



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

**Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής
και Περιβάλλοντος**

Διπλωματική Εργασία

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ**

ΜΙΤΣΑΓΓΑ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

Τεχνολόγος Τροφίμων



ΛΑΡΙΣΑ 2018

*ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ*

*IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A GRAM NEGATIVE
BACTERIUM WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιαβάσης Ιωάννης (επιβλέπων): Επίκουρος καθηγητής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα): Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής μου, ιδιαίτερα στο μέρος της μοριακής ταυτοποίησης και των μεθόδων μοριακής βιολογίας που χρησιμοποίησα.

Την υποψήφια διδάκτορα Κατσούλα Αθανασία για την πολύτιμη καθοδήγηση της κατά την διάρκεια των πειραμάτων στο εργαστήριο Φυτών και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας. Τον κ. Δημήτριο Καρούζα, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου. Τον κ. Βασιλειάδη Σωτήρη για την δημιουργία του φυλογενετικού δένδρου. Την κ. Ροβολή Μάγδα, μεταδιδάκτορα της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συμπαράσταση καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στους φίλους μου Τάνια, Βασίλη, Μαρία, μικρή Σοφία, Γιάννη που με στήριζαν συναισθηματικά στα δυο χρόνια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στον αδερφό μου Ανδρέα που με στήριζαν σε όλες μου τις αποφάσεις όλα αυτά τα χρόνια.

Μα πάνω από όλα θα ήθελα να εκφράσω την τεράστια ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα κ.Ιωάννη Γιαβάση, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλίας, που μου εμπιστεύτηκε το θέμα αυτό, που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλίας, για την βοήθεια του στην ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος οικονομικά και ηθικά. Τέλος, τον ευχαριστώ γιατί χωρίς την βοήθειά του δεν θα ήμουν εδώ σήμερα και δεν θα είχα καταφέρει όσα έχω καταφέρει.

Μιτσάγγα Χρυσάνθη

Φεβρουάριος 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
Κεφάλαιο 1 ^ο : Βιολογική καταπολέμηση μικροοργανισμών.....	10
1.1 Εισαγωγή	10
1.2 Βιοπροστασία.....	10
1.3 Βακτηριοφάγοι.....	12
1.4 Μικροοργανισμοί ανταγωνιστές σε τρόφιμα και φυτά.....	16
1.4.1. Οι Ζύμες ως μικροβιακοί ανταγωνιστές	17
1.4.2. Τοξίνες ζυμών.....	19
1.5 Γαλακτικά βακτήρια (LAB).....	20
1.5.1 Αντιμικροβική δράση ορισμένων μεταβολιτών των γαλακτικών βακτηρίων (LAB):	21
1.5.2 Ρετουρίνη (reteurin 3-HPA, 3-hydroxypropionaldehyde)	22
1.6 Ψευδομονάδες.....	23
1.7 Παράγωγα μικροοργανισμών (αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ουσίες).....	25
1.7.1 Βακτηριοσίνες.....	25
1.7.2 Νισίνη	28
1.8 Χιτινάσες.....	33
Κεφάλαιο 2 ^ο : Εισαγωγή στις <i>Pseudomonas</i>	35
2.1 Ονοματολογία - Ταξινόμηση	35
2.2.1 Δομή-Φυσιολογία	37
2.2 <i>Pseudomonas</i> και βιοπροστασία.....	39
2.3 Σύνθεση της μελανίνης σε διάφορους μικροοργανισμούς	43
Κεφάλαιο 3 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι.....	48

3.1 Μοριακές δοκιμές ταυτοποίησης.....	48
3.2 Βιοχημικές δοκιμές.....	53
3.3 Μελέτη κινητικότητας και μεγέθους κυττάρων.....	54
3.3.1. Μελέτη κινητικότητας.....	54
3.3.2. Μελέτη μεγέθους των κυττάρων μετά από διήθηση.....	54
3.4 Μέτρηση μελανίνης βακτηρίου σε υγρό ζύμωσης Potato Dextrose Broth.....	54
3.5 Μελέτη εμφάνισης αποικιών ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης.....	55
3.5.2 Μελέτη φυσιολογίας και συνθηκών ανάπτυξης.....	56
3.6 Έλεγχος σπορογονίας.....	59
3.7 Έλεγχος αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο.....	60
3.8 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης.....	62
3.8.1. Μέτρηση ζωνών αναστολής σε βοθρία (well-difusion assay).....	62
3.8.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου <i>Pseudomonas sp</i> ενάντια στους μύκητες <i>Aspergillus flavus</i> και <i>Rhizoctonia solani</i>	63
3.8.3 Μέτρηση μείωσης πληθυσμού του μύκητα <i>Penicillium expansum</i> και της ζύμης <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> μετά από συγκαλλιέργεια με το βακτήριο <i>Pseudomonas sp</i>	65
Κεφάλαιο 4 ^ο : Αποτελέσματα και συζήτηση.....	66
4.1 Αποτελέσματα Μοριακών δοκιμών ταυτοποίησης.....	66
4.2 Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών.....	72
4.3 Μελέτη κινητικότητας και μεγέθους κυττάρων.....	74
4.3.1 Μελέτη κινητικότητας.....	74
4.3.2 Μελέτη μεγέθους των κυττάρων μετά από διήθηση.....	74
4.4 Μελέτη μελανίνης βακτηρίου σε υγρό ζύμωσης Potato Dextrose Agar.....	74
4.5 Μελέτη εμφάνισης αποικιών ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης.....	76

4.5.1 Μελέτη φυσιολογίας και συνθηκών ανάπτυξης	79
4.6 Έλεγχος σπορογονίας	85
4.7 Έλεγχος αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο.	86
4.8 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης	90
4.8.1 Μέτρηση ζωνών αναστολής σε βοθρία (well diffusion assay).....	90
4.8.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου <i>Pseudomonas</i> <i>sp</i> ενάντια στους μύκητες <i>Aspergillus flavus</i> και <i>Rhizoctonia solani</i>	94
4.9 Συζήτηση αποτελεσμάτων	100
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπεράσματα.....	103
Βιβλιογραφία	105

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε με μοριακές και βιοχημικές μεθόδους η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός ενός βακτηρίου το οποίο απομονώθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλίας στα πλαίσια της προπτυχιακής διατριβής μου, εξ' αιτίας της αντιμυκητιακής του δράσης *in vitro*. Το βακτήριο αυτό είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο ανήκει στο γένος *Pseudomonas* το οποίο έχει συγγένεια με την *Pseudomonas fluorescens*. Είναι θετικό σε βιοδοκιμές για παραγωγή οξειδάσης και καταλάσης, έχει κινητικότητα, μπορεί και διασπά το κιτρικό οξύ, έχει λιπολυτική ικανότητα στους 8°C ενώ και έχει πολύ μικρό μέγεθος (μπορεί και περνάει από φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2μm). Το βέλτιστο pH ανάπτυξης είναι το 9 ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 25°C, και δε σχηματίζει σπόρια. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας ανάπτυξης μπορεί και παράγει μια μπλε- μαύρη χρωστική, η οποία για την ώρα έχει άγνωστη σύσταση και βιολογικό ρόλο.

Τέλος, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή του δράση τόσο σε τροφοπαθογόνα βακτήρια όσο και σε φυτοπαθογόνους ή αλλοιογόνους μύκητες. Στις *in vitro* μετρήσεις διαπιστώθηκε ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα είχαν αντιμυκητιακή δράση, η οποία ποικίλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό-στόχο, ενώ δεν παρουσίασε καμία αντιμικροβιακή δράση το μεμονομένο ενδοκυτταρικό ή εξωκυτταρικό περιεχόμενο μετά την απομάκρυνση ή την καταστροφή των κυττάρων (συνεπώς η αντιμικροβιακή δράση σχετίζεται με την ανάπτυξη των ζωντανών κυττάρων). Δεν παρατηρήθηκε επίσης καμία αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων που μελετήθηκαν, ούτε από τα ζωντανά κύτταρα, αλλά ούτε και από το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιεχόμενο (ελεύθερο κυττάρων).

Abstract

In the present work, molecular and biochemical methods have been carried out to identify and characterize a bacterium isolated in the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of the Department of Food Technology of TEI of Thessaly in the framework of my undergraduate thesis due to its *in vitro* antifungal activity. This bacterium is a Gram negative bacterium which belongs to the genus *Pseudomonas*, which is closely related to *Pseudomonas fluorescens*. It is positive in bioassays for the production of oxidase and catalase, with mobility, and can utilize citric acid, it has lipolytic ability in 8°C and it has a very small size (and can pass through filters with a pore size of 0.2µm). The optimal pH for growth is 9 while the optimal growth temperature is 25°C, and it does not form spores. Under a certain temperature regime of growth conditions, it can produce a blue-black pigment, which as yet has an unknown composition and biological role.

Finally, its antimicrobial activity has been studied against both food pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. *In vitro* measurements that only living cells had antifungal activity, which varies according to the target microorganism, while the isolated intracellular or extracellular content after removal or destruction of the cells lack any antimicrobial activity (therefore the antimicrobial activity is related to bacterial growth). No antimicrobial activity was observed against the pathogenic bacteria studied, neither by living cells nor by intracellular and extracellular (cell free) content.

Κεφάλαιο 1^ο: Βιολογική καταπολέμηση μικροοργανισμών

1.1 Εισαγωγή

Στις μέρες μας, οι καταναλωτές αρχίζουν να ενημερώνονται για την επίδραση που έχουν στην υγεία τους τα συστατικά των τροφίμων που επιλέγουν να καταναλώνουν και για το λόγο αυτό παρατηρείται μια στροφή προς κατανάλωση τροφίμων που ενισχύουν την υγεία και προλαμβάνουν μακροχρόνιες ασθένειες. Οι καταναλωτές ζητούν ανθεκτικά, ασφαλή και ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, χωρίς χημικά συντηρητικά και τεχνητά πρόσθετα. Δεν είναι τυχαία η στροφή των καταναλωτών προς βιολογικά-αγνά τρόφιμα καθώς και φυσικές τροφές που χωρίς πρόσθετα, παρουσιάζουν πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι καταναλωτές ευαισθητοποιούνται και διαλέγουν τρόφιμα που έχουν υποστεί φιλικές προς το περιβάλλον επεξεργασίες και βασίζονται στη χρήση φυσικών ουσιών (Tirloni et al., 2014; Oliveira et al., 2013; Sharma et al., 2009; Soomro et al., 2002)

Ωστόσο, είναι δύσκολο να δημιουργούνται προϊόντα που να ανταποκρίνονται στις σύγχρονες ανάγκες και επιθυμίες των καταναλωτών. Συγκεκριμένα, απαιτούνται προϊόντα χαμηλού κόστους και ταυτόχρονα ασφαλή, με υψηλή διατροφική αξία και ελάχιστα επεξεργασμένα. Για το λόγο αυτό η βιομηχανία τροφίμων αντιμετωπίζει την πρόκληση να μειώσει τα χημικά συντηρητικά και να εκπληρώσει την απαίτηση των καταναλωτών για φυσικά και ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, με σύγχρονες τεχνολογίες και νέες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η εφαρμογή προτάσεων για βιοπροστασία αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική (da Silva Malheiros et al., 2010; Hugas, 1998).

1.2 Βιοπροστασία

Ο βιολογικός έλεγχος (ή βιοέλεγχος) ως μέθοδος για την προστασία των καλλιεργειών και άλλων ευπαθών προϊόντων έχει λάβει αυξημένη προσοχή από την επιστημονική ερευνητική κοινότητα τα τελευταία χρόνια (Bruce et al., 2002). Ειδικότερα η βιολογική προστασία ή βιο-προστασία (bioprotection) είναι μια εναλλακτική λύση στις χημικές επεξεργασίες. Η βιο-προστασία χρησιμοποιεί έναν μικροοργανισμό ή προϊόντα του για να αναστείλει την ανάπτυξη ή βλαβερές συνέπειες ενός άλλου παθογόνου μικροοργανισμού ενισχύοντας την ασφάλεια και

αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Schnürer and Magnusson,2005; Kreber and Morrell, 1992).

Η βιο-προστασία ενισχύει την αποτελεσματικότητα των καλλιεργητών μεθόδων στη γεωργία, ειδικά στη βιολογική γεωργία, η οποία προσπαθεί να μειώσει, και γιατί όχι να εξαλείψει, την χρήση χημικών φυτοφαρμάκων για τις σοδειές αφού οι επιπτώσεις για το περιβάλλον είναι σημαντικές. Για το λόγο αυτό και έχει χαρακτηριστεί ως «πράσινη τεχνολογία» (Veskoníć et al., 2012; Trias, 2008).

Η βιο-προστασία μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση των εξής βιο-παραγόντων:

- ζωντανών μη παθογόνων μικροοργανισμών που θα λειτουργήσουν ως ανταγωνιστές, όπως είναι η σημαντική κατηγορία των γαλακτικών βακτηρίων Lactic acid bacteria (LAB) ή των μεταβολιτών τους (π.χ. βακτηριοσίνες)
- βακτηριοφάγων
- αντιβιοτικών

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένας μικροοργανισμός για να αποτελέσει βιο-παράγοντα είναι(Sharma et al., 2009; Trias, 2008):

- να έχει γενετική σταθερότητα
- να μην είναι απαιτητικός σε διατροφικές ανάγκες
- να είναι ικανός να επιβιώσει σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες
- να μπορεί να αναπτύσσεται σε φτηνό υπόστρωμα στο ζυμωτήρα
- να είναι σε μορφή που να μπορεί να αποθηκεύεται και χορηγείται αποτελεσματικά
- να είναι συμβατός με άλλες χημικές και φυσικές επεξεργασίες
- να παρουσιάζει αντίσταση στα χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα
- να μην είναι παθογόνος και να μην παράγει βλαβερές ουσίες για την υγεία του ανθρώπου
- να είναι αποτελεσματικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων

1.3 Βακτηριοφάγοι

Παράλληλα με τη δημιουργία βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, ξεκίνησε η έρευνα για εναλλακτική αντιμετώπιση των παθογόνων βακτηρίων με τη χρήση εναλλακτικών στρατηγικών και το ενδιαφέρον στράφηκε προς ανάπτυξη έρευνας στην αντιβακτηριδιακή ικανότητα των βακτηριοφάγων (Strauch et al., 2007).

Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί που «μολύνουν» και λύουν μόνο βακτηριακά κύτταρα. Ορισμένοι βακτηριοφάγοι είναι περισσότερο εξειδικευμένοι και προσβάλλουν συγκεκριμένο στέλεχος, ενώ άλλοι λιγότερο και προσβάλουν ένα σύνολο βακτηριακών στελεχών του ίδιου γένους. Σχετικά πρόσφατα έγινε γνωστό ότι οι βακτηριοφάγοι μπορούν να έχουν πολλές εφαρμογές στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν α) ως εναλλακτικά αντιβιοτικά για ζώα, β) ως βιο-συντηρητικά σε τρόφιμα και γ) ως ανιχνευτές παθογόνων βακτηρίων στη τροφική αλυσίδα (García et al., 2008).

Ανακαλύφθηκαν από τους Ernest Hankin (1896) και Frederick Twort (1915), που παρατήρησαν την αντιβακτηριδιακή τους δράση. Αυτό τράβηξε πρόσκαιρα το ενδιαφέρον των βιομηχανιών, καθώς αργότερα εμφανίστηκαν τα αντιβιοτικά. Στην αγορά υπάρχουν προϊόντα που βασίζονται στους φάγους, π.χ. Phage Bioderm (García et al., 2008).

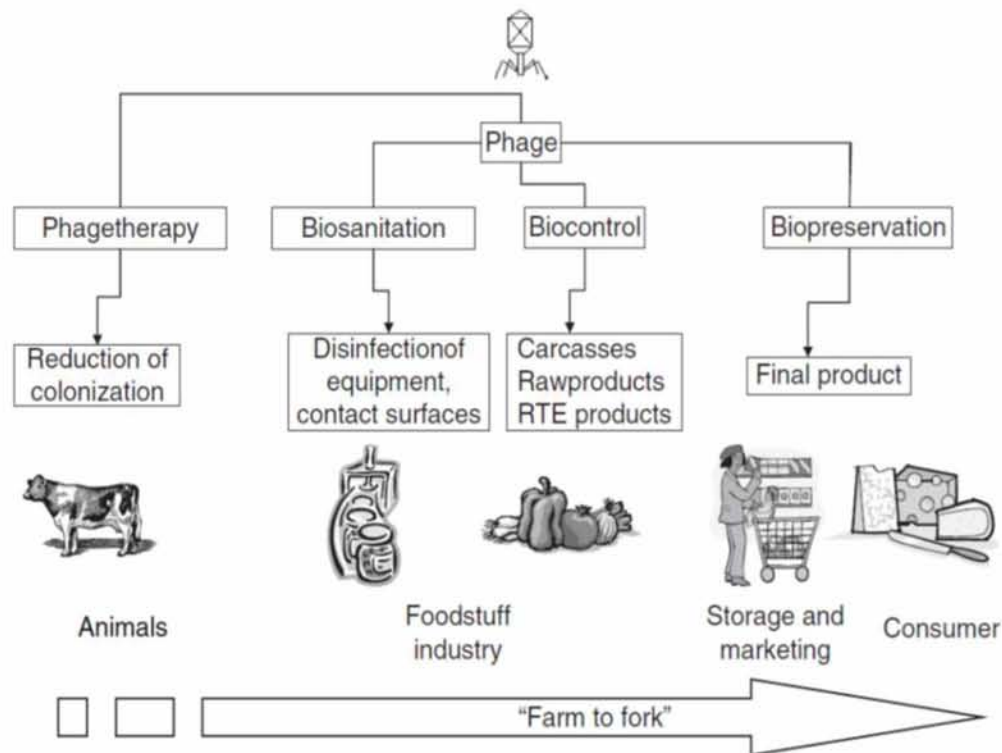
Δύο χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων που παράλληλα τα καθιστούν ασφαλή στη χρήση, είναι ότι παρουσιάζουν εξειδίκευση στους ξενιστές και είναι ακίνδυνα για τα θηλαστικά. Ωστόσο, το γεγονός ότι είναι ιοί και όπως είναι γνωστό, έχουν την ικανότητα να μεταλλάσσονται, δημιουργεί ερωτηματικά για τη χρήση τους στα τρόφιμα (Strauch et al., 2007).

