεφάλαιο 8: Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Καταλήγοντας, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η επιπλέον μελέτη των ακόλουθων:

- Ανάμειξη των προαναφερόμενων μεταβολικών προϊόντων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ώστε να μελετηθεί η συνεργιστική τους δράση με σκοπό την επίτευξη της θανάτωση των βακτηριακών στελεχών σε μικρότερες συγκεντρώσεις αυτών.
- Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μεταβολικών προϊόντων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και εύρεση τρόπων βελτιστοποίησης της παραγωγής τους.
- Εισαγωγή των μεταβολικών προϊόντων με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση σε τρόφιμα.
- Μελέτη πιθανής αρνητικής επιρροής αυτών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων ύστερα από την εισαγωγή τους, όπως για παράδειγμα αλλαγή ρεολογικών χαρακτηριστικών, υφής, γεύσης, οσμής κτλ. έτσι ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση ενοφθαλμισμού.
- Παρατήρηση και καταγραφή του χρόνου ζωής των προϊόντων ύστερα από τον ενοφθαλμισμό τους με τους προαναφερόμενους μεταβολίτες σε διαφορετικά θερμοκρασιακά περιβάλλοντα.
- Μελέτη παραγόμενων βακτηριοσινών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ταυτοποίηση τους, απομόνωση τους και εισαγωγή τους στα τρόφιμα.
- Παρατήρηση του μηχανισμού δράσης των μεταβολικών προϊόντων ύστερα από την εισαγωγή τους και μελέτη της βλάβης που υπόκεινται τα μελετούμενα παθογόνα βακτηριακά στελέχη.



## Αναφορές

- Adriana Dillenburg Meinhart, F. M. (2019, 09). Study of new sources of six chlorogenic acids and caffeic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103244>
- Antoine Delhay, J.-F. C. (2016, 02 23). Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in *Escherichia coli*. *American society for microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1128/mBio.00047-16>
- Argus Cezar da Rocha Neto, M. M. (2015, 12 23). Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, σσ. 64-70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018>
- Baek, E. a. (2012, 11 04). Antifungal Activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in Rice Cakes. *The Journal of Microbiology*, σσ. 842-848. doi:[10.1007/s12275-012-2153-y](https://doi.org/10.1007/s12275-012-2153-y)
- Brosnan B., C. A. (2012, 11 04). Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Anal. Bioanal. Chem*, σσ. 2983–2995. doi:[10.1007/s00216-012-5955-1](https://doi.org/10.1007/s00216-012-5955-1)
- Burak DEMİRHAN, E. N. (2019, 12 31). EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF SALICYLIC ACID ON MEATBALLS. *Makaleler*, σσ. 20-27.
- C.Rodriguezab, B. E.-F. (2021, 02). *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. *Food Control*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107540>
- Candace N. Rouchon, J. H.-N. (2022, 04 21). The Cationic Antimicrobial Peptide Activity of Lysozyme Reduces Viable *Enterococcus faecalis* Cells in Biofilms. *Antimicrobial activity and chemotherapy*. doi:<https://doi.org/10.1128/aac.02339-21>
- Carmen Lozano, C. T. (2017, 01). Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria. *Enferm Infec Microbiol Clin.*, σσ. 2-8. doi:[10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)
- Carmen Torres, C. A.-R.-S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*.
- CDC. (2020, 03 18). *Food Germs and Illnesses*. Ανάκτηση από Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>

- cdc. (χ.χ.). *Investigating Outbreaks*. Ανάκτηση από cdc.gov: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/index.html>
- ChemSpider. (χ.χ.). *Methylcinnamic acid structure*. Ανάκτηση από ChemSpider: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.553403.html>
- Chiang, H. P. (2017, 02). Incidence and Outcomes Associated With Infections Caused by Vancomycin-Resistant Enterococci in the United States: Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, σσ. 203 - 215. doi:<https://doi.org/10.1017/ice.2016.254>
- Christopher P. McHugh, P. Z. (2004, 04). pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. *Journal of Endodontics*, σσ. 218-219. doi:<https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00008>
- Dharmendra KumarMaurya, T. P. (2010, 12). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, σσ. 3369-3373. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.006>
- E. Gayathiri., B. ., (2018, 04 02). STUDY OF THE ENUMERATION OF TWELVE CLINICAL IMPORTANT BACTERIAL POPULATIONS AT 0.5 MCFARLAND STANDARD. *International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT)*, σσ. 880-893.
- E.R., P.-B. K. (2004). Listeriosis. *Pediatr. Res.*, 151-159.
- efsa. (2015-2020). *Foodborne outbreaks - dashboard*. Ανάκτηση από efsa: [https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard?fbclid=IwAR2GlkF5SQvjo9e-wJsuFqcyS5ecn7xuYiJIRZLCedkYiQ10m6i\\_K66DKBg](https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard?fbclid=IwAR2GlkF5SQvjo9e-wJsuFqcyS5ecn7xuYiJIRZLCedkYiQ10m6i_K66DKBg)
- Elizabeth A Mueller, A. J. (2019, 04 9). Plasticity of *Escherichia coli* cell wall metabolism promotes fitness and antibiotic resistance across environmental conditions. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.40754
- ESBL-producing Enterobacterales*. (2019, 11 22). Ανάκτηση από Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/ESBL.html>
- F. Özogul, V. Š. (2018, 10 25). Effect of natural zeolite (clinoptilolite) on in vitro biogenic amine production by Gram positive and Gram negative pathogens. *Frontiers in Microbiology*, σσ. 1-8. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02585>