Πλεονεκτήματα βακτηριοφάγων ως εργαλείων βιο-ελέγχου για ασφαλή τρόφιμα (García et al., 2008)

- Ιστορικό ασφαλούς χρήσης
- Πανταχού παρόντες στη φύση, συμπεριλαμβανομένων των οικοσυστημάτων τροφίμων
- Εκτεταμένη κλινική χρήση στην Ανατολική Ευρώπη
- Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες στην εντερική μικροχλωρίδα
- Αβλαβή για κύτταρα θηλαστικών

- Γενετικά δεκτικά
- Ευέλικτη χρήση σε όλη την τροφική αλυσίδα
- Εργαλεία για την ανίχνευση παθογόνων

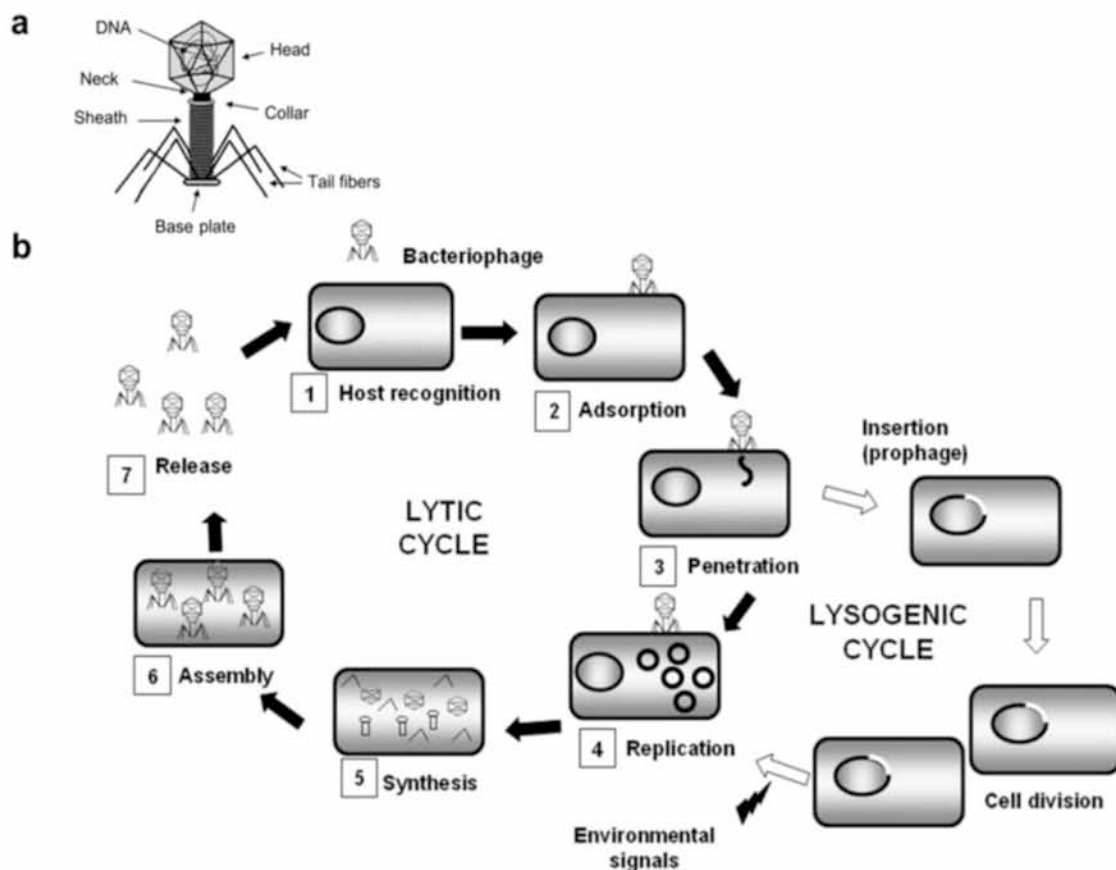
Η χρήση φάγων εφαρμόζεται στα τρόφιμα (σε όλα τα στάδια παραγωγής), στο νερό, στα φυτά και στην υγεία των ζώων. Ειδικότερα, οι βακτηριοφάγοι μπορούν να προστατέψουν τα ζώα από διάφορες ασθένειες. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απολύμανση- εξυγίανση επιφανειών, εξοπλισμού και ακατέργαστων προϊόντων. Ανεβαίνοντας την τροφική αλυσίδα οι φάγοι, με την ιδιότητα ως ‘φυσικών συντηρητικών’ μπορούν να παρατείνουν τον χρόνο ζωής ευπαθών τροφίμων. Τέλος, μπορούν σε συνδυασμό με άλλες επεξεργασίες ή μεθόδους συντήρησης να αποτελέσουν εμπόδιο για την ανάπτυξη αλλοιογόνων παθογόνων βακτηρίων (Garcia et al., 2008,2010).



Εικόνα 1: Χρήση φάγων σε όλα τα επίπεδα τροφικής αλυσίδας (Garcia et al., 2008).

Αποτελούνται από το γονιδίωμα, το καψίδιο και νουκλεϊκά οξέα που ‘περιβάλλονται’ από ένα στρώμα πρωτεΐνης. Οι περισσότεροι φάγοι έχουν DNA, ενώ άλλοι μονόκλωνο DNA ή μονόκλωνο RNA. Δυο κατηγορίες κύκλου ζωής

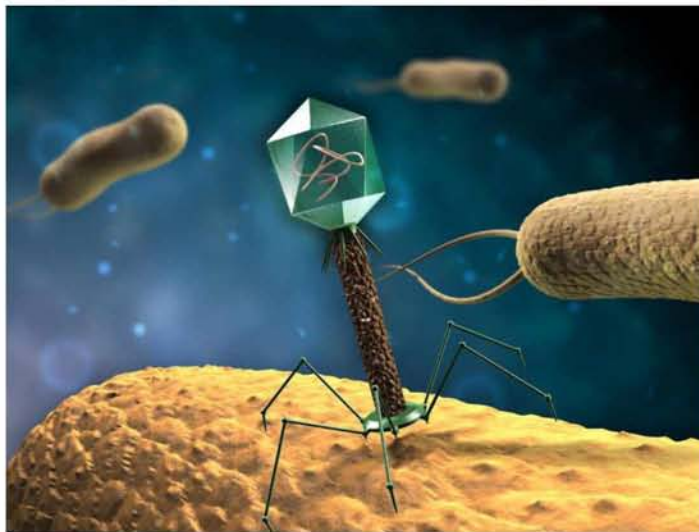
βακτηριοφάγων υπάρχουν, ο λυτικός και ο λυσιγονικός (παρατηρείται μόνο σε φάγους που το γενετικό υλικό τους είναι δίκλωνο DNA).



Εικόνα 2: α) δομή ενός βακτηριοφάγου με ουρά, β) λυτικός και ο λυσιγονικός κύκλος βακτηριοφάγου (Garcia et al., 2010)

Αρκετοί ερευνητές ασχολούνται με τους βακτηριοφάγους ως παράγοντες βιοσυντήρησης σε αλλοιώσεις και αυτό φαίνεται από τα άρθρα που δημοσιεύονται καθημερινά πάνω στο θέμα αυτό. Παρόλο που αποτελούν πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για ασφαλή τρόφιμα, η ακριβής γνώση της βιολογίας των βακτηριοφάγων πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο για να αποδειχτεί η ασφάλεια των 'βρώσιμων ιών', όπως έχουν χαρακτηριστεί, και να εφαρμοστεί η χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα που παρατηρήθηκε σε πειράματα στα εργαστήρια μπορεί να μην ανταποκρίνεται στις πραγματικές συνθήκες όπου εκτίθενται τα τρόφιμα καθώς ενδέχεται να παρεμποδίζονται από ανασταλτικούς παράγοντες όπως το pH. Υπάρχουν ακόμη θέματα ασφάλειας σχετικά με τη χρήση των φάγων που 'εμποδίζουν' την βιομηχανική τους εφαρμογή. Αναλυτικά, οι φάγοι

είναι μερικές φορές πολύ ειδικοί για τα βακτήρια στόχους τους. Ακόμη, μπορεί να προκύψει αντοχή των βακτηρίων στόχων κατά παρασκευασμάτων φάγου. Τέλος, οι φάγοι μπορούν να φέρουν γονίδια μολυσματικότητας αυξάνοντας έτσι την παθογένεια ενός βακτηρίου στόχου. Για τους λόγους αυτούς, η εφαρμογή των φάγων για ασφαλέστερα προϊόντα βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι οι φάγοι βρίσκονται σε φυσικά περιβάλλοντα και έχουν απομονωθεί από τροφές όπως χοιρινό, στρείδια, μύδια, μανιτάρια, γαλοπούλα, κοτόπουλο, τυρί, γιαούρτι θα πρέπει να συμβάλει στην εμπιστοσύνη των καταναλωτών ως προς την προσθήκη των φάγων στα τρόφιμα (García et al., 2010).



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση βακτηριοφάγου
(<http://www.deomedica.com/services/bacteriophage>)

1.4 Μικροοργανισμοί ανταγωνιστές σε τρόφιμα και φυτά

Είναι επιτακτική ανάγκη να βρεθούν εναλλακτικές λύσεις για την προστασία των τροφίμων από την αλλοίωση και τον περιορισμό παράλληλα της χρήσης χημικών προσθέτων και φυτοφαρμάκων λόγω των κινδύνων που αυτά εγκυμονούν για την υγεία και το περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό, η χρήση μικροβίων και μεταβολιτών τους είναι κατάλληλη εναλλακτική λύση για την αντικατάσταση των ουσιών αυτών και την προστασία των τροφίμων. Η χρήση τους βέβαια μπορεί να περιορίζεται υπό ορισμένες συνθήκες (Sharma et al., 2009).

Χαρακτηριστικά αναφέρεται η καταστροφή που προκαλείται από μύκητες σε σοδειές σιτηρών καθώς και φρούτα και λαχανικά κατά την αποθήκευση, γεγονός που πολλές φορές σχετίζεται και με τις μυκοτοξίνες που παράγουν. Η χρήση παρασιτοκτόνων είναι αναγκαίο να αντικατασταθεί με εναλλακτικούς τρόπους συντήρησης. Η διατήρηση με βακτήρια και ζύμες, σαν βιοπροστατευτικούς παράγοντες, έχει προταθεί σαν μια πολλά υποσχόμενη λύση (Ädel Druvefors, 2004).

Παράδειγμα βιοπροστατευτικού παράγοντα αποτελεί η μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την αναστολή ανάπτυξης των *P. digitatum* και *P. italicum* που προκαλούν σήψη. Χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη βακτηρίων (*Pseudomonas ceracia* και *Pseudomonas syringae*) και 2 ζύμες (*Debaryomyces hansenii* και *Aureobasidium pullulans*). Μόνο το βακτήριο *P.ceracia* προκάλεσε ζώνες αναστολής εναντίον των 2 μυκήτων στο PDA. Η *P.ceracia* είναι αποτελεσματικός παράγοντας βιο-ελέγχου στις φυτικές επιφάνειες, χάρη στις αντιβιοτικές ενώσεις που παράγει (Wilson and Chalutz, 1989).

Δράση

Ένας τρόπος δράσης των μικροβίων ανταγωνιστών είναι να παράγουν λυτικά ένζυμα όπως γλυκονάση, χιτινάση, και πρωτεϊνάσες που συμβάλλουν στη 'λύση' του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων μυκήτων. Έχει βρεθεί ότι συνδυασμοί α) μικροβίων ανταγωνιστών με χαμηλές ποσότητες μυκητοκτόνων και β) μικροβίων ανταγωνιστών με συνθετικά πρόσθετα όπως χλωριούχο ασβέστιο μπορούν να έχουν αξιολογικά αποτελέσματα (Ädel Druvefors, 2004).

1.4.1. Οι Ζύμες ως μικροβιακοί ανταγωνιστές

Προς τις αρχές της δεκαετίας του '90 μικροβιακοί ανταγωνιστές- ζύμες, αναφέρονταν για έλεγχο διαφόρων παθογόνων σε διάφορα φρούτα. Οι επικρατέστεροι εκπρόσωποι ζυμών είναι οι: *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia* που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα (Sharma et al., 2009, Ädel Druvefors, 2004).

Οι ζύμες αποτελούν σημαντικά συστατικά για ζυμώσεις στην επεξεργασία τροφίμων και ποτών εδώ και πολλά χρόνια. Διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην παρασκευή ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, καθώς και στην ωρίμανση ορισμένων τυριών και συνεισφέρουν ουσιαστικά στο τελικό προϊόν. Πρόσφατα αποδείχτηκε η δράση ανταγωνιστικών ζυμών (*Pichia anomala* και *Candida spp*) στη βιο-συντήρηση φυτικών προϊόντων μετά τη συγκομιδή (Sundh and Melin, 2010).

Μικροοργανισμοί ανταγωνιστές έχουν εισαχθεί τεχνητά σε φρούτα και λαχανικά για να αντιμετωπίσουν αλλοιώσεις. Παράδειγμα δράσης ανταγωνιστών είναι η αντιμετώπιση της σήψης φρούτων από τις εξής ζύμες: *Pichia guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Candida sake*, *Candida formata*, *Candida saitoana*, *Debaryomyces hansenii* και *Metschnikowia fructicola*. Οι ζύμες, ως μέρος των αλληλεπιδράσεων, είτε συμβάλλουν στη ζύμωση με την υποστήριξη των καλλιεργειών εκκίνησης, αναστέλλοντας τη δράση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που προκαλούν ποιοτικά ελαττώματα, είτε προστίθενται στο τελικό προϊόν για επιθυμητές βιοχημικές αλλαγές όπως η πρωτεολυτική, η λιπολυτική δραστηριότητα και η παραγωγή αρωματικών ενώσεων (Sundh and Melin, 2010).

Οι ζύμες εμφανίζουν ικανότητες όπως, ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες, ζύμωση της λακτόζης και αφομοίωση των οργανικών οξέων όπως γαλακτικό και κιτρικό οξύ, λιπολυτική και πρωτεολυτική δραστηριότητα, ανάπτυξη σε χαμηλή ενεργότητα νερού, ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και αντίσταση σε καθαριστικές ουσίες και απολυμαντικά. Γενικά οι ζύμες δεν είναι πιθανό να αποτελούν κανένα κίνδυνο για τον καταναλωτή, αν και ορισμένες ζύμες προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις σε ανθρώπους. Δεν αποτελούν κίνδυνο παραγωγής τοξινών ή спорίων. Απαντώνται με φυσικό τρόπο στα τρόφιμα. Πολλές ζύμες έχουν διμορφική ικανότητα, δηλαδή μπορούν να αναπτύσσονται και ως ζύμες αλλά και ως

νηματοειδείς μύκητες. Ακόμη, οι ζύμες έχουν γενικά απλές διατροφικές απαιτήσεις, μπορούν να καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Οι ζύμες μπορούν να αυξηθούν ραγδαία σε φθηνά υποστρώματα σε ζυμωτήρια και ως εκ τούτου, είναι εύκολο να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες. Τέλος, οι ζύμες επηρεάζονται λιγότερο από τα φυτοφάρμακα σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς (Sundh and Melin, 2010; Ädel Druvefors, 2004).

Οι ζύμες θεωρείται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μικροβιακοί ανταγωνιστές σε φρούτα και λαχανικά καθώς (α) μπορούν να επιβιώσουν για αρκετό διάστημα σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες που απαντώνται στην επιφάνεια φρούτων και λαχανικών (β) μπορούν να παράγουν εξωκυτταρικούς μεταβολίτες, οι οποίοι βοηθούν την ζύμη να επιβιώσει σε δυσμενείς συνθήκες αλλά και περιορίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροβίων και (γ) δεν παράγουν μυκοτοξίνες ή σπόρια ικανά για αλλεργίες (Sharma et al., 2009; Ädel Druvefors, 2004).

Έχει παρατηρηθεί ότι σε αποστειρωμένο γάλα, οι ζύμες αυξάνονται και φτάνουν σε υψηλούς πληθυσμούς, λόγω της απουσίας οποιασδήποτε ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας, ενώ στο νωπό γάλα η ανταγωνιστική αλληλεπίδραση που προκαλείται από τα ψυχρότροφα βακτήρια περιορίζει την ανάπτυξη της ζύμης. Η αμοιβαία ή συνεταιριστική αλληλεπίδραση, ωστόσο, είναι εμφανής σε περιβάλλοντα, όπως στα γιαούρτια και στα τυριά, την οποία και οι δύο πληθυσμοί ωφελούν (Viljoen, 2001).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ζύμη *Metschnikowia* έχει ανταγωνιστική δραστηριότητα προς νηματοειδείς μύκητες, βακτήρια και ζύμες. Το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* μπορεί να είναι αποτελεσματικό για την προστασία των μήλων, των ροδάκινων και των σταφυλιών από την σήψη που προκαλεί ο *Botrytis cinerea* και άλλα μετά τη συγκομιδή. Το είδος *Metschnikowia fructicola* είναι αποτελεσματικός παράγοντας βιοελέγχου για μετασυλλεκτικές ασθένειες των σταφυλιών. Ακόμη, η ζύμη αυτή μείωσε την πρόκληση σήψης σε φρούτα κατά 56-69% σε θερμοκήπια (Karabulut et al., 2010; Sipiiczki, 2006).

Υπάρχουν άλλωστε 3 εμπορικά προϊόντα βιοελέγχου από ζύμες διαθέσιμα στην αγορά για την καταπολέμηση μετασυλλεκτικών ασθενειών στα φρούτα.

- Το Aspire βασίζεται στη ζύμη *Candida oleophila* και χρησιμοποιείται με ψεκασμό ή εμβάπτιση κατά των ασθενειών μετά τη συγκομιδή σε μηλοειδή

και εσπεριδοειδή. Το προϊόν εισήχθη στο εμπόριο στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1996.

- Το εμπορικό προϊόν Yield Plus με *Cryptococcus albidus* που ως ενεργός ανταγωνιστής εισήχθη στο εμπόριο στην αγορά της Νοτίου Αφρικής το 1997 από τη εταιρεία Anchor. Το Yield Plus χρησιμοποιείται ως προϊόν βιολογικού ελέγχου εναντίον *Botrytis*, *Penicillium* και *Mucor* για τα μήλα και τα αχλάδια και είναι επίσης υπό αξιολόγηση για άλλες καλλιέργειες.
- Το πρόσφατο προϊόν Shemer, το οποίο καταχωρήθηκε στο Ισραήλ, βασίζεται σε μια νέα ταυτοποιούμενη ζύμη *Metschnikowia fructicola* και είναι αποτελεσματικό ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων του σταφυλιού, φράουλας και γλυκοπατάτας (Ädel Druvefors, 2004).

1.4.2. Τοξίνες ζυμών

Το φαινόμενο «ζύμη δολοφόνος» ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά πριν από 40 χρόνια από τους Makower και Beavan (1963). Παρατήρησαν ότι ορισμένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν τοξίνες που σκότωναν ευαίσθητα στελέχη του ίδιου είδους. Αρχικά, υποτέθηκε ότι ζύμες δολοφόνοι σκότωσαν μόνο ζυμομύκητες που ανήκουν στην ίδια ή στενά συναφή είδη. Ωστόσο, πολλές τοξίνες δολοφόνοι μπορεί να επηρεάσουν άλλες ζύμες ακόμα και βακτήρια ή νηματοειδείς μύκητες και θεωρούνται παράγοντας βιοελέγχου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μυκητο-ανασταλτικής ζύμης και παράλληλα παραγωγός τοξίνης αποτελεί η *P. anomala*. Ειδικότερα, η ζύμη *Pichia (Hansenula) anomala* βρέθηκε ότι εμποδίζει την ανάπτυξη του *Penicillium roqueforti* στο σιτάρι (Ädel Druvefors, 2004).

Η χρήση μικροοργανισμών ανταγωνιστών βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο και χρειάζεται να γίνουν πολλές έρευνες και εφαρμογές για να συνεχιστεί σε βιοτεχνολογική και βιομηχανική εφαρμογή (Trias, 2008).

1.5 Γαλακτικά βακτήρια (LAB)

Η ανταγωνιστική ικανότητα ορισμένων βακτηρίων έχει διαπιστωθεί εδώ και έναν αιώνα αλλά τα τελευταία χρόνια ελκύει ολοένα και περισσότερο την προσοχή των επιστημόνων, οι οποίοι αναζητούν νέους τρόπους όσο το δυνατόν πιο φυσικούς για την προστασία των τροφίμων από αλλοιώσεις (Soomro et al., 2002).

Ειδικότερα, τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria-LAB) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της έρευνας, αφού με την αντι-μικροβιακή δράση τους μπορούν να αντικαταστήσουν τα χημικά πρόσθετα, να αυξήσουν την ζωή στο ράφι ορισμένων προϊόντων και να αντιμετωπίσουν ορισμένους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Θεωρούνται γενικά ασφαλή (GRAS- Generally Recognized as Safe) για χρήση σε τρόφιμα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των ΗΠΑ (FAO) και την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) (Oliveira et al., 2013).

Είναι gram θετικοί κόκκοι ή ραβδιά, μη σπορογόνοι, αναερόβιοι και παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν τους. Μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία είναι οι: *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Οι δυο τελευταίοι μικροοργανισμοί εντάσσονται στην κατηγορία αυτή για το ρόλο τους στα προβιοτικά, παρόλο που δεν ανήκουν στα LAB αφού προέρχονται από την εντερική χλωρίδα του ανθρώπου. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι κυρίως μεσόφιλα αν και μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από 5-45 °C. Μπορούν να αναπτυχθούν σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον και έχουν μεγάλη λιπολυτική και πρωτεολυτική δραστηριότητα με αποτέλεσμα να μην προκαλούν αλλοιώσεις. Μπορούν να παράγουν πολλά προϊόντα ανάμεσα στα οποία είναι οργανικά οξέα, πεπτίδια κ.α. (Trias et al., 2008 ;Magnusson and Schnürer, 2001).

Χρησιμοποιούνται για βιο-προστασία επί μακρόν, τα τελευταία δε χρόνια η ενασχόληση με αυτά έχει πάρει τεράστιες διαστάσεις, καθώς παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες με τις οποίες μπορούν να αντικατασταθούν χημικά πρόσθετα, επεκτείνοντας το χρόνο ζωής και την ασφάλεια των τροφίμων. Ως πιθανοί παράγοντες βιο-ελέγχου τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία εμποδίων (Magnusson et al., 2003).

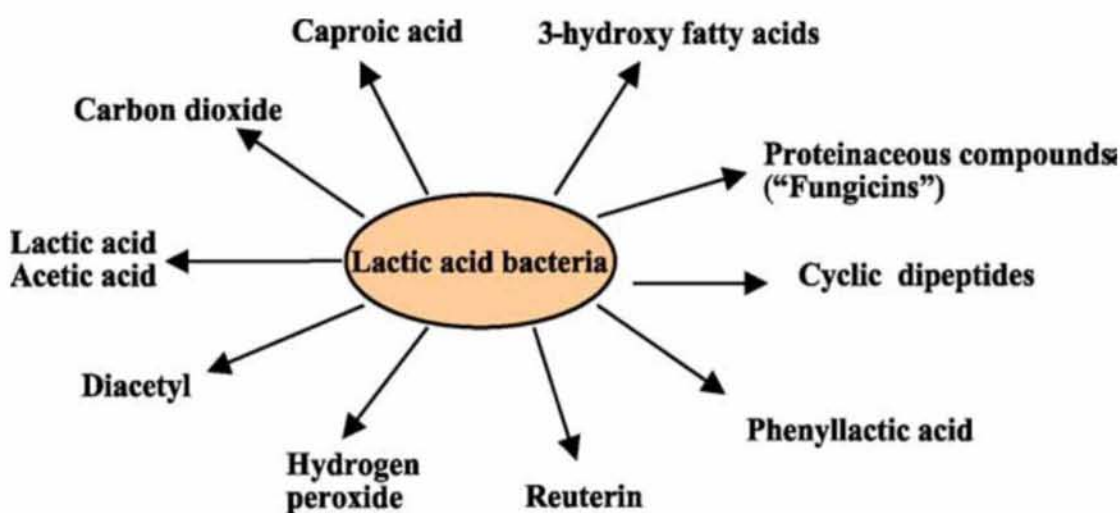
Τα LAB μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων για τον άνθρωπο, όπως: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, και *Staphylococcus aureus* (Trias et al., 2008).

Τα LAB μπορεί να εκδηλώσουν την ανταγωνιστική-αντιβακτηριακή τους ικανότητα όταν ανταγωνιστούν για θρεπτικά συστατικά, παράγοντας αντιμικροβιακές ουσίες όπως βακτηριοσίνες, οργανικά οξέα (κυρίως οξικό και γαλακτικό οξύ), διοξείδιο του άνθρακα, διακετύλιο, αιθανόλη, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ένζυμα (Tirloni et al., 2014; Trias, 2008).

1.5.1 Αντιμικροβική δράση ορισμένων μεταβολιτών των γαλακτικών βακτηρίων (LAB):

- Ανάμεσα στις ουσίες που παράγουν είναι τα οργανικά οξέα που έχουν ανταγωνιστική δράση απέναντι σε ζύμες, βακτήρια και μύκητες, μειώνοντας το pH.
- Παράγουν με την παρουσία O₂ υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), αναστέλλοντας τη δράση μυκήτων και βακτηρίων, καθώς έτσι εκτός από την μείωση του pH, δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες. Ειδικότερα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου καταστρέφει τις μοριακές δομές των κυτταρικών πρωτεϊνών του βακτηριακού κυττάρου προκαλώντας οξείδωση.
- Λιπαρά οξέα (από *Lactobacillus plantarum*) και κυκλικά διπεπτίδια έχουν αντιμυκητιακή δράση.
- Το διακετύλιο, χαρίζει χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση βουτύρου και είναι γνωστή για την αντιβακτηριακή δράση.
- Ρετουρίνη (reuterin) είναι δραστικό έναντι αρκετών διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων. Αντιμυκητιακή δράση παρουσιάστηκε στα είδη *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* και *Fusarium* (Trias, 2008; Schnürer and Magnusson 2005; Jay, 1982).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, τα 13 από τα 18 στελέχη των LAB που μελετήθηκαν, έδειξαν να έχουν αντιμυκητιακή δράση, η οποία δεν οφειλόταν μόνο στο χαμηλό pH, αλλά και στις ενώσεις που παράγαν. Οι ενώσεις αυτές είναι ικανές να αντιμετωπίσουν τροφογενείς μύκητες και ζύμες και φάνηκε να παραμένουν σταθερές μετά από θέρμανση, ενώ τα στελέχη προκαλούν ζώνες αναστολής, με το pH, να παίζει σημαντικό ρόλο στην δραστηκότητά τους (De Muyncka et al., 2004).



Εικόνα 4: Αντιμυκητιακές ενώσεις που παράγουν τα LAB (Schnürer and Magnusson, 2005).

1.5.2 Ρετουρίνη (reuteirin 3-HPA, 3-hydroxypropionaldehyde)

Η ρετουρίνη είναι μία ευρέως φάσματος αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από ορισμένα στελέχη του *Lactobacillus reuteri* κατά την αναερόβια ζύμωση της γλυκερίνης. Είναι μια χαμηλού μοριακού βάρους ουσία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων. Η ρετουρίνη είναι υδατοδιαλυτό, που δραστηριοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH και ανθεκτική σε πρωτεολυτικά και λιπολυτικά ένζυμα. Η πιθανή χρήση της ρετουρίνης έχει διερευνηθεί σε γάλα, τυρί και κρέας (Guo et al., 2011; Magnusson et al., 2003).

Η ουσία αυτή είναι δραστική έναντι αρκετών διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μυκήτων. Έχει αναφερθεί βακτηριοκτόνος δράση εναντίον της *L. monocytogenes* και *Escherichia coli* O157: H7 στο γάλα και το τυρί cottage ενώ έδειξε αντιμυκητιακή δράση έναντι των ειδών της *Candida*, *Torulopsis*,

Saccharomyces, *Aspergillus* και *Fusarium*, ωστόσο, λίγα δεδομένα υποστηρίζουν τον ισχυρισμό ότι είναι μια ευρέως φάσματος αντιμυκητιακή ουσία (Arques et al., 2007; Magnusson et al., 2003; Rodríguez et al., 2003).

1.6 Ψευδομονάδες

Τα τελευταία χρόνια τα χημικά φυτοφάρμακα υφίστανται αυστηρή κριτική εξαιτίας των επιπτώσεων που έχουν στο περιβάλλον, στην υγεία των καταναλωτών και για το λόγο αυτό υπάρχει ανάγκη για εναλλακτική στρατηγική για την πρόληψη των ασθενειών της ρίζας του φυτού με ένα βιολογικό παράγοντα. Άλλωστε, ακόμη και ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO, World Health Organization) απαγόρευσε την χρήση αρκετών φυτοφαρμάκων εξαιτίας της τοξικότητας και της ρύπανσης που προκαλούν. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχει υιοθετηθεί η χρήση ορισμένων ωφέλιμων στελεχών του *Pseudomonas* και ιδιαίτερα φθοριζουσών ψευδομονάδων ως παράγοντας γεωργικού βιοέλεγχου σε καλλιέργειες για την αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων μυκήτων, καθώς εκτός των άλλων προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. Ο βιοέλεγχος των φυτών με μικροοργανισμούς αποτελεί μια εναλλακτική και οικολογική λύση με χαμηλό κόστος (Satish et al., 2007; Vincent et al., 1991; Lim et al., 1990).

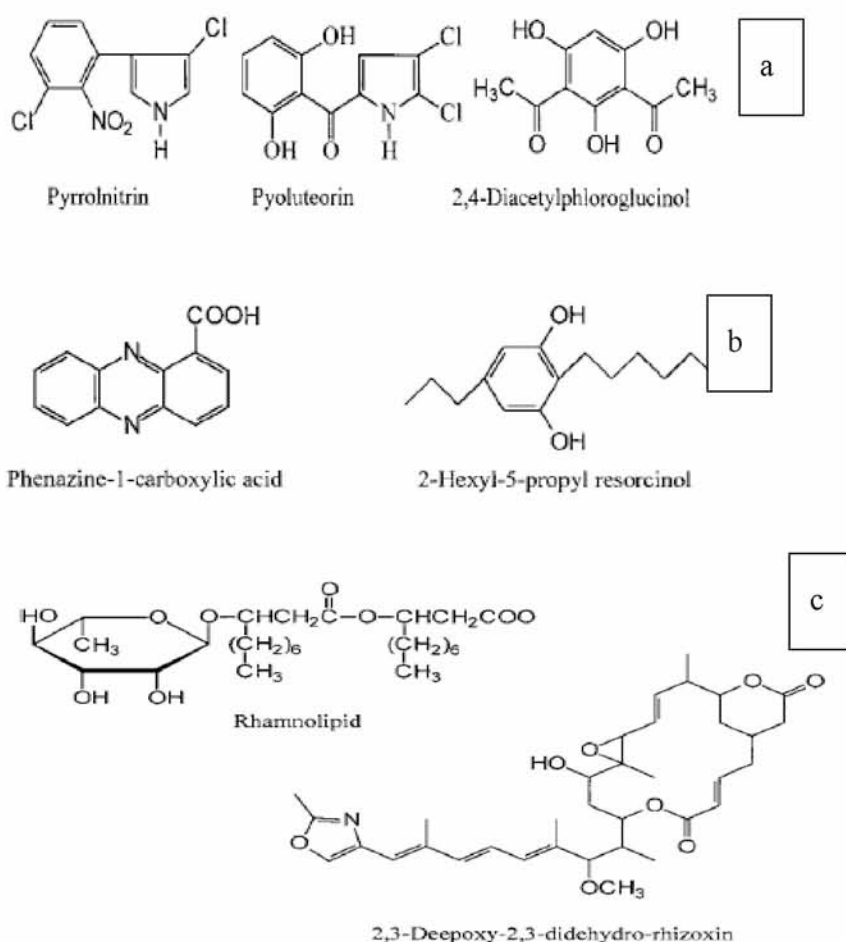
Μια σημαντική κατηγορία βακτηριακών ειδών του γένους *Pseudomonas*, τα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες, καταστέλλοντας την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Τα βακτήρια αυτά δρουν παράγοντας κάποιες μυκοστατικές ή μυκοτοξικές ουσίες καθώς και με τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία. Απαραίτητα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ένα τέτοιο βακτήριο είναι η δυνατότητα αποικισμού στις ρίζες καθώς και να βοηθούν στην ανάπτυξη και να προάγουν τον βιοέλεγχο (Kranchenko et al., 2003; Ramamoorthy et al., 2001).

Η γνώση των μηχανισμών δράσης των φθοριζουσών ψευδομονάδων με τους οποίους επιτυγχάνεται ο βιολογικός έλεγχος των φυτών δεν έχει ακόμη βρεθεί και μελετάται. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι ορισμένα στελέχη, παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες (Εικόνα 5) οι οποίοι έδειξαν αντιμυκητιακή δράση in vitro

έναντι φυτοπαθογόνων. Έτσι, μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιολογικά φυτοφάρμακα για να μειωθεί η χρήση των χημικών φυτοφαρμάκων στη γεωργία (Liu et al., 2007).

Με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών -αντιβιοτικών από φθορίζουσες ψευδομονάδες, όπως *Pseudomonas aureofaciens*, που έχει μελετηθεί in vitro, αντιμετωπίζονται διάφορες ασθένειες των φυτών- ριζών τους όπως του σιταριού. Ακόμη, αντιβακτηριακή δράση έχει παρατηρηθεί από το μεταβολίτη πυοκυανίνη του μικροοργανισμού *Pseudomonas aeruginosa* (Kerr et al., 1999; Vincent et al., 1991).

Το εμπορικό σκεύασμα που παράγεται από το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* στέλεχος A506 είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο προϊόν που χρησιμοποιείται ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου (Blight Ban A506; Nufarm Americas Inc., SugarLand, TX) το οποίο χρησιμοποιείται για την καταστολή της ασθένειας του βακτηριακού καψίματος στα μήλα και στα αγγούρια (Temple et al., 2004).



Εικόνα 5: Μεταβολίτες που παράγονται από τις *Pseudomonas* sp οι οποίοι έχουν αντιμυκητιακές ιδιότητες και σχετίζονται με την βιοπροστασία (a,b,c) (Ligon et al., 2000).

1.7 Παράγωγα μικροοργανισμών (αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ουσίες)

1.7.1 Βακτηριοσίνες

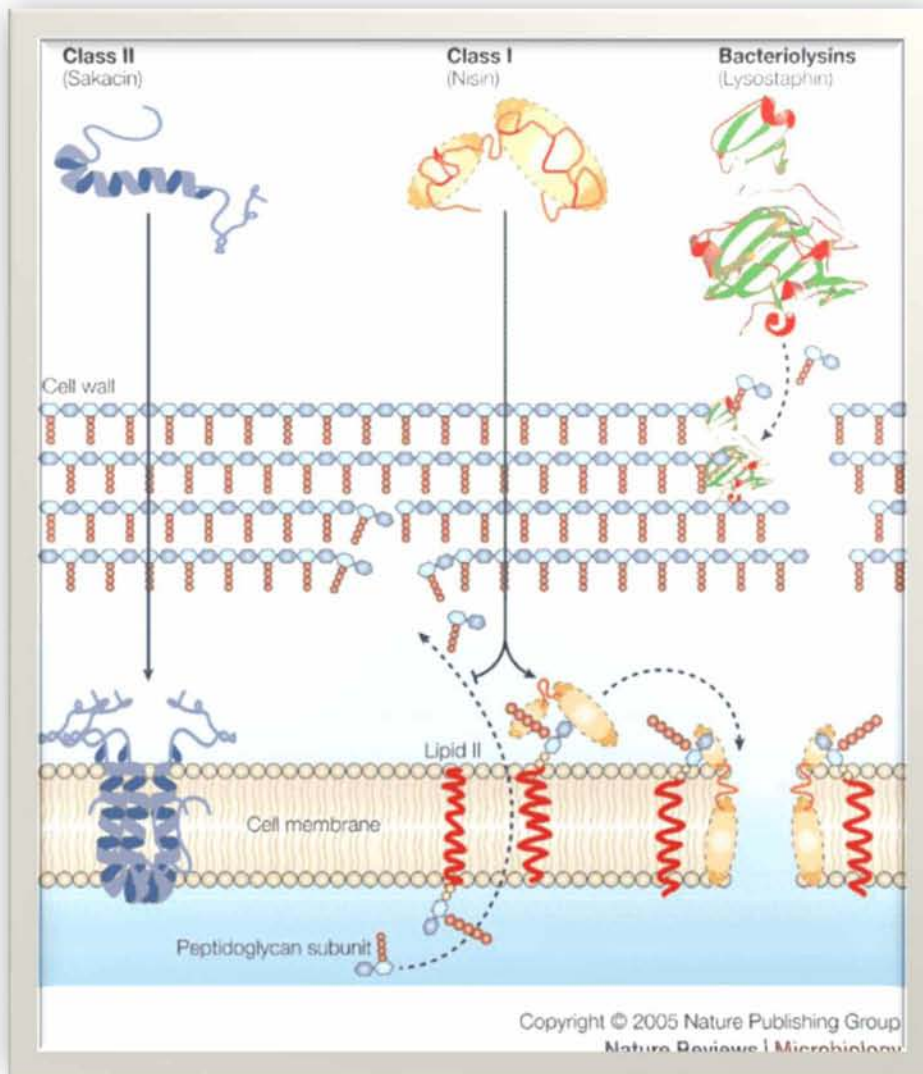
Αρκετοί μελετητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους και τις έρευνές τους προς τις βακτηριοσίνες καθώς οι ουσίες αυτές έχουν βιοπροστατευτική δράση και μπορούν να δράσουν εναντίον των τροφογενών βακτηρίων (Soomro et al., 2002).

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεΐνες ή μικρά πολυπεπίδια που παράγονται από βακτήρια (Πίνακας 1), και είναι αντιβακτηριακές και τοξικές έναντι βακτηρίων που έχουν στενή σχέση με το στέλεχος που τις παράγει, με ορισμένες εξαιρέσεις. Χρειάζονται άνθρακα, άζωτο, φώσφορο και μπορούν να χρησιμοποιήσουν υδατάνθρακες από διαφορετικές πηγές για την ανάπτυξή τους (Bakkal et al., 2012; Trias, 2008).