- Farhan Ahmed Khan, A. M. (2016, 10). Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *Journal of Food and Drug Analysis*, σσ. 695-702. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.05.003>
- Fischetti, V. A. (2019, 07 07). Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. *Microbiology Spectrum*. doi:<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0012-2018>
- Francesca Valerio, P. L. (2006, 01 09). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters*, σσ. 289–295. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09494.x
- Ghulam Murtaza, S. K. (2014, 02 06). BioMed Research International. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/145342>
- Hafize Fidan, T. E. (2022, 07). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101741>
- Hafize Fidan, T. E. (2022, 07). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*.
- Hafize Fidan, T. E. (2022, 07). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101741>
- Huimin Yong, Y. L. (2021, 03 01). Chitosan Films Functionalized with Different Hydroxycinnamic Acids: Preparation, Characterization and Application for Pork Preservation. *Foods*. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10030536>
- Isabel Medina, I. U. (2012, 04 01). Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. *Food Chemistry*, σσ. 730-740. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.032>.
- J M Farber, P. I. (1991, 09). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.*, σσ. 476-511. doi:10.1128/mr.55.3.476-511.1991
- J.G. LeBlanc, J. L. (2011, 09 20). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, σσ. 1297-1309. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>

- Jajere, S. (2019, 04 06). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, σσ. 504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521
- James B. Kaper, J. P. (2004, 02). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, σσ. 123-140. doi:https://doi.org/10.1038/nrmicro818
- Jean-Claude Ogier, P. S. (2008, 09 01). Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *International Journal of Food Microbiology*, σσ. 291–301. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017
- Jhalka Kadariya, T. C. (2014). Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*.
- Ji Youn Lim, J. W. (2010, 1 20). A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, σσ. 5-14.
- Jing Wang, R. H. (2019, 11 1). High performance loose nanofiltration membranes obtained by a catechol-. *Chemical Engineering Journal*. doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121982
- João Victor de Oliveira Santos, S. D. (2022, 04 31). Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. *Current Microbiology volume*. doi:https://doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9
- K. A. Presser, T. R. (1998, 05 01). Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of Escherichia coli as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1773-1779.1998
- Khim Phin Chong, S. R. (2009). In Vitro Antimicrobial Activity and Fungitoxicity of Syringic Acid, Caffeic Acid and 4-hydroxybenzoic Acid against Ganoderma Boninense. *Journal of Agriculture Science*. doi:10.5539/jas.v1n2p15
- Kotarba, W. P.-W.-W. (2019, 09). Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of Nanoparticle Research*. doi:10.1007/s11051-019-4617-z
- Leon Iri Kupferwasser, M. R.-Q. (2003, 07 15). Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in Staphylococcus aureus. *JCI*. doi:10.1172/JCI16876

- Li X-Z, P. P. (2015, 04 28). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev*, σσ. 337-418. doi:10.1128/CMR.00117-14.
- Listeria (Listeriosis)*. (2019, 03 29). Ανάκτηση από FDA USA FOOD & DRUGS ADMINISTRATION.
- Livermore, D. M. (2012, 07 27). Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *KJIM*. doi:10.3904/kjim.2012.27.2.128.
- Lozano Guzmán Eduardo, B. S. (2018, 08 21). Low accuracy of the McFarland method for estimation. *African Journal of Microbiology Research*, σσ. 736-740.
- M. S. SCHVARTZMAN, C. B. (2011, 06 09). Effect of pH and Water Activity on the Growth Limits of *Listeria*. *Journal of Food Protection*, σσ. 1805-1813. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-102
- Martin M. Dinges, P. M. (2000, 01 01). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. doi:https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.16
- McLauchlin J., M. R. (2004, 05). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.*, σσ. 15-33. doi:10.1016/S0168-1605(03)00326-X
- Md Ashraful Alam, N. S. (2016, 03 02). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*. doi:https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3
- Medvedová A, H. A. (2019, 12 5). *Staphylococcus aureus* 2064 growth as affected by temperature and reduced water activity. *Ital J Food Saf.* doi:10.4081/ijfs.2019.8287
- Merck. (χ.χ.). *3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid structure*. Ανάκτηση από Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/aldrich/h52406>
- Merck. (χ.χ.). *DL-p-Hydroxyphenyllactic acid structure*. Ανάκτηση από Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/aldrich/h3253>
- Mert O. Karataş, S. G. (2020, 04 17). Catechol-bearing imidazolium and benzimidazolium chlorides as promising antimicrobial agents. *Archiv der Pharmazie*. doi:https://doi.org/10.1002/ardp.202000013
- Mina Nasiri, S. H. (2022, 01). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in pasteurized milk: Prevalence, genotyping, and characterization of virulence traits. *LWT(153)*. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112452