Οι βακτηριοσίνες (νισίνη, πεδιοσίνες, κουρβασίνη, ρευτερίνη, σακασίνη,σαμπτιλίνη) συχνά παράγονται από Gram-αρνητικά, Gram-θετικά βακτήρια, υπό συνθήκες στρες, όπως ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών και ο υπερπληθυσμός (Εικόνα 6). Είναι πολλά υποσχόμενες ουσίες. Συγκεκριμένα, οι Gram αρνητικές βακτηριοσίνες όπως colicins, μπορούν να έχουν εφαρμογή στη ιατρική, ενώ οι Gram θετικές βακτηριοσίνες όπως η νισίνη στα τρόφιμα ως συντηρητικά. Οι βακτηριοσίνες αναστέλλουν την ανάπτυξη των *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus spp.* και *Enterococcus spp.*

Οι έρευνες δείχνουν ότι η εφαρμογή των βακτηριοσινών στην παραγωγή τροφίμων (Πίνακας 2) έχει πολυάριθμα πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών διαδικασιών, όπως:

- α) Αυξημένη διάρκεια ζωής των τροφίμων
- β) Πρόσθετη προστασία των προϊόντων σε ανεπιθύμητες συνθήκες αποθήκευσης
- γ) Μειωμένος κίνδυνος της μεταφοράς παθογόνων
- δ) Μείωση των οικονομικών απωλειών που οφείλονται σε αλλοίωση
- ε) Μειωμένη χρήση χημικών συντηρητικών
- στ) Χρήση των χαμηλότερων θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια των διαδικασιών επεξεργασίας τροφίμων, διατηρώντας έτσι τη θρεπτική αξία και τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων
- ζ) Διαθεσιμότητα νέων προϊόντων με χαμηλότερη οξύτητα, χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες μελετούνται εκτενώς τα τελευταία χρόνια και αποτελούν εναλλακτική λύση για την προστασία ορισμένων τροφίμων, ειδικά αν συνδυαστούν με φυσικούς προστάτες, ωστόσο δεν είναι η λύση για όλα τα θέματα ασφάλειας τροφίμων που προκύπτουν. Αναμφισβήτητα, πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες για τη δράση, τις δυνατότητες και το πεδίο εφαρμογής των βακτηριοσινών (Deegan et al., 2006).

Η νομοθεσία δεν είναι σαφής με τις βακτηριοσίνες και τα βακτήρια που τις παράγουν. Το γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ασφαλή για χρήση σε ζυμούμενα προϊόντα δεν συνεπάγεται ότι είναι ασφαλή και για άλλα προϊόντα που δεν θα υποστούν ζύμωση (Montville and Matthews, 2013).

1.7.2 Νισίνη

Η νισίνη, η κύρια βακτηριοκίνη από *Lactobacillus lactis*, ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Rogers και την ομάδα του και δρα εναντίον των *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus* και *Clostridium*. Η νισίνη χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων αφού περιορίζει την αλλοίωση τυριών από κλωστρίδια, αναστέλλει την ανάπτυξη ψυχρότροφων βακτηρίων σε τυρί cottage, επεκτείνει την διάρκεια ζωής του γάλακτος σε θερμά κλίματα, προστατεύει κονσερβοποιημένα τρόφιμα από αλλοίωση κλωστρίδιων και βακίλλων. Η χρήση της στα τρόφιμα έχει επιτραπεί στην Αμερική και τη Ευρώπη με το όνομα nisaplin. (Arques et al., 2007; Rodriguez et al., 2003; Soomro et al., 2002).

Η νισίνη (E234) είναι μη τοξική και αποτελείται από συγγενή πολυπεπτίδια που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια. Είναι ένα συντηρητικό τροφίμων που εμφανίζει αντιμικροβιακή δραστικότητα έναντι ευρέος φάσματος Gram-θετικών βακτηριδίων, αλλά παρουσιάζει μικρή ή καθόλου δραστικότητα έναντι Gram-αρνητικών βακτηριδίων, ζυμών και μυκήτων. Είναι σταθερή στη θέρμανση και χρησιμοποιείται σε μεγάλο αριθμό τροφίμων που υφίστανται θερμική επεξεργασία. Επίσης, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα αντιμικροβιακά, όπως βενζοϊκά ή σορβικά. Χαρακτηρίζεται GRAS και βρίσκει εφαρμογή στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στη μαγιονέζα, σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα βρεφικές τροφές, ακόμα και σε τρόφιμα με τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Τα επίπεδα στα οποία μπορεί να χρησιμοποιείται κυμαίνονται στην περιοχή 2,5 έως 100 ppm (Kallinteri et al., 2013; Pintado et al., 2009).

Πίνακας 1: Παραδείγματα βακτηριοσινών που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα (Cleveland et al., 2001)

Πηγή	Στέλεχος	Δράση ενάντια
Εμπορικό προβιοτικό προϊόν	<i>Streptococcus</i> sp. CNCM I-841	<i>Clostridium</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
Βουλγάριο κίτρινο τυρί	<i>Lactob. delbrueckii</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Ent. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Λαχανικά	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>C. Botulinum</i>
Ραπανάκια	<i>Lac. lactis</i> sup sp. cremoris R	<i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , and <i>Leuconostoc</i> spp.
Σαλάτα “Waldorf”	<i>Lactob. plantarum</i> BFE905	<i>L. monocytogenes</i>
Γαλλικό μαλακό τυρί ωρίμανσης με μούχλα	<i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	<i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i> , and <i>Enterococcus</i> spp.
Βλαστάρια φασολιών	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (NisZ)	<i>L. monocytogenes</i> Scott A
Τυρί Munster	<i>Lactob. plantarum</i> WHE92 (Ped Ach)	<i>L. monocytogenes</i>
Χαλασμένο ζαμπόν	<i>C. piscicola</i> JG126	<i>L. monocytogenes</i>
Παραδοσιακό Γαλλικό τυρί	<i>Ent. faecalis</i> EFS2	<i>L. innocua</i>
Ξερά αλλαντικά	<i>Lactob. plantarum</i> UG1	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sporogenes</i>
Ιρλανδικό κεφίρ	<i>Lac. lactis</i> DPC3147	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.
Ξερά ζυμούμενα αλλαντικά	<i>Lac. lactis</i> (NisA)	<i>L. monocytogenes</i>
Ζυμούμενα αλλαντικά	<i>Lactob. plantarum</i> SA6	<i>Lactobacillus</i> spp.
Τυρί με κρούστα	<i>Brevibacterium lines</i> M18	<i>Listeria</i> and <i>Corinebacterium</i> spp.
Κρέας	<i>Leuconostoc carnosum</i> Ta11A (LeuA)	<i>L. monocytogenes</i>

Ζύμες	Lactob. bavaricus (bavA)	L. monocytogenes
Τυρόγαλο	Ent. faecalis 226	L. monocytogenes
Κατσικίσιο γάλα	Leu. mesenteroides Y105	L. monocytogenes
Sauerkraut	Lac. lactis subsp. lactis (Nis)	L. monocytogenes

Πίνακας 2: Οι βακτηριοσίνες ως συντηρητικά τροφίμων (Cleveland et al., 2001)

Βακτηριοσίνη	Εφαρμογές	Συμπεράσματα
Nisin A	Incorporation of nisin into a meat binding system (Fibrimex)	Addition of nisin can reduce undesirable bacteria in restructured meat products
Pediocin AcH	Use of a pediocin AcH producer <i>Lactob. plantarum</i> WHE 92 to spray on the Munster cheese surface at the beginning of the ripening period	Spray prevents outgrowth of <i>L. monocytogenes</i> and can be used as an antilisterial treatment
Enterocin 4	Use of an enterocin producer <i>Ent. faecalis</i> INIA4 as a starter culture for production of Manchego cheese	Use of an <i>Ent. faecalis</i> INIA4 starter inhibits <i>L. monocytogenes</i> Ohio, but not <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Linocin M-18	Use of <i>Bre. lines</i> as a starter culture for production of red smear cheese	Causes 2 log reduction of <i>L. ivanovi</i> and <i>L. monocytogenes</i>
Nisin A	Use of nisin to control <i>L. monocytogenes</i> in ricotta cheese	Nisin effectively inhibits <i>L. monocytogenes</i> for 8 weeks
Piscicolin 126	Use of piscicolin 126 to control <i>L. monocytogenes</i> in devilled ham paste	More effective than commercially available bacteriocins
Leucocin A	Use of a leucocine-producing <i>Leu. gelidum</i> UAL187 to control meat spoilage	Inoculation of a vacuum packed beef with the bacteriocin-producer delays the spoilage by <i>Lactob. sake</i> for up to 8 weeks
Lactocin 705	Use of lactocin 705 to reduce growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef	Lactocin 705 inhibits growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef
Pediocin AcH	Use of the pediocin producer <i>P. acidilactici</i> to inhibit <i>L. monocytogenes</i>	<i>P. acidilactici</i> (Ped+) starter culture contributes to effective reduction of <i>L. monocytogenes</i> during manufacture of chicken summer sausage
Pediocin	Expression of pediocin operon in <i>Sac. cerevisiae</i>	Potential application in preserving wine and baked

		products
Pediocin AcH	Add pediocin preparation to raw chicken	Controlled growth of <i>L. monocytogenes</i> at 5 °C for 28 days
Pediocin PA-1	Use of <i>P. acidilactici</i> (Ped+) strain as a starter culture in sausage fermentation	Pediocin effectively contributes to inhibition of <i>L. monocytogenes</i>
Enterocin	Add enterocin to inoculated ham, pork, chicken breast, pate, sausage	Controlled growth of <i>L. monocytogenes</i> under several conditions

1.8 Χιτινάσες

Χιτινάσες είναι υδρολάσες (λυτικά ένζυμα), οι οποίες καταλύουν την αποικοδόμηση της χιτίνης. Αυτά τα ένζυμα είναι παρόντα σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, έντομα, φυτά και ζώα. Χιτινάσες είναι συστατικά διαφόρων βακτηριακών ειδών μερικές από τις πιο γνωστές περιλαμβάνουν την *Aeromonas*, *Serratia*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Streptomyces*, και γένη *Bacillus* καθώς και φθορίζουσες ψευδομονάδες. Είναι πιθανοί παράγοντες για το βιολογικό έλεγχο-προστασία σοδειών από ασθένειες που προκαλούνται από διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες. Η αναστολή ανάπτυξης μυκήτων από χιτινάσες έχει αποδειχτεί σε πολλές έρευνες (Hoster et al., 2004; Herrera and Chetz, 1999).

Κάποιες χιτινάσες που παράγονται από φθορίζουσες ψευδομονάδες, χρησιμοποιούνται για την προστασία σοδειών από ασθένειες που οφείλονται σε μικροοργανισμούς. Τα ένζυμα αυτά αναστέλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων με υδρόλυση της χιτίνης που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. Τα βακτήρια αυτά με την παραγωγή των ενζύμων αυτών θεωρούνται αποτελεσματικοί ανταγωνιστές απέναντι σε μύκητες και για αυτό έχουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Singh et al., 2005; Hoster et al., 2004; Herrera and Chetz, 1999).

Παραδείγματα εφαρμογών μικροοργανισμών και μεταβολιτών τους σε τρόφιμα

Παρακάτω στον Πίνακα 3 περιγράφονται συνοπτικά κάποια παραδείγματα εφαρμογών μικροοργανισμών και μεταβολιτών τους στην βιοπροστασία φυτών και τροφίμων.

Πίνακας 3: Παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τρόφιμα από μικροοργανισμούς ανταγωνιστές ή παράγωγά τους

Μικροοργανισμός ανταγωνιστής/ ένωση	Μικροοργανισμός στόχος	Εφαρμογή σε τρόφιμα	Πηγή
<i>P. anomala</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	Σιτηρά	Resa et al., 2013
<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	Σιτηρά	Trias, 2008
<i>Trichoderma spp</i>	<i>Botrytis</i>	Φράουλες	Sharma et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> και <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Penicillium italicum, Penicillium digitatum</i>	Εσπεριδοειδή	Sharma et al., 2009
<i>Burkholderia cepacia</i> (πυρολνιτρίνη)	<i>Botrytis cinerea</i> και <i>Penicillium expansum</i>	Μήλα	Sharma et al., 2009
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>E.coli</i>	Μήλα	Trias et al., 2008
<i>Candida sp.</i> , <i>Metschnikowia sp</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. enterica</i>	Μήλα	Trias et al., 2008
<i>D. hansenii</i>	<i>Clostridium</i>	Τυριά, Αλλαντικά	Wilson et al., 1989
Νισίνη	<i>Bacillus spp</i> και <i>Clostridium spp</i>	Κονσερβοποιημένα τρόφιμα	Deegan et al., 2006
<i>Pichia anomala</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	Σιτηρά	Ädel Druvefors, 2004
<i>Cryptococcus</i>	Μύκητες	Αχλάδια, μήλα	Ädel Druvefors, 2004

Κεφάλαιο 2^ο: Εισαγωγή στις *Pseudomonas*

2.1 Ονοματολογία - Ταξινόμηση

Η οικογένεια των *Pseudomonadaceae* περιλαμβάνει μια ευρεία ποικιλία Gram αρνητικών βακτηρίων. Ο καθηγητής Walter Migula του ινστιτούτου Karlsruhe στην Γερμανία το 1894 περιέγραψε και ταξινόμησε για πρώτη φορά τα βακτήρια του γένους των *Pseudomonas* (Εικόνα 7) και ήταν αυτός που έδωσε σε αυτό το γένος βακτηρίων το όνομα *Pseudomonas*. Αργότερα η ετυμολογία αυτού του ονόματος δόθηκε στην 7^η έκδοση του εγχειριδίου Systemic Bacteriology (Συστηματική Μικροβιολογία) το οποίο γράφτηκε από τον Bergey. Η ονομασία *Pseudomonas* είναι μια σύνθετη λέξη η οποία προέρχεται από τον συνδυασμό των λέξεων Pseude και monas που έχουν ελληνική προέλευση και σημαίνουν Pseude=ψευδής και monas=μονάδα. Η ετυμολογία της ονομασίας της ψευδομονάδας μαρτυρά το γεγονός ότι οι ψευδομονάδες είναι βακτηρίδια διατεταγμένα κατά μονάδες ή κατά ζεύγη.

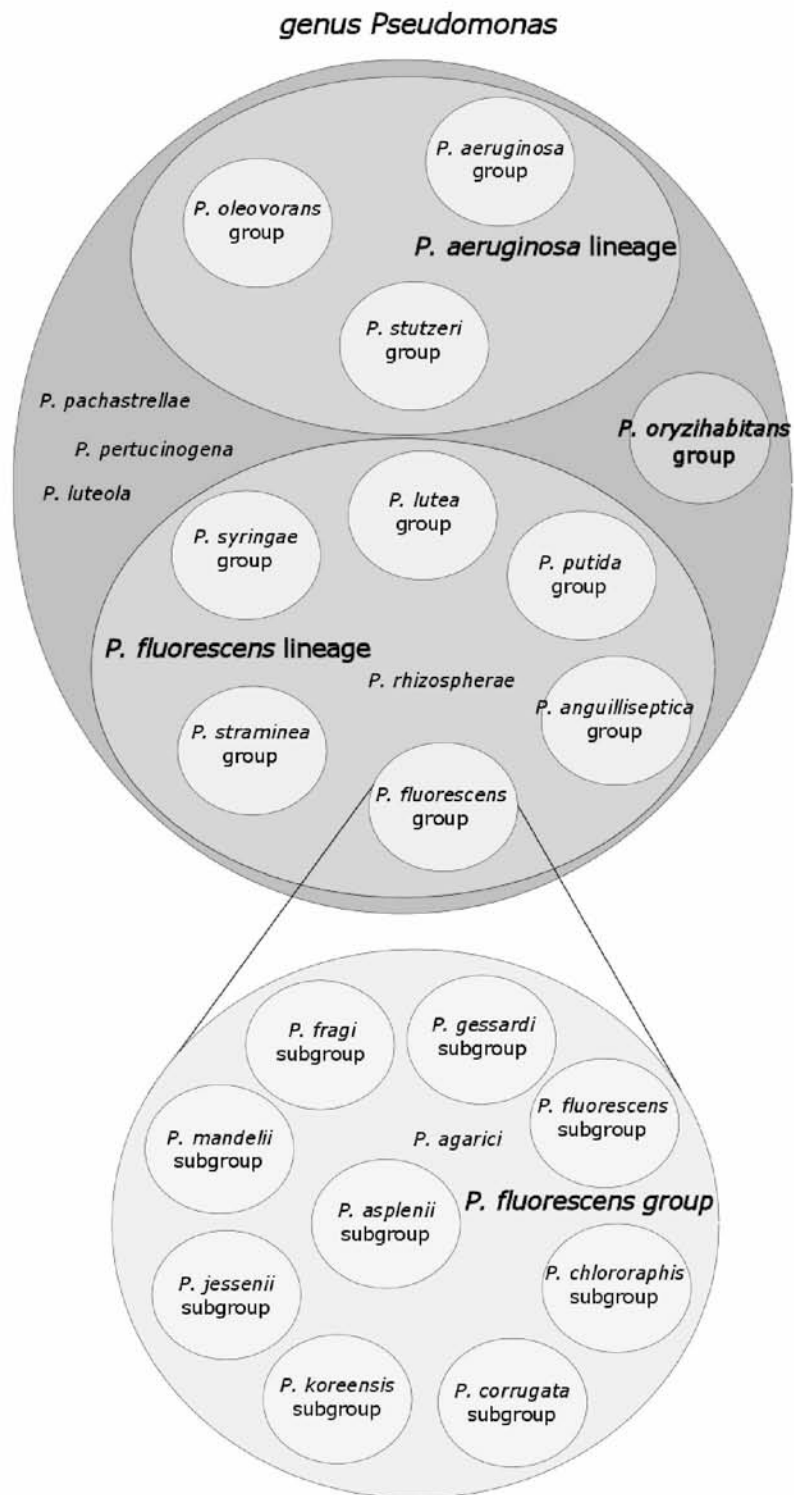
Όπως διαπιστώνουμε και από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακα 4), το γένος *Pseudomonas* χαρακτηρίζεται ως rRNAGroup (Ομάδα) I, και αυτή η ομάδα χωρίζεται σε επιμέρους ομάδες ανάλογα με τις ιδιότητες των διαφόρων ειδών. Η πρώτη ομάδα ονομάζεται Fluorescent Group (Φθορίζουσα ομάδα) καθώς τα είδη της έχουν την ικανότητα να φθορίζουν κάτω από υπεριώδες φως με μήκος κύματος 400nm, εξαιτίας της χρωστικής πυοβερντίνης που παράγουν. Σε αυτήν την ομάδα μόνο η *Pseudomonas aeruginosa* έχει την ικανότητα να παράγει την υδατοδιαλυτή κυανή χρωστική πυοκυανίνη. Η δεύτερη ομάδα ονομάζεται Stutzeri Group και αποτελείται από είδη τα οποία έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες σε υλικά παρουσία νιτρικών αλάτων και παράγοντας οξειδίου του αζώτου. Η τρίτη και τελευταία ομάδα η οποία ονομάζεται Alcaligenes Group και περιλαμβάνει είδη που δεν έχουν την ικανότητα να διασπούν την γλυκόζη οξειδωτικός (Koneman et al., 1997).

Πίνακας 4: Ταξινόμηση της οικογένειας *Pseudomonadaceae*

<p>rRNA Group I</p> <p><i>Fluorescent Group</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Pseudomonas putida</i></p> <p><i>Stutzeri Group</i></p> <p><i>Pseudomonas stutzeri</i></p> <p><i>Pseudomonas mendocina</i></p> <p>CDC Group Vd-3</p> <p><i>Alcaligenes Group</i></p> <p><i>Pseudomonas alcaligenes</i></p> <p><i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i></p> <p><i>Pseudomonas species group 1</i></p> <p>rRNA Group II</p> <p><i>Pseudomallei Group</i></p> <p><i>Burkholderia mallei</i></p> <p><i>Burkholderia pseudomallei</i></p> <p><i>Burkholderia cepacia</i></p> <p><i>Burkholderia gladioli</i></p> <p><i>Burkholderia pickettii</i></p>	<p>rRNA Group III</p> <p><i>Acidovorans Group</i></p> <p><i>Comamonas acidovorans</i></p> <p><i>Comamonas terrigena</i></p> <p><i>Comamonas testosterone</i></p> <p><i>Facilis-delafieldii Group</i></p> <p><i>Acidovorax delafieldii</i></p> <p><i>Acidovorax facilis</i></p> <p><i>Acidovorax temperans</i></p> <p>rRNA Group IV</p> <p><i>Diminuta Group</i></p> <p><i>Brevundimonas diminuta</i></p> <p><i>Brevundimonas vesicularis</i></p> <p>rRNA Group V</p> <p><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></p> <p>Unknown Nucleic Acid Homology</p> <p><i>Chryseomonas luteola</i></p> <p><i>Flavimonas oryzihabitans</i></p> <p><i>Sphingomonas paucimobilis</i></p> <p><i>Shewanella putrefaciens</i></p> <p><i>Pseudomonas-like group 2</i></p> <p>CDC group WO-1</p>
---	---

2.2.1 Δομή-Φυσιολογία

Οι ψευδομονάδες είναι Gram-αρνητικά βακτήρια διατεταγμένα κατά μονάδες ή κατά ζεύγη, δεν σχηματίζουν σπόρους, είναι κινητά χάρη στις πολικές βλεφαρίδες από τις οποίες αποτελούνται, έχουν σχήμα ραβδοειδές, ευθύ ή ελαφρώς καμπυλωτό. Δεν έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν, διασπών την γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες οξειδωτικά, δηλαδή με την διαδικασία του αναπνευστικού μεταβολισμού χρησιμοποιώντας το οξυγόνο σαν αποδέκτη ηλεκτρονίων και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται η ανάπτυξη τους ως υποχρεωτικά αερόβια. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιήσουν σαν αποδέκτη ηλεκτρονίων τα νιτρικά ή την αργινίνη και τότε η ανάπτυξη τους χαρακτηρίζεται αναερόβια. Αναπτύσσονται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον με pH 4,5. Εντοπίζονται στο έδαφος αλλά και σε υδάτινα περιβάλλοντα. Μολύνουν, αποικίζουν παροδικά και προκαλούν νόσο σε φυτά και ευκαιριακές νόσους σε ανθρώπους και ζώα. Τα είδη που προκαλούν λοίμωξη στον άνθρωπο είναι τα εξής: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas acidovorans*, *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. mallei*, *P. Pseudomallei* (Tümmler et al., 2014). Από αυτά, το είδος *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κυριότερο αίτιο πρόκλησης λοιμώξεων στον άνθρωπο. Άλλα στελέχη είναι φυτοπαθογόνα όπως για παράδειγμα *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae* ενώ κάποια άλλα είναι παθογόνα για τα ζώα κυρίως για τα πουλιά και τα ψάρια *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Peix et al., 2009) Τέλος, κάποιες ψευδομονάδες είναι γνωστές για τις αλλοιώσεις που προκαλούν στα τρόφιμα όπως για παράδειγμα είναι η *Pseudomonas fluorescens* η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση ωμών ψαριών, κρέατος και αυγών αλλά και γαλακτοκομικών προϊόντων εξαιτίας του ψυχρότροφου χαρακτήρα τους (Palleroni, 2010; Jay, 2003).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των ομάδων και υποομάδων του γένους *Pseudomonas* (Mulet et al., 2010).

2.2 *Pseudomonas* και βιοπροστασία

Pseudomonas aeruginosa

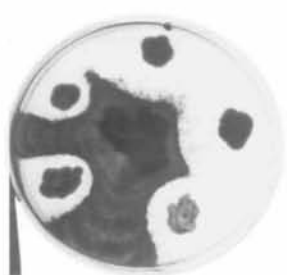
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κυριότερο αίτιο πρόκλησης λοιμώξεων στον άνθρωπο. Ο Sedillot το 1850 ήταν ο πρώτος που παρατήρησε ότι ο χρωματισμός με μπλε χρώμα των χειρουργικών επιδέσμων για τα τραύματα οφείλονταν σε έναν μεταδιδόμενο παράγοντα. Το χρώμα που ήταν το αίτιο για τον μπλε χρωματισμό εκχυλίστηκε από τον Fordos το 1860 και το 1862 ο Lucke ήταν ο πρώτος που παρατήρησε ότι αυτός ο χρωματισμός συσχετίζεται με ραβδοειδής στο σχήμα οργανισμούς. Ο Carle Gessard το 1882 ανέφερε στην δημοσίευσή του με τίτλο “On the Blue and Green Coloration of Bandages” την ανάπτυξη και απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια ενός οργανισμού που απομονώθηκε από δερματικά τραύματα δυο ασθενών με κυανό πύο. Ο καθηγητής Walter Migula το 1895 το κατέταξε στο γένος των ψευδομοναδών το βακτήριο *Bacillus pyocyaneus* (βάκιλος που παράγει την χρωστική πυοκυανίνη) που ανακάλυψε και ονόμασε ο Gessard και μετέτρεψε το όνομα του σε *Pseudomonas pyocyanea*. Κατέληξε να ονομάζεται αυτό το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* (Εικόνα 8) για να αποδοθεί τιμή στον Schroeter, ο οποίος το 1872 περιέγραψε για πρώτη φορά αυτό το βακτήριο ονομάζοντας το *Bacterium aeruginosum*. Σε διάφορες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα από το 1889 μέχρι το 1894 η *P. aeruginosa* περιγράφηκε ως η αιτία που προκαλεί τις κυανόχρωμες διαπυήσεις στα τραύματα ασθενών. Ο Freeman το 1916 σε άρθρο του έδωσε μια πλήρη παρουσίαση του τρόπου εισβολής και εξάπλωσης της *P. aeruginosa* στον οργανισμό που οδηγεί σε οξείες και χρόνιες λοιμώξεις. (Stover et al., 2000)



Εικόνα 8: *Pseudomonas aeruginosa* σε SEM
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas_aeruginosa_SEM.jpg)

Burkholderia cepacia

Η *Burkholderia cepacia* πρώην *Pseudomonas cepacia*, ήταν αρχικά γνωστή ως φυτοπαθογόνο. Είναι gram αρνητικός αερόβιος βάκκιλος, μη σπορογόνος με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-35 °C. Το σύμπλεγμα *Burkholderia cepacia* αποτελείται από 5 είδη. Στελέχη έχουν χρησιμοποιηθεί στη γεωργία ως παράγοντες βιοελέγχου και στη βιοαποκατάσταση τοξικών παραγόντων. Ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η *B. cepacia* ως πιθανός παράγοντας βιολογικού ελέγχου και για απολύμανση του εδάφους, αφού παράγει αρκετές αντιμικροβιακές ουσίες που εμποδίζουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων (Εικόνα 9). Ευκαιριακά παθογόνο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και σε άτομα με κυστική ίνωση (Mahenthiralingam et al., 2000; Govan et al., 1996).



Εικόνα 9. Ανασταλτική δράση 5 απομονώσεων του *B.cepacia* περιμετρικά του τρυβλίου και στο κέντρο ο μύκητας *Rhizoctonia solani* (φυτοπαθογόνο). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 14 μέρες (Govan et al., 1996).

Η *Burkholderia cenocepacia* παράγει μια καφέ μελανίνη (Εικόνα 10), που δεσμεύει ελεύθερες ρίζες και υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρωστική αυτή είναι πυομελανίνη και προστατεύει τον οργανισμό από οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, τίποτα δεν είναι γνωστό για τον μηχανισμό βιοσύνθεσης μελανίνης από την *B. cenocepacia* (Keith et al., 2007).



Εικόνα 10: Ένδειξη παραγωγής μελανίνης από την *Burkholderia cenocepacia* (Keith et al., 2007).

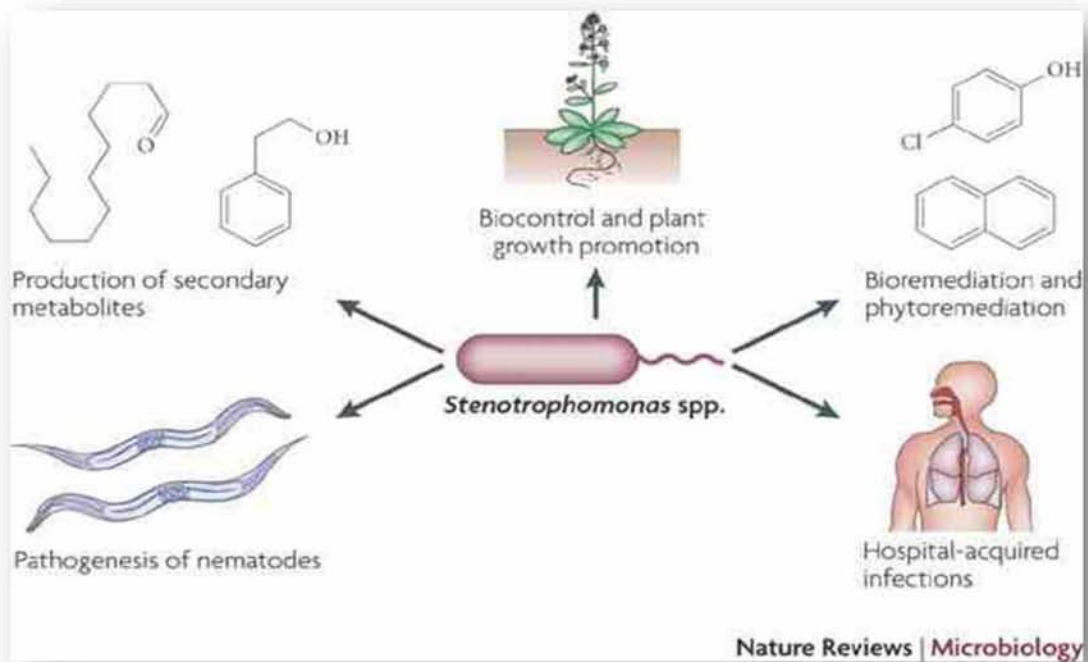
Stenotrophomonas sp

Το γένος *Stenotrophomonas* (Εικόνα 11) αποτελείται από Gram-αρνητικά βακτήρια, με κυρίαρχο είδος το βακτήριο *Stenotrophomonas maltophilia* (πρώην *Pseudomonas maltophilia*), απομονώνεται από ρίζες φυτών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μηχανισμός βιολογικού ελέγχου αφού προκαλεί ενζυματική λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων με δευτερογενείς μεταβολίτες, τις χιτινάσες (Zhongge and Yuen, 1999; Poulos et al., 1995). Το μέγεθος της *Stenotrophomonas maltophilia* είναι $0.7-1.8 \times 0.4-0.7 \mu\text{m}$ και είναι το μικρότερο του γένους *Stenotrophomonas*.



Εικόνα 11: Απομόνωση αποικιών *Stenotrophomonas* σε Columbia Agar (<http://www.szu.cz/ocekavane-vysledky-ehk-954-bakteriologicka-diagnostika>)

Μερικά είδη *Stenotrophomonas* παίζουν σημαντικό ρόλο στην απολύμανση του εδάφους (βιοαποκατάσταση) (Εικόνα 12) και μερικές φορές προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο. Ο μηχανισμός δράσης μελετάται αλλά η δράση τους οφείλεται στην παραγωγή αντιβιοτικών, τον ανταγωνισμό ή παρασιτισμό (Ryan et al., 2009).



Εικόνα 12: Βιοτεχνολογικές χρήσεις του είδους *Stenotrophomonas* σε διάφορους τομείς (Ryan et al., 2009).

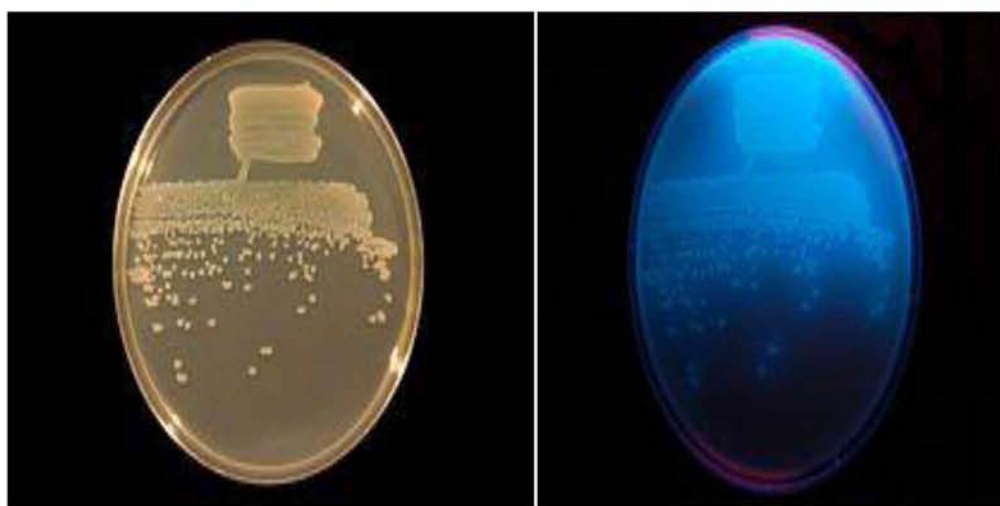
Pseudomonas fluorescens

Η *Pseudomonas fluorescens* ανήκει στην οικογένεια των *Pseudomonadaceae*, είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, αυστηρά αερόβιο, με σχήμα ραβδίων και βρίσκεται κυρίως στο έδαφος, στα φυτά αλλά και σε διάφορες άλλες επιφάνειες. (Andreani et al., 2014). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι από 25°C- 30°C. Αποτελείται από πολλά στελέχη αλλά μόνο 2 από αυτά έχουν αλληλουχηθεί πλήρως, η *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 και η *Pseudomonas fluorescens* PfO-1. Η *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 έχει ένα στρογγυλό χρωμόσωμα το οποίο είναι 7,1 Mbp και περιλαμβάνει 87 RNAs και 6137 πρωτεΐνες ενώ το 5,7% του γονιδιώματος του λαμβάνει μέρος σε έναν δευτερογενή μεταβολισμό ο οποίος είναι ο μεγαλύτερος των *Pseudomonas*. Η *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 αποτελείται από ένα χρωμόσωμα το οποίο είναι 6.43841 Mbp, έχει 95 RNAs και 5736 πρωτεΐνες (Palleroni, 1984).

Η *Pseudomonas fluorescens* χρησιμοποιεί σιδεροδεσμευτικές ουσίες για να καλύψει τις ανάγκες της σε σίδηρο. Για τον λόγο αυτό, παράγει την πυοβερδίνη (pyoverdine) η οποία είναι υπεύθυνη για την χηλικοποίηση του σιδήρου όταν οι

συγκεντρώσεις είναι χαμηλές. Η ουσία αυτή είναι υπεύθυνη για τον φθορισμό του βακτηρίου (Εικόνα 13) γι αυτό και το φθορίζον χρώμα παράγεται μόνο όταν οι συγκεντρώσεις του σιδήρου είναι χαμηλή ενώ όταν είναι υψηλή δεν παράγεται η πυοβερδίνη και έτσι οι αποικίες δεν φωσφορίζουν στο υπεριώδες φως.

Ακόμα, έχει σημαντικό ενδιαφέρον καθώς μπορεί και διασπά διάφορους ρύπους αλλά και για την χρήση της ως βιοπροστασία ενάντια παθογόνων μικροοργανισμών. Η *Pseudomonas fluorescens* παράγει ένα αντιβιοτικό το Muricocin το οποίο έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό ενάντια σε διαταραχές του δέρματος, των αυτιών και των ματιών (WHO, 2015). Τέλος, παράγει πολλά ένζυμα όπως θερμοάντογες λιπάσες και πρωτεάσες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλλοίωση του γάλακτος.



Εικόνα 14: *Pseudomonas fluorescens* (αριστερά σε απλό φως και δεξιά σε υπεριώδες)(https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_fluorescens)

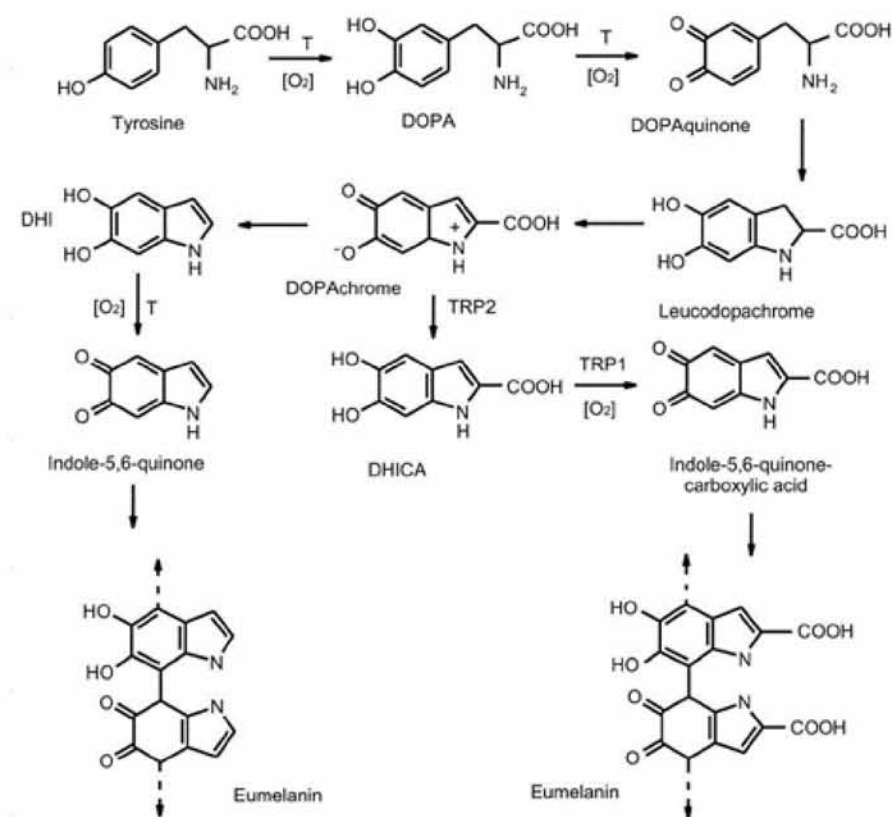
2.3 Σύνθεση της μελανίνης σε διάφορους μικροοργανισμούς

Υπάρχουν διάφορα είδη μελανίνης μικροβιακής προέλευσης, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