- Mu W, Y. Y. (2010, 04). Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007 fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, σσ. 369-371. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.10.005
- Murray, B. W. (1999). Enterococci: new aspects of an old organism. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 328-334.
- Naresh Kumar, V. P. (2014, 12). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, σσ. 86-93. doi:https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002
- Nasim Kashef, Y.-Y. H. (2016, 02 23). Advances in antimicrobial photodynamic. *DE GRUYTER*. doi:10.1515/nanoph-2016-0189
- Neha Sharma, N. T. (2020). An Overview of therapeutic effects of vanillic acid. *Plant Archives*, σσ. 053-3059.
- Nerino Allocati, M. M. (2013, 11 07). Escherichia coli in Europe: An Overview. *Environment Research and Public Health*, σσ. 6235-6254. doi:https://doi.org/10.3390/ijerph10126235
- Nyachuba, D. G. (2010, 05 01). Foodborne illness: is it on the rise? *Nutrition Reviews*( 68), σσ. 257-269. doi:https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00286.x
- Oliveira, J., & Reygaert., W. C. (2022, 03 26). Gram Negative Bacteria. *StatPearls*.
- Paola Lavermicocca, F. V. (2000, 09 1). Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000
- PASCAL DELAQUIS, K. S. (2004, 07 23). Effect of pH on the Inhibition of. *Journal of Food Protection*, σσ. 1472-1476. doi:https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1472
- Pingping Zhou, C. Y. (2021, 07 20). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced production of caffeic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology volume*, σσ. pages 5809–5819.
- Prabu, S. S. (2018, 03 23). Salicylic Acid Based Hyperbranched Polyester: Synthesis, Characterization, Optical Properties and Antimicrobial Activity. *Macromol. Res.*, σσ. 831-837. doi:https://doi.org/10.1007/s13233-018-6116-y
- PubChem. (2022). *Compound Summury Vanillin*. Ανάκτηση από National Library of Medicine: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillin

- Ramón Ordoñez, L. A. (2022, 09). Effect of ferulic and cinnamic acids on the functional and antimicrobial properties in thermo-processed PLA films. *Food Packaging and Shelf Life*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100882>
- Rasha AlSheikh, H. N.-K. (2022, 01 28). In Vitro Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester against Different Oral Microorganisms, . *Applied Sciences in Oral Health and Clinical Dentistry*. doi:<https://doi.org/10.3390/app12083959>
- Richard K. Gast, R. E. (2019). Salmonella Infections. Στο M. B. David E. Swayne, *Diseases of Poultry* (Τόμ. 14th Edition). doi:<https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch16>
- Robert M. Hanes, Z. H. (2022, 02 28). Investigation of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* from 2010 through to 2021. *Environmental Research and Public Health*. doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph19095506>
- S.V.Bhaskar. (2017). Foodborne diseases—disease burden. Στο *Food Safety in the 21st Century* (σσ. 1-10). Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00001-7>
- Salicylic acid chemical structure*. (2020, 09 20). Ανάκτηση από Wikimedia Commons: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salicylic\\_acid\\_chemical\\_structure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salicylic_acid_chemical_structure.png)
- Sara Lomonaco, D. N. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, σσ. 172-183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.008>
- Sarah Crowley, J. M. (2013, 10). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, σσ. 93-109.
- Sen-Sung Cheng, J.-Y. L.-H.-T. (2008, 07 08). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, σσ. 5145-5149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>
- Shiyi Ou, K.-C. K. (2004, 07 28). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, σσ. 1261-1269. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Sirous Faraji Hormozi, N. V. (2018, 07 16). Antibiotic resistance in patients suffering from nosocomial infections in Besat Hospital. *European Journal of Translational Myology*. doi:10.4081/ejtm.2018.7594
- Soyer, D. K. (2019, 4 13). Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Does Not Develop Resistance to Vanillic Acid and 2-Hydroxycinnamic Acid after Continuous Exposure