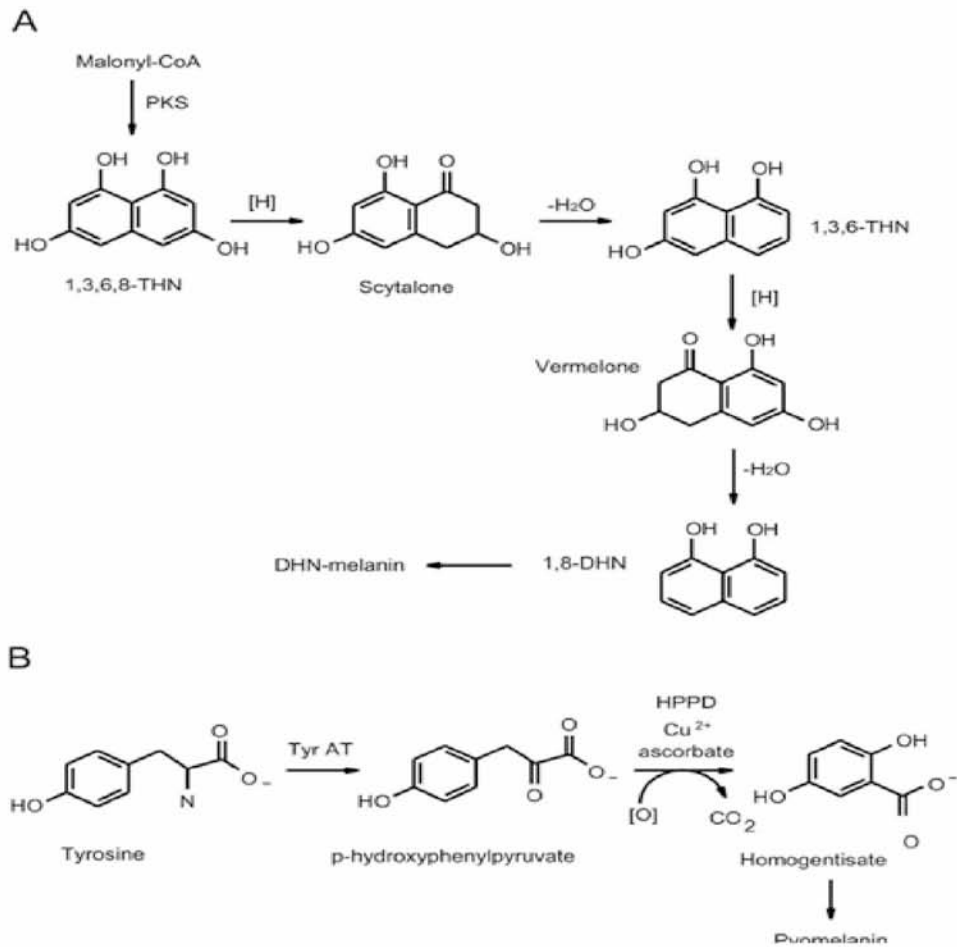
Ευμελανίνες (Eumelanins) (μαύρες ή καφέ) — παράγονται κατά την οξείδωση της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης (Εικόνα 15) σε *ο*-δι-υδροξυ φαινυλαλανίνη (DOPA) και dopaquinone η οποία στην συνέχεια μετατρέπεται σε 5,6- δι-υδροξυ ινδόλη(DHI) ή 5,6-δι-υδροξυ ινδόλη- 2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA) (Langfelder et al., 2003; Del Marmol and Beermann, 1996).

Φαιομελανίνες (Pheomelanins) (κίτρινες ή κόκκινες) — συντίθενται όπως οι ευμελανίνες αλλά η DOPA υφίσταται κυστεϊνυλίωση, άμεσα ή με την μεσολάβηση της γλουταθειόνης (Εικόνα 17). Το τελικό προϊόν της αντίδρασης κυστεϊνυλίωση-DOPA στην συνέχεια πολυμερίζεται σε διάφορα παράγωγα των βενζοθειανών (Nappi and Ottaviani, 2000; Kobayashi et al., 1995)

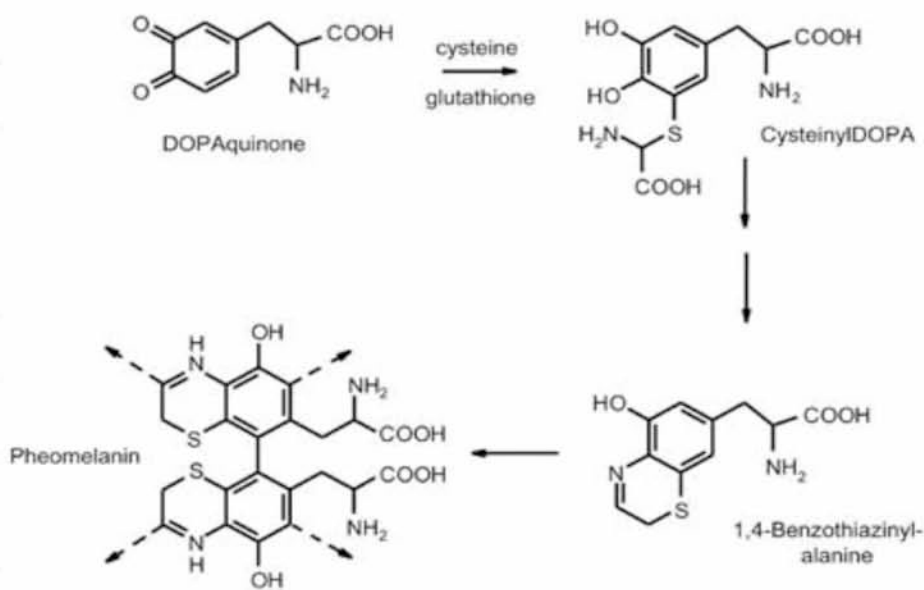
Αλλομελανίνες (Allomelanins) — είναι η λιγότερο μελετημένη ομάδα καθώς απαρτίζεται από μια μεγάλη ετερογενή ομάδα πολυμερών (Εικόνα 16), τα οποία προκύπτουν μέσω οξειδωσης / πολυμερισμού δι- ή τετραυδροξυναφθαλίνης, μέσω της οδού πεντακτίδης που οδηγεί μέσω της φλαβιολίνης σε διάφορα έγχρωμα πολυμερή DHN-μελανινών, ομογενιστικού οξέος (πυρομελατίνες), γ-γλουταμινυλο-4-υδροξυβενζόλιο, κατεχόλες, καθώς και του 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος (Jacobson, 2000; Espin et al., 1999; Funa et al., 1999; Gibello et al., 1995; Kotob et al., 1995). Γενικά, οι φαιομελανίνες περιλαμβάνουν θείο ενώ πολλές αλλομελανίνες δεν περιλαμβάνουν άζωτο.



Εικόνα 15: Μονοπάτι της ευμελανογένεσης. (Nappi and Ottaviani, 2000; Kobayashi et al., 1995).



Εικόνα 16: Παραδείγματα των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αλλομελανινών (A και B) (Nappi and Ottaviani, 2000; Kobayashi et al., 1995).



Εικόνα 17: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαιομελανινών (Nappi and Ottaviani, 2000; Kobayashi et al., 1995).

Πυοκυανίνη

Η πυοκυανίνη είναι μια από τις χρωστικές που εκκρίνεται από ποσοστό άνω του 90% των στελεχών της *Pseudomonas aeruginosa*, έχει κυανοπράσινο χρώμα και η παραγωγή της αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους για την ταυτοποίηση του βακτηρίου σε διάφορες καλλιέργειες. Η χρωστική πυοκυανίνη (5-Methylphenazin-1-one) είναι μια τοξίνη που εκκρίνεται από το βακτήριο σαν δευτερογενής μεταβολίτης κάτω από τον έλεγχο του συστήματος Quorum Sensing. Ελαττώνει την έκφραση του γονιδίου της καταλάσης επιδρώντας έτσι στην μορφολογία της γλουταθειόνης (αντιοξειδωτικός παράγοντας) με αποτέλεσμα την αύξηση της ιστικής καταστροφής. Ένας άλλος τρόπος αύξησης της ιστικής καταστροφής από την πυοκυανίνη είναι η κατάλυση που προκαλεί στην παραγωγή των τοξικών μορφών οξυγόνου (υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδικών ριζών). (Murray et al., 2005; Usher et al., 2002; Michel and Baysse, 2002; Muller, 2002, Denning et al., 1998; Hassan and Fridovich, 1980).

Πυοβερδίνη

Η πυοβερδίνη είναι μια ακόμη χρωστική που παράγεται τόσο από την *P. aeruginosa* όσο και από άλλα είδη του ομάδας των φθορίζοντων ψευδομοναδών (Fluorescent group- *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*) τα οποία είναι *P. putida*, *P. fluorescences*. Έχει πρασινοκίτρινο χρώμα, διαλύεται στο νερό αλλά δεν διαλύεται στο χλωροφόρμιο. Η χρωστική πυοβερδίνη ή αλλιώς φθορεσεΐνη είναι πρωτεΐνη που είναι σιδηροδεσμευτική (iron-siderophore-binding protein) και η οποία κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (400nm) φθορίζει, συνεπώς οι καλλιέργειες του βακτηρίου που παράγουν φθορεσεΐνη φθορίζουν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε υλικά με περιορισμένη συγκέντρωση σιδήρου παράλληλα με την παράγωγή της χρωστικής πυοβερδίνης γίνεται και η παραγωγή της πυοχελίνης (pyochelin) η οποία είναι επίσης μια σιδηροδεσμευτική ουσία (siderofore). Όσον αφορά την λειτουργία της πυοβερδίνης, αφού εκκριθεί από το βακτήριο, δεσμεύει τα ιόντα σιδήρου λόγω της υψηλής συγγένειας με τα αυτά, έπειτα με την βοήθεια ειδικών υποδοχέων της επιφάνειας του βακτηρίου εισέρχεται σε αυτό και απελευθερώνει τα ιόντα σιδήρου που έχει δεσμεύσει έτσι ώστε να ενσωματωθεί σε βακτηριακές πρωτεΐνες. Η εμπλοκή της τοξίνης πυοβερδίνης στην παθογένεια του

βακτηρίου γίνεται με την πυοβερδίνη να διεγείρει την ανάπτυξη της *Pseudomonas aeruginosa* σε θρεπτικά υλικά με περιορισμένη συγκέντρωση σιδήρου και τρανσφερίνης αλλά και στον ανθρώπινο ορό και πλάσμα (Lamont et al., 2002; Meyer, 2000; Cox and Adams, 1985; Sokol and Woods, 1983; Lluch et al., 1973).

Κεφάλαιο 3^ο : Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Μοριακές δοκιμές ταυτοποίησης

Η ανάλυση της αλληλουχίας του 16sRNA είναι ένα κοινό εργαλείο για τις φυλογενετικές μελέτες αλλά πολλές φορές δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαρκώς για τις ενδογενείς σχέσεις των *Pseudomonas* (Mulet et al., 2009). Οι GYRB και RPOD είναι και τα δυο πρωτεΐνες τα οποία βρίσκονται ευρέως στα βακτήρια και τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Το GYRB (ή αλλιώς DNA gyraseB) είναι ένα ένζυμο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή των χρωμοσωμάτων (Yamamoto et al., 2000; Watt and Hickson, 1994). Το rPOD είναι ένας από τους παράγοντες sigma ο οποίος προάγει συγκεκριμένα την έναρξη της μεταγραφής της RNA πολυμεράσης (Yamamoto et al., 2000).

Για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό του Gram αρνητικού βακτηρίου πραγματοποιήσαμε εξαγωγή γονιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια με την χρήση ενός εμπορικού kit (Macherey- Nagel). Το γονιδιωματικό DNA που παραλάβαμε το ηλεκτροφορήσαμε σε gel αгарόζης 0,8% στα 100V.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών 8F-1512R (Mühling et al., 2008) στην οποία χρησιμοποιήσαμε ένα αρνητικό δείγμα/ μάρτυρα (δισ απεσταγμένο νερό), ένα θετικό δείγμα (Ox4) και το gDNA του μικροοργανισμού μας το οποίο έτρεξε για 30 κύκλους (Πίνακας 5). Παράλληλα, πραγματοποιήσαμε μια PCR για το GYRB (Πίνακας 6) στο οποίο πάλι είχαμε αρνητικό δείγμα/ μάρτυρα (δισ απεσταγμένο νερό), ένα θετικό δείγμα (Ox4) και το gDNA του άγνωστου μικροοργανισμού μας το οποίο έτρεξε για 35 κύκλους και μια PCR για το RPOD (Πίνακας 7) στο οποίο πάλι είχαμε αρνητικό δείγμα/ μάρτυρα (δισ απεσταγμένο νερό), ένα θετικό δείγμα (Ox4) και το GDNA του άγνωστου μικροοργανισμού μας το οποίο έτρεξε για 40 κύκλους. Έπειτα, καθαρίσαμε τα προϊόντα της PCR για τα γονίδια 16s rRNA, GYRB και rPOD με το kit Nucleo Spin Gel και PCR clean up. Για να διαπιστώσουμε την ακριβή ποσότητα των προϊόντων μας, το οποίο απαιτείται για το επόμενο στάδιο της κλωνοποίησης χρησιμοποιήσαμε το Qubit (Πίνακας 8). Οι αντιδράσεις λιγοποίησης τοποθετήθηκαν στους 4°Cx 16h. Στην πορεία είχαμε τον μετασχηματισμό κυττάρων της *Escherichia coli* με τους πλασμειδικούς που φέρουν τα ενισχυμένα τμήματα των γονιδίων 16s rRNA, GYRB και rPOD. Έπειτα, από την επώση των δειγμάτων για 1h και 30min στους 37°C

επιστρώσαμε τα δείγματα σε τρυβλία με LB Agar (Luria Bertani Agar) με Xgal και αμπικιλίνη και τα επώασαμε στους 37°Cx 24h. Τέλος, πήραμε κάθε λευκή αποικία που αναπτύχθηκε στα τρυβλία μας και καλλιεργήθηκε σε LB broth και αφού αναπτύχθηκαν πραγματοποιήσαμε Colony PCR με το ζεύγος εκκινητών T7/SP6 για 30 κύκλους (Πίνακας 9). Ηλεκτροφορήσαμε κάθε προϊόν της Colony PCR έτσι ώστε να αναγνωρίσουμε τους επιθυμητούς βακτηριακούς κλώνους και απομονώσαμε το πλασμίδιο μας.

Πίνακας 5: PCR 8F-1512R

Reagents	Volume
10x buffer	2,5μl
dNTPs	0,5 μl
8F	0,5 μl
1512R	0,5 μl
Kapa Taq	0,1 μl
ddH ₂ O	19,9 μl
DNA	1 μl
Total	25 μl

Πίνακας 6: PCR GYRB

Reagents	Volume
10x buffer	2,5μl
dNTPs	0,5 μl
UR1E	0,5 μl
AprU	0,5 μl
Kapa Taq	0,1 μl
ddH ₂ O	19,9 μl
DNA	1 μl
Total	25 μl

Πίνακας 7: PCR rPOD

Reagents	Volume
10x buffer	2,5μl
dNTPs	0,5 μl
PsEG30f	0,5 μl
PsEG790r	0,5 μl
Kapa Taq	0,1 μl
ddH ₂ O	19,9 μl
DNA	1 μl
Total	25 μl

Πίνακας 8: Qubit

	Standard tubes Assay	User Sample
Volume of Working Solution to add	190 μl	180-199 μl
Volume of Standard to add	10 μl	-
Volume of user sample to add	-	1-20 μl
Total Volume in each Assay Tube	200 μl	200 μl

Πίνακας 9: Colony PCR T7/SP6

Reagents	Volume
10x buffer	2,5μl
dNTPs	0,5 μl
T7	0,5 μl
SP6	0,5 μl
Kapa Taq	0,1 μl
ddH ₂ O	19,9 μl
DNA	1 μl
Total	25 μl

Ομόλογες αλληλουχίες από το γονίδιο 16s RNA, *gyrB* και *groD* ανακτήθηκαν από την συλλογή αναφοράς γονιδιωμάτων (Ref Seq) v85 από το National Center for Biotechnology Information (NCBI) χρησιμοποιώντας το βασικό εργαλείο αναζήτησης (BLAST) v2.7.1. Επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες από κάθε στέλεχος και χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθούν ευθυγραμμίσεις για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο με το MUSCLE v3.8.31. Στην συνέχεια, οι λαμβανόμενες ευθυγραμμίσεις των αλληλουχιών συνενώθηκαν για κάθε στέλεχος. Οι πιθανές αποκλίσεις απομακρύνθηκαν χρησιμοποιώντας το Gblocks v0.91b. Το μέγιστο δέντρο πιθανότητας δημιουργήθηκε με το RAxML v8.1.24 (Stamatakis, 2014) χρησιμοποιώντας το μοντέλο γενικής χρονικής αναστρέψεως (Tavaré, 1986) ενώ καταγράφηκαν αμετάβλητες θέσεις με ετερογενείς ρυθμούς υποκατάστασης μεταξύ των θέσεων σύμφωνα με μια κατανομή γάμμα και 1000 εκκινήτων. Οι μετασχηματισμοί μορφής αλληλουχίας εκτελέστηκαν με το εργαλείο EMBOSS v6.3.1 (Rice et al., 2000). Το φυλογενετικό σχεδιάστηκε με την χρήση του APEv4.1 με δεδομένα από το πρόγραμμα R statistics v3.3.2.

3.2 Βιοχημικές δοκιμές

Για τις βιοχημικές δοκιμές του βακτηρίου πραγματοποιήσαμε χρώση Gram για να διαπιστώσουμε αν είναι Gram αρνητικό ή Gram θετικό βακτήριο, παράλληλα ελέγξαμε και την κινητικότητα του. Επίσης, πραγματοποιήσαμε δοκιμή καταλάσης με την χρήση 35% H₂O₂ (λίγες σταγόνες απευθείας πάνω σε αποικίες), δοκιμή οξειδάσης με την χρήση χρωματικού kit ανίχνευσης οξειδάσης (Merck), δοκιμή ουρεάσης με την χρήση κεκλιμένου Urea Agar. Επίσης, ελέγξαμε αν μπορεί να διασπάσει το κιτρικό οξύ με την χρήση του υποστρώματος Simmons Citrate Agar, αλλά και για την λιπολυτική του ικανότητα με την χρήση του υποστρώματος Tween 80 Agar (10gr/l peptone, 5gr/l NaCl, 0,1gr/l CaCl₂, 10gr/l Tween 80, 12gr/l agar και 1000ml απιονισμένο H₂O).

3.3 Μελέτη κινητικότητας και μεγέθους κυττάρων

3.3.1. Μελέτη κινητικότητας

Η κινητικότητα των κυττάρων μελετήθηκε στο μικροσκόπιο με 0,1ml εναιώρημα κυττάρων πρόσφατης καλλιέργειας, μετά από τοποθέτηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, χρώση με αραιωμένη φουξίνη και προσθήκη καλυπτρίδας. Τα κύτταρα παρουσίαζαν κινητικότητα εφόσον κινούνταν διαρκώς σε διαφορετικές κατευθύνσεις.

3.3.2. Μελέτη μεγέθους των κυττάρων μετά από διήθηση

Αρχικά, καλλιεργήσαμε το βακτήριο σε σωληνάκι με Potato Dextrose Broth (PDB) των 10ml και το επώασαμε στους 25°Cx 3-5d. Στην συνέχεια, αφού αποστειρώσαμε το σύστημα αποστειρωτικής διήθησης, διηθήσαμε τα 5ml με φίλτρα των 0,45μm και συλλέξαμε το δείγμα μας σε μια αποστειρωμένη γυάλινη κωνική. Τα υπόλοιπα 5ml τα διηθήσαμε με φίλτρα των 0,2μm και τα συλλέξαμε σε μια άλλη αποστειρωμένη γυάλινη κωνική. Κάθε διήθημα επιστρώθηκε σε Potato Dextrose Agar (PDA) και επώαστηκε στους 25°Cx 3-5d.

3.4 Μέτρηση μελανίνης βακτηρίου σε υγρό ζύμωσης Potato Dextrose Broth

Αρχικά, καλλιεργήσαμε το βακτήριο *Pseudomonas sp* σε κωνική των 250ml με Potato Dextrose Broth (PDB) των 100ml και το τοποθετήσαμε σε επωαστικό αναδευτήρα στα 150rpm στους 25°Cx 3-5d. Στην συνέχεια, αφού αποστειρώσαμε το σύστημα αποστειρωτικής διήθησης, διηθήσαμε την κωνική μας σε φίλτρα με πόρους 0,45μm. Συλλέξαμε το διήθημα σε αποστειρωμένο μπουκάλι και το μετρήσαμε σε φασματοφωτόμετρο στα 400nm το οποίο αντιστοιχεί στο φάσμα της μελανίνης (Wan et al, 2007).

3.5 Μελέτη εμφάνισης αποικιών ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης

Αρχικά, καλλιεργήσαμε το βακτήριο σε σωληνάκι με Potato Dextrose Broth των 10ml και τα επώασαμε στους 25°Cx 3-5d. Στην συνέχεια, πραγματοποιήσαμε επίστρωση (streak) σε διάφορα υποστρώματα και συνθήκες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10)

Πίνακας 10: Υποστρώματα, θερμοκρασίες επώασης του βακτηρίου

<u>ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ</u>	<u>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ</u>
CNagar (Pseudomonasagarbase + CetrimideandNalidixicacid)	37°C
CFCagar (Cephalothin-Sodium Fusidate Cetrimide Agar)	20°C
TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar)	20°C
RBCA (Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base + Chloramphenicol supplement)	30°C
PDA(Potato Dextrose Agar)	22°C
SDA(Sabourand Dextrose Agar)	22°C
MALT AGAR	22°C
BLOOD AGAR	30°C
MAC-CONKEY	30°C
PDA+POLYMXIN B	22°C
VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)	37°C
PCA(Plate Count Agar)	30°C

Luria Bertani	22°C
MÜLLER-HINTON	22°C
TSB (Tryptic Soy Broth)	22°C
PDB(Potato Dextrose Broth)	22°C
Glucose Bromocresol Purple Agar	22°C
Dextrose Tryptone Agar	25°C
TSC Agar	37°C

3.5.2 Μελέτη φυσιολογίας και συνθηκών ανάπτυξης

Αρχικά, καλλιεργήσαμε το βακτήριο σε σωληνάκι με 10ml Potato Dextrose Broth (PDB) στους 25°Cx 3-5d. Παράλληλα, φτιάξαμε σωληνάκια στα οποία είχαμε PDB των 10ml στα οποία είχαμε ρυθμίσει το pH (Πίνακας 11), σωληνάκια με PDB των 10ml (χωρίς να έχουμε ρυθμίσει το pH) και διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (Πίνακας 12) και τέλος, σωληνάκια με PDB των 10ml (χωρίς ρύθμιση του pH) τα οποία τα τοποθετήσαμε σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης (Πίνακας 13). Μόλις το μητρικό μας σωληνάκι αναπτύχθηκε εμβολιάσαμε όλα τα σωληνάκια με 0,1ml και τα τοποθετήσαμε ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση σε κάθε σωληνάκι στις 0d, 2d, 4d και 8d.

Πίνακας 11: Κωδικοποίηση δειγμάτων με διαφορετικό pH επώασης σε θερμοκρασία 25°C

Υπόστρωμα - εμβόλιο	pH υποστρώματος
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	1
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	2
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	3
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	4
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	5
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	6
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	7
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	8
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	9
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	10

Πίνακας 12: Κωδικοποίηση δειγμάτων με pH 5 και διαφορετική συγκέντρωση NaCl σε θερμοκρασία 25°C.

Υπόστρωμα - εμβόλιο	Συγκέντρωση NaCl υποστρώματος
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	0%
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	1%
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	3%
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	4%
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	5%

Πίνακας 13: Κωδικοποίηση δειγμάτων με pH 5 σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

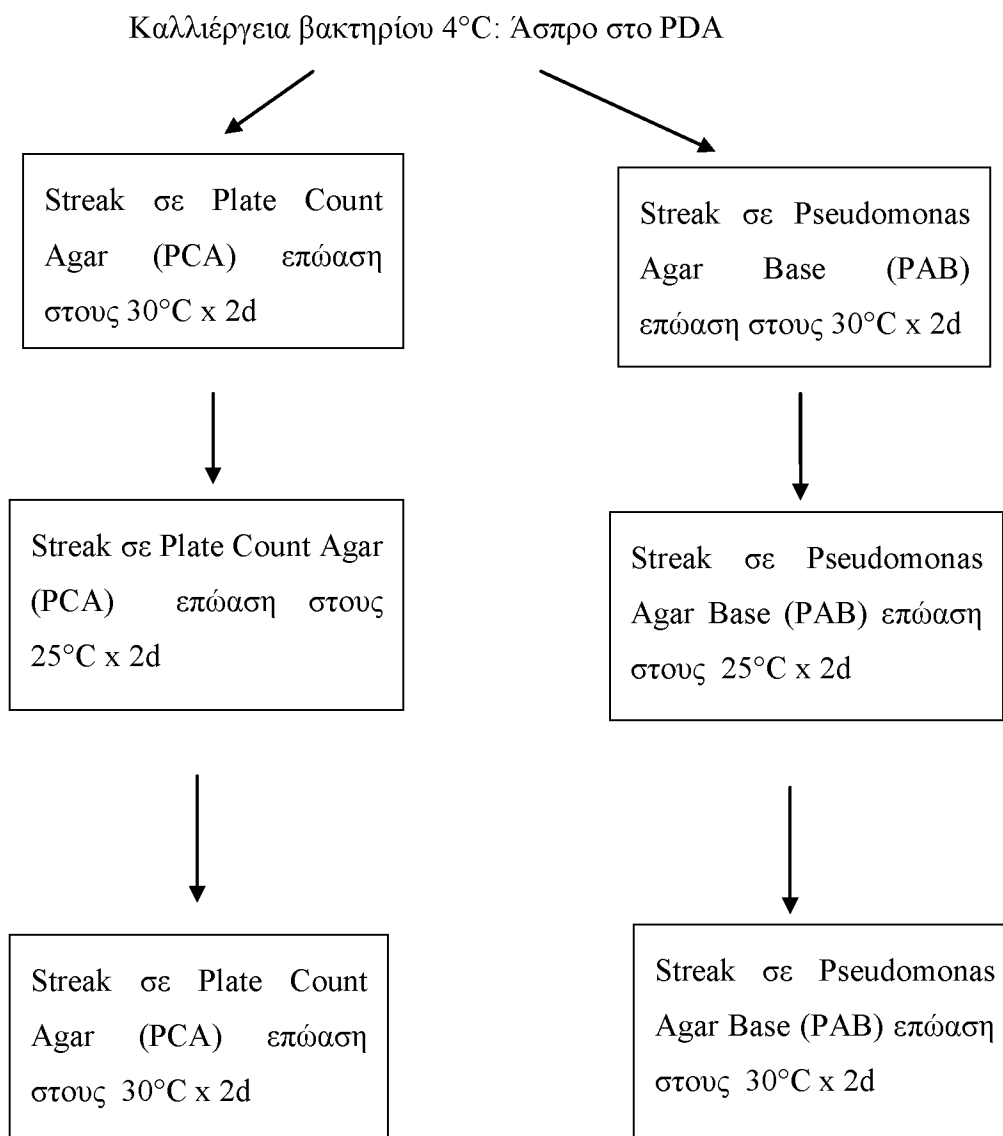
Υπόστρωμα - εμβόλιο	Θερμοκρασία επώασης
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	4°C
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	8°C
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	14°C
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	25°C
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	37°C
Σωληνάκι με PDB + 0,1ml εμβόλιο	44°C

3.6 Έλεγχος σπορογονίας

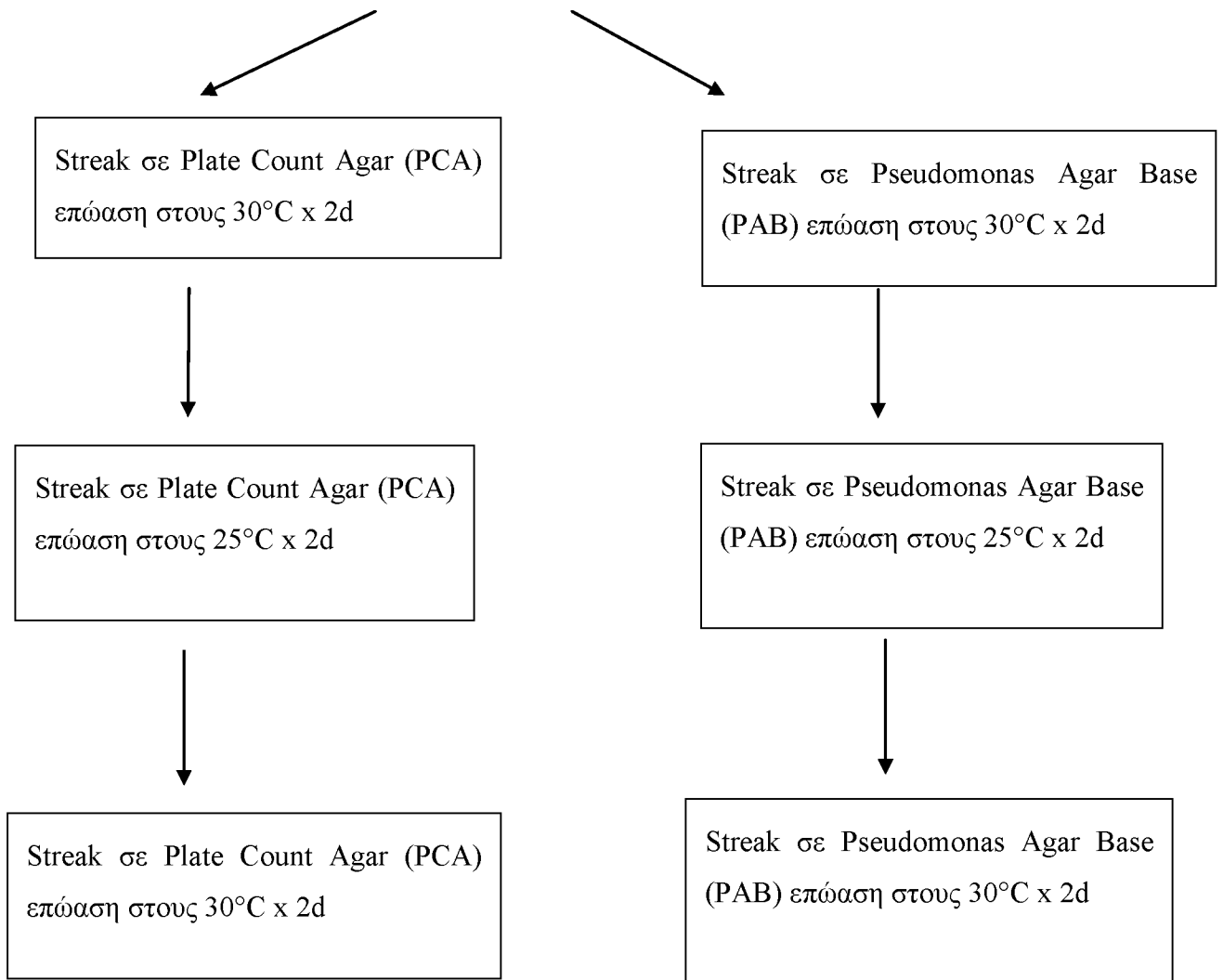
Αφού καλλιεργήσαμε το βακτήριο σε σωληνάκι με 10ml Potato Dextrose Broth (PDB) στους 25°C x 3-5d. Μόλις αναπτύχθηκε πραγματοποιήσαμε streak σε ένα τρυβλίο με Dextrose Tryptone Agar (DTA) και σε ένα τρυβλίο με Potato Dextrose Agar (PDA) για να δούμε αν αναπτύσσεται (τα δυο αυτά τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες). Στην συνέχεια, σε ένα υδατόλουτρο αφού ρυθμίζαμε κάθε φορά την θερμοκρασία βράσαμε το σωληνάκι σε διαδοχικές θερμοκρασίες 50°C x 10', 60°C x 10', 70°C x 10' και 80°C x 10'.

3.7 Έλεγχος αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο

Για τον έλεγχο της αντιστρεπτής έκφρασης της παραγωγής χρωστικής από το βακτήριο ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία καλλιέργειας σε συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή χρωστικής, έπειτα σε συνθήκες που σταματούν την παραγωγή χρωστικής, και εκ νέου ανακαλλιέργεια σε συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή χρωστικής, ώστε να διαπιστωθεί αν η παραγωγή της χρωστικής ελέγχεται από πλασμίδια και εκφράζεται αντιστρεπτά, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης.



Καλλιέργεια βακτηρίου 25°C: Μαύρο στο PDA



3.8 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης

3.8.1. Μέτρηση ζωνών αναστολής σε βοθρία (well-difusion assay)

Ζώνες αναστολής σε βακτήρια

Αρχικά ανακαλλιεργήσαμε το βακτήριο σε PDB στους 25°C x 3-5d. Στην συνέχεια, χωρίσαμε την καλλιέργεια σε 2 μέρη των 5ml. Τα πρώτα 5ml αποτελούσαν το μικτό δείγμα μας ενώ τα υπόλοιπα 5ml τα τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρισης και τα φυγοκεντρίσαμε στα 4500rpm x 15min. Στην συνέχεια, συλλέξαμε το υπερκείμενο σε προαποστειρωμένο σωλήνα και το βράσαμε στους 80°C x 15min. Στο ίζημα προσθέσαμε 5ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό 0,9% και το ξανά φυγοκεντρίσαμε στα 4500rpm x 15min, έπειτα πετάξαμε το υπερκείμενο και ξανά προσθέσαμε 5ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό 0,9% και το ξανά φυγοκεντρίσαμε στα 4500rpm x 15min. Οπότε είχαμε 3 δείγματα: μικτό , υπερκείμενο βρασμένο και ίζημα. Αφού, είχαμε στρώσει τρυβλία με Nutrient Agar για τα βακτήρια και επιστρώσαμε σε κάθε τρυβλίο με 0,1ml από τον μικροοργανισμό στόχο μας. Από τα βακτήρια είχαμε την *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*. Μόλις στέγνωσαν τα τρυβλία μας με τους μικροοργανισμούς στόχους ανοίξαμε με γυάλινες πιπέττες Pasteur τρία βοθρία. Σε κάθε βοθρίο προσθέταμε 30μl από το κάθε δείγμα μας (ζωντανά κύτταρα, βρασμένο υπερκείμενο και ίζημα) και τα επώασαμε στους 25°C x 2-3d και μετρήσαμε τις ζώνες αναστολής.

Ζώνες αναστολής σε μύκητες

Στο πείραμα αυτό επιλέξαμε να συγκρίνουμε ένα στέλεχος της *Pseudomonas* *srpu* το ανακαλλιεργούμε τα τελευταία 4 χρόνια και ένα στέλεχος που το ανακαλλιεργούμε τον τελευταίο 1 μήνα. Αφού τα καλλιεργήσαμε σε σωλήνες με Potato Dextrose Broth, στρώσαμε τρυβλία με Potato Dextrose Agar και επιστρώσαμε με 0,1ml από τα 2 βακτήρια *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) και *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 4 ετών). Μόλις στέγνωσαν τα τρυβλία ανοίξαμε βοθρία με γυάλινες πιπέττες Pasteur και προσθέσαμε 25μl από τους μύκητες *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* και *Rhizoctonia solani*. Ταυτόχρονα, είχαμε και τρυβλία στα οποία είχαμε μόνο τα βοθρία με τους μύκητες (μάρτυρες) αλλά και τρυβλία μόνο με τα 2 βακτήρια (μάρτυρες) έτσι ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε

τα αποτελέσματα μας. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25°C για 5-9d. Οι μετρήσεις της ανάπτυξης του μυκηλίου των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν στις 5d και 9d.

Στο 2^ο μέρος του πειράματος αυτού, μετρήσαμε τις ζώνες αναστολής των μυκήτων αυτών που προκλήθηκαν από τα 2 βακτήρια. Αρχικά, σε τρυβλία με Potato Dextrose Agar επιστρώσαμε με 0,1ml από το εναιώρημα των σποριών των μυκήτων *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* και *Rhizoctonia solani*. Μόλις στέγνωσαν ανοίξαμε βοθρία στο κέντρο του τρυβλίου και προσθέσαμε 25μl από το *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) και *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 4 ετών) αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, είχαμε και τρυβλία με μόνο επίστρωση των μυκήτων (μάρτυρες) και τρυβλία με βοθρία των βακτηρίων (μάρτυρες) έτσι ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μας. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25°C για 3-7d. Οι μετρήσεις για τις ζώνες αναστολής των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν στις 3d και 7d.

3.8.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου *Pseudomonas sp* ενάντια στους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Rhizoctonia solani*

Αρχικά, παρασκευάσαμε σωλήνες με Potato Dextrose Broth με διαφορετικούς όγκους έτσι ώστε να εμβολιάσουμε με διαφορετικές συγκεντρώσεις από το βακτήριο *Pseudomonas sp* (ζωντανά κύτταρα) και *Pseudomonas sp* (υπερκείμενο διηθημένο στα 0,45μm ύστερα από φυγοκέντριση στα 4500rpm x 15min). Σε όσα σωληνάκια είχαμε αναστολή δηλαδή χωρίς επιφανειακή εμφάνιση του μύκητα έπειτα από την προσθήκη του σε εναιώρημα σποριών πραγματοποιήσαμε streaking σε Potato Dextrose Agar για να διαπιστώσουμε εάν σε αυτήν την συγκέντρωση είχαμε και θανάτωση του μικροοργανισμού. Τέλος, στον *Aspergillus flavus* (μάρτυρας), *Aspergillus flavus* + *Pseudomonas sp* 1% (ζωντανά κύτταρα) και *Aspergillus flavus* + *Pseudomonas sp* 1% (υπερκείμενο διηθημένο) πραγματοποιήσαμε μικροβιολογική ανάλυση για να διαπιστώσουμε τυχόν μειώσεις στον πληθυσμό στο υπόστρωμα Potato Dextrose Agar και τα επωάσαμε στους 25°C x 5d. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14) περιγράφεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων.