- in Vitro. *ACS Omega*, σσ. 15393–15400.  
doi:<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01336>
- Stephanie Brown, J. P. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. Στο *Annual Review of Microbiology* (Τόμ. 67, σσ. 313-336). Boston, Massachusetts.  
doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Steven L.Percival, D. W. (2014). Chapter Ten - Salmonella. Στο *Microbiology of Waterborne Diseases* (Τόμ. II, σσ. 209-222). Academic Press.  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00010-X>
- Steward, Karen. (2019, 08 21). Gram Positive vs Gram Negative. *Technology Networks Immunology & Microbiology*.
- Sun Lee, S. Y. (2012, 09 27). Antimicrobial medical sutures with caffeic acid. *RSC Publishing*. doi:10.1039/c2md20289a
- T. Ross, D. R. (2003, 04 15). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, σσ. 33-43. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00252-0)
- T.V. Plavec, A. B. (2020, 01 21). Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. *Microorganisms*, σ. 297. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Tankeshwar, A. (2022, 03 05). *Microbe Online*. Ανάκτηση από Preparation of McFarland Turbidity Standards: <https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standards/>
- Taylor TA, U. C. (2022, 02 14). Staphylococcus Aureus. doi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Thomas J. Silhavy, D. K. (2010, 05 02). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Vougiouklaki, D. a. (2021, 10 29). Characterization of Lacticaseibacillus rhamnosus, Levilactobacillus brevis and Lactiplantibacillus plantarum Metabolites and Evaluation of Their Antimicrobial Activity against Food Pathogens. *applied sciences*. doi: <https://doi.org/10.3390/app12020660>
- Weibel, G. K. (2017, 07 25). Biochemistry. doi:10.1021/acs.biochem.7b00346



- Weidong Qian, M. Y. (2019, 09 28). Antibacterial Mechanism of Vanillic Acid on Physiological, Morphological, and Biofilm Properties of Carbapenem-Resistant *Enterobacter hormaechei*. *Journal of Food Protection*, σσ. 576–583.
- Wessels, S. L. (2004, 10). The Lactic Acid Bacteria, the Food Chain, and Their Regulation. *Trends in Food Science & Technology*, σσ. 498–505. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
- WHO. (2018, 02 20). *Listeriosis*. Ανάκτηση από World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- WHO. (2018, 02 07). *World Health Organization*. Ανάκτηση από E.coli: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Wiebke Jansen, A. M. (2019, 02). Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *The Veterinary Journal*, σσ. 75-82. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.009>.
- wikidata. (χ.χ.). *4-hydroxybenzoic acid structure*. Ανάκτηση από wikidata: <https://www.wikidata.org/wiki/Q229970>
- Xian-Zhi Li, P. P. (2015, 04 18). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *American Societyfor Microbiology*, σσ. 337-418. doi: 10.1128/CMR.00117-14
- Xingmin Wang, Y. Y. (2020, 03). Risks associated with enterococci as probiotics. *Food Research International*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108788>
- Xiuting Wang, Y. H. (2018, 03 27). A new approach for efficient synthesis of phenyllactic acid from. *Journal of Food Biochemistry*. doi:10.1111/jfbc.12584
- Xiuting Wang, Y. H. (2018, 08 01). A new approach for efficient synthesis of phenyllactic acid from L-phenylalanine: Pathway design and cofactor engineering. *Journal of Food Biochemistry*. doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12584>
- Yang Li, A. V. (2011, 04). tructural and genetic relationships of two pairs of closely related O-antigens of Escherichia coli and Salmonella enterica : E. coli O11/S. enterica O16 and E. coli O21/S. enterica O38. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61, σσ. 258–268. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00771.x>

- Young, K. D. (2006, 09). The Selective Value of Bacterial Shape. (U. o. Department of Microbiology and Immunology, Επμ.) *American Society for Microbiology, Volume 70*, σσ. 660-703. doi:<https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-06>
- Zaixiang Lou, H. W. (2012, 06). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, σσ. 550-554. doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.022
- Zhang, H. S. (2012, 08 29). Engineering E. coli for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* , σσ. 3333–3341. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4544-8>
- Espíndola KMM, F. R. (2019, 06 21). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front. Oncol.* doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Khatkar, A. N. (2013, 04 30). Synthesis and antimicrobial evaluation of ferulic acid derivatives. *Res Chem Intermed*, σσ. 299–309. doi:<https://doi.org/10.1007/s11164-013-1192-2>
- ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ, Γ. (2022, 05 03). *Bioprepate Microbiology*. Ανάκτηση από Οδηγίες Χρήσης Θρεπτικών Υλικών: <https://www.bioprepate.gr/news/odigies-xriseos.html>