Πίνακας 14: Περιγραφή καλλιεργειών για την μελέτη της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης

9mlPDB+ 1ml μ/ο στόχος	Χωρίς κύτταρα <i>Pseudomonas sp</i> (μάρτυρας)	Χωρίς διήθημα κυττάρων <i>Pseudomonas</i> (μάρτυρας)
9mlPDB+ 1mlμ/ο στόχος	+ 0,01ml <i>Pseudomonas sp</i>	+ 0,01ml διήθημα κυττάρων <i>Pseudomonas sp</i>
8,9mlPDB+ 1mlμ/ο στόχος	+ 0,1ml <i>Pseudomonas sp</i>	+ 0,1ml διήθημα κυττάρων <i>Pseudomonas sp</i>
8,5mlPDB+ 1mlμ/ο στόχος	+ 0,5ml <i>Pseudomonas sp</i>	+ 0,5ml διήθημα κυττάρων <i>Pseudomonas sp</i>
8,5mlPDB+ 1mlμ/ο στόχος	+ 1ml <i>Pseudomonas sp</i>	+ 1ml διήθημα κυττάρων <i>Pseudomonas sp</i>

3.8.3 Μέτρηση μείωσης πληθυσμού του μύκητα *Penicillium expansum* και της ζύμης *Rhodotorula mucilaginosa* μετά από συγκαλλιέργεια με το βακτήριο *Pseudomonas sp.*

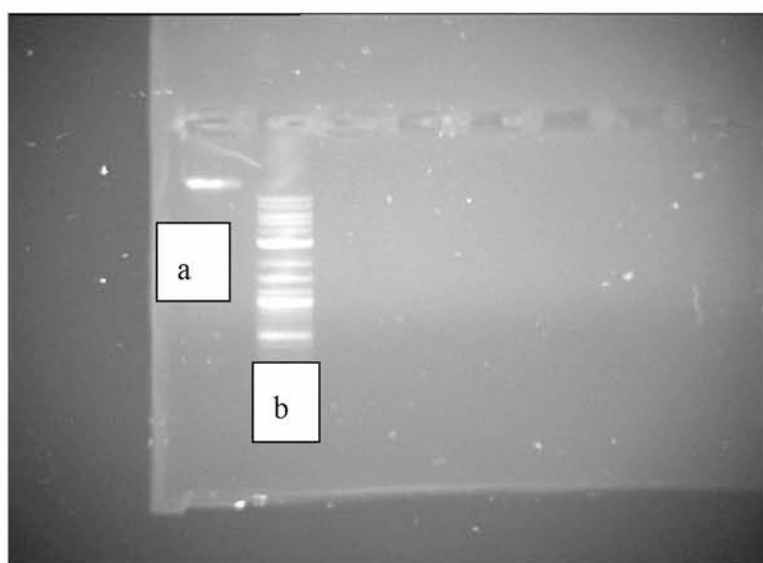
Αρχικά, παρασκευάσαμε κωνικές με 100ml Potato Dextrose Broth όπου μετά την αποστείρωση εμβολιάσαμε μια κωνική με 1ml *Penicillium expansum* (μάρτυρας), μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) (μάρτυρας), μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) βρασμένο στους 80°C x 20min και 1ml *Penicillium expansum* και μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) με 1ml *Penicillium expansum*. Έπειτα, τις τοποθετήσαμε στον επωαστικό αναδευτήρα στους 20°C x 250 rpm. Ο αρχικός πληθυσμός της κάθε κωνικής ήταν ο εξής: *Penicillium expansum* $7,2 \times 10^3$ cfu/ml ενώ η *Pseudomonas sp* ήταν 9×10^5 cfu/ml. Στις 8d αφού προξηράναμε φίλτρα των 1,2μm στους 105°C x 24h και αφού τα ζυγίσαμε πραγματοποιήσαμε διήθηση όλου του υγρού ζύμωσης, έτσι ώστε να μετρήσουμε την βιομάζα του μύκητα. Μετά, την διήθηση τα φίλτρα τοποθετήθηκαν για ξήρανση στους 105°C x 24h όπου και ζυγίστηκαν. Για να βρούμε την μείωση του μύκητα αφαιρέσαμε από το τελικό βάρος το βάρος του προζυγισμένου φίλτρου και βρήκαμε το βάρος του μύκητα.

Παρόμοια, με την παραπάνω πειραματική πορεία παρασκευάσαμε κωνικές με 100ml Potato Dextrose Broth και αφού τις αποστειρώσαμε εμβολιάσαμε τις εξής κωνικές: 1ml *Rhodotorula mucilaginosa* (μάρτυρας), μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) (μάρτυρας), μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) βρασμένο στους 80°C x 20min και 1ml *Rhodotorula mucilaginosa* και μια κωνική με 1ml *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) με 1ml *Rhodotorula mucilaginosa*. Έπειτα, τις τοποθετήσαμε στον επωαστικό αναδευτήρα στους 20°C x 250 rpm. Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν ήταν μια φορά την ημέρα μια 4 ημέρες. Για την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων η *Pseudomonas sp* καταμετρήθηκε στο Pseudomonas Agar Base ενώ η *Rhodotorula mucilaginosa* καταμετρήθηκε στο Potato Dextrose Agar με την προσθήκη 3% NaCl καθώς αναπτυσσόταν και η *Pseudomonas sp*. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C x 3d.

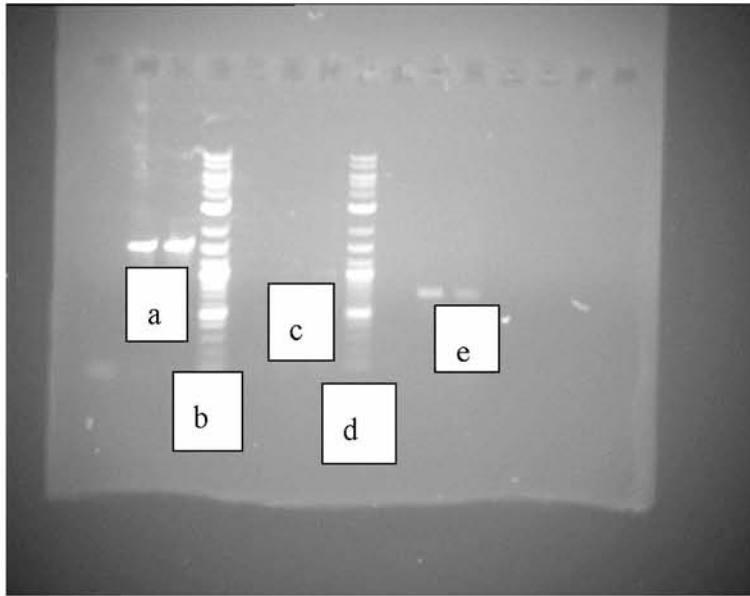
Κεφάλαιο 4^ο: Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Αποτελέσματα Μοριακών δοκιμών ταυτοποίησης

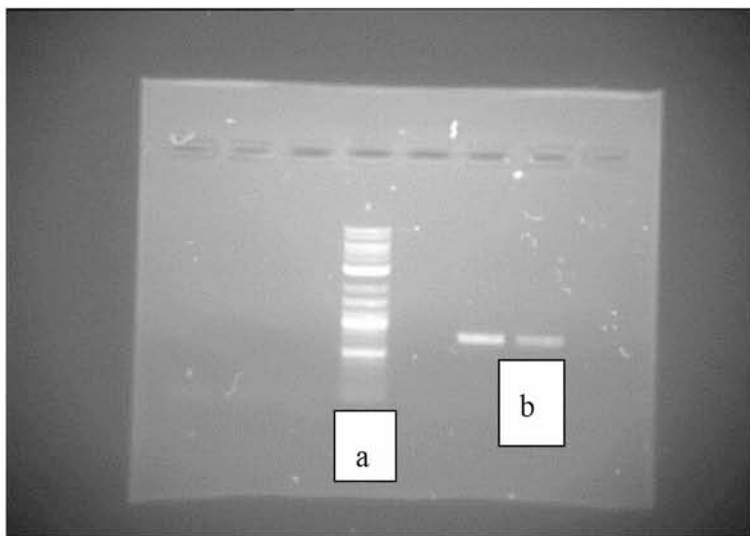
Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 18, 19, 20, 21) βλέπουμε τα προϊόντα της PCR για τα γονίδια 16s RNA, PCR *gyrB* και PCR *rPOD* τα οποία ηλεκτροφορήσαμε σε gel αγαρόζης 0,8% στα 100V. Σύμφωνα με αυτά τα προϊόντα στάλθηκαν οι αλληλουχίες για αλληλούχιση και από την ανάλυση τους χρησιμοποιώντας το βασικό εργαλείο αναζήτησης (Blast) v+2.7.1 Πίνακα 15. Στην συνέχεια, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 22) στο οποίο φαίνεται ότι το βακτήριο μας έχει συγγένεια με την *P. sp FSL W5-0203* και την *P. fluorescens FH5*.



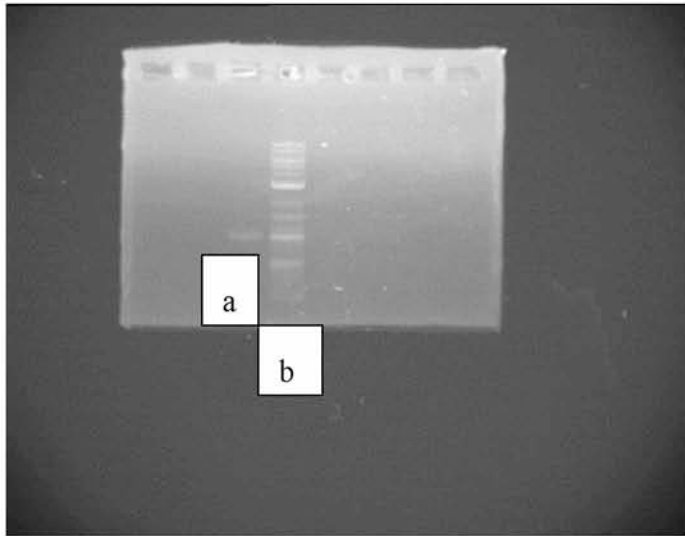
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0,8% στα 100V α)GDNA του *Pseudomonas* sp, b) ladder



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0,8% στα 100V a) PCR8F-1512R, b) ladder, c) PCR gyrB, d) ladder and e) PCR rPOD



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0,8% στα 100V a) ladder and b)PCR rPOD

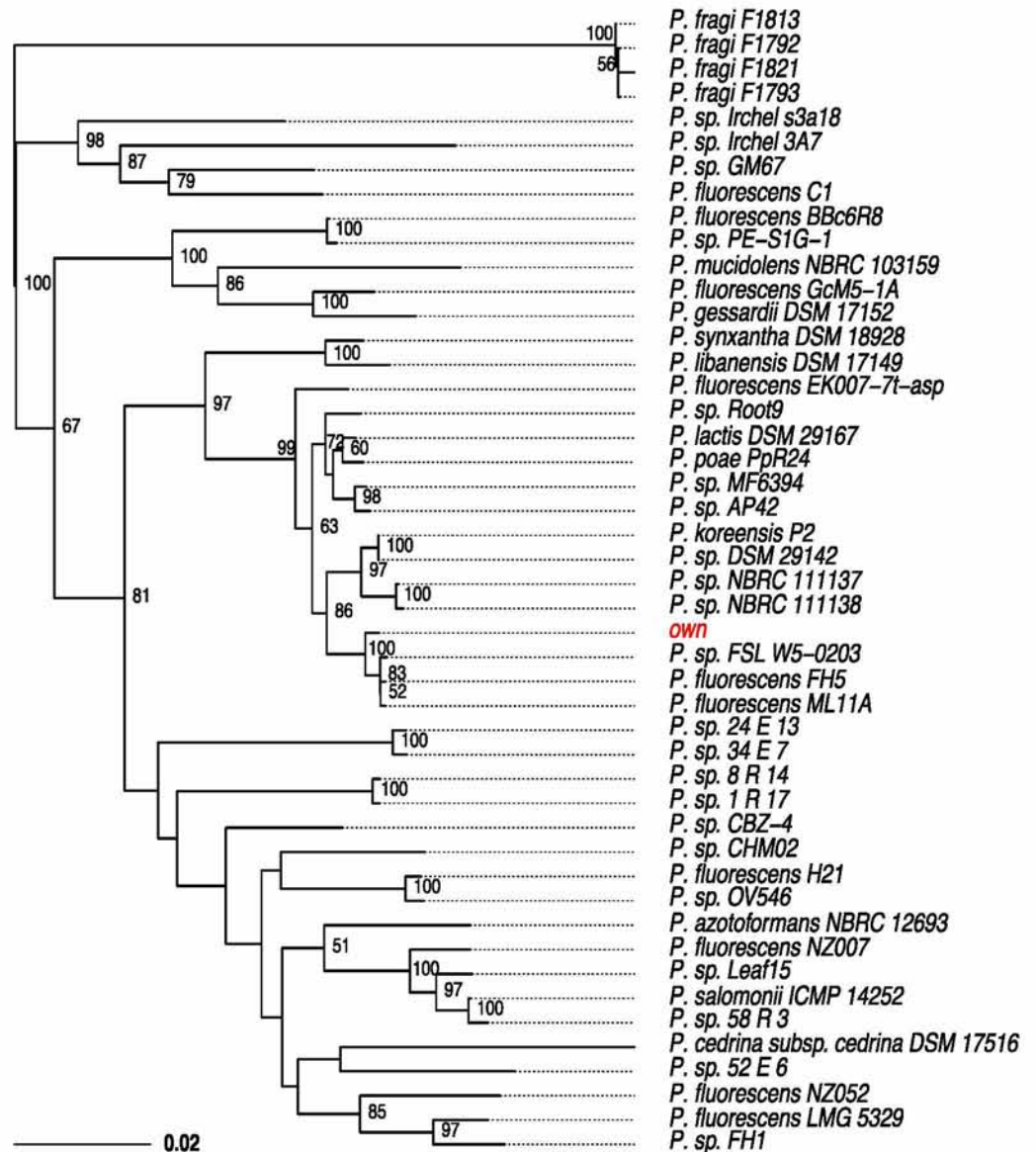


Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0,8% στα 100V a) PCR gyrB b) ladder

Πίνακας 15: Αποτελέσματα αλληλουχιών της PCR 16s RNA, GYRB και rPOD

GENE	ACCESSION NUMBER	MICROORGANISM	SEQUENCEID	IDENTITIES
16s 1500bp	HB8WYDR4015	Uncultured Pseudomonas sp. Clone Rt6M10	KF717080.1	1486/1518 (98%)
		Pseudomonas fluorescens gene for 16s ribosomal RNA, partial sequence, strain: 4-1-3	AB968092.1	1484/1516 (98%)
		Pseudomonas azotoformans strain F77	CP019856.1	1485/1518 (98%)
		Pseudomonas fluorescens strain Pt 14	gi 1070898254 CP0172 96.1	1485/1518(98 %)
		Pseudomonas fluorescens A506	gi 387159426 CP00304 1.1	1485/1518(98 %)
GYRB 1000bp	HAWFGPFZ014	Pseudomonas sp. bs2935	gi 1085799158 LT6297 44.1	928/940(99%)
		Pseudomonas fluorescens strain Pt 14	gi 1070898254 CP0172 96.1	928/940 (99%)
		Pseudomonas fluorescens A506	gi 387159426 CP00304 1.1	928/940(99%)

RpoD 700bp	HB0CMGPU014	Pseudomonas sp. bs2935	gi 1085799158 LT6297 44.1	455/458(99%)
		Pseudomonas fluorescens strain Pt14	gi 1070898254 CP0172 96.1	455/458(99%)
		Pseudomonas fluorescens A506	gi 387159426 CP00304 1.1	455/458(99%)



Εικόνα 22: Φυλογενετικό δένδρο του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. (η λέξη own αντιστοιχεί στην δική μας *Pseudomonas* sp)

4.2 Αποτελέσματα Βιοχημικών δοκιμών

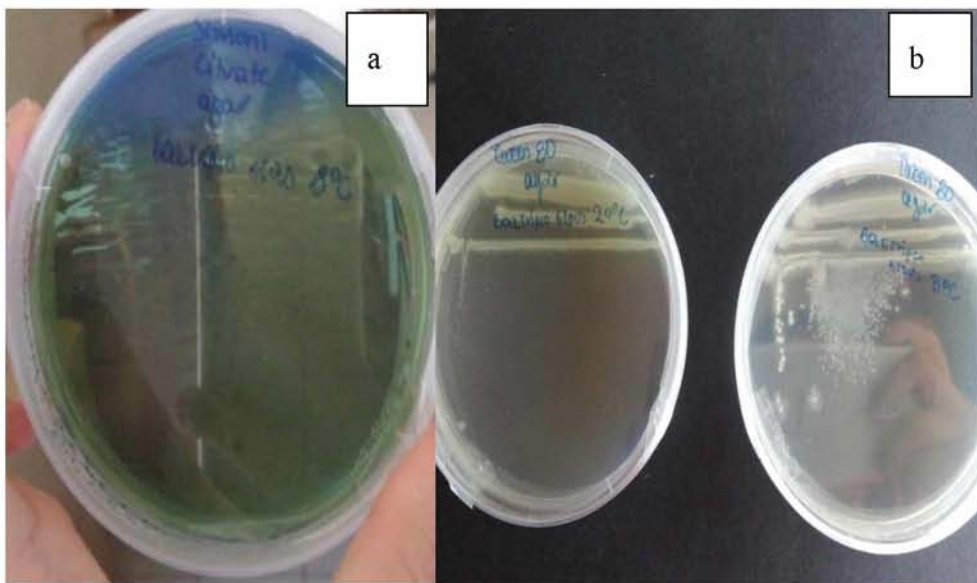
Σύμφωνα με τις βιοχημικές δοκιμές που πραγματοποιήσαμε είχαμε τα εξής αποτελέσματα: Ουρεάση αρνητικό δηλαδή στο κεκλιμένο σωλήνα με Urea Agar είχαμε αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος από ανοιχτό ροζ σε φούξια που σημαίνει ότι είναι αρνητικό. Όταν απλώσαμε την αποικία πάνω στην ταινία για το test οξειδάσης είχαμε αλλαγή του χρώματος από άσπρο σε μπλε οπότε είχαμε θετικό αποτέλεσμα (Εικόνα 23a). Για το test της καταλάσης όταν ρίξαμε μερικές σταγόνες από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) 35% πάνω στις αποικίες είχαμε έντονο αφρισμό δίνοντας μας έτσι θετικό αποτέλεσμα (Εικόνα 23b). Για την διάσπαση του κιτρικού οξέος όταν επιστρώσαμε στο υπόστρωμα Simmons Citrate Agar είχαμε αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε μπλε όπου σημαίνει ότι είχαμε διάσπαση του κιτρικού οξέος (Εικόνα 24a). Στο τεστ λιπόλυσης όταν επιστρώσαμε στο Tween 80 Agar μια καλλιέργεια των 8°C και μια καλλιέργεια των 25°C παρατηρήσαμε ότι μόνο στους 25°C είχαμε εμφανή ζώνη λιπόλυσης ενώ στους 8°C δεν είχαμε (Εικόνα 24b).

Πίνακας 16: Βιοχημικές δοκιμές του βακτηρίου *Pseudomonas sp*

Ουρεάση	Αρνητικό
Οξειδάση	Θετικό
Καταλάση	Θετικό
Citrate Utilization	Θετικό
Λιπόλυση	Θετικό στους 8°C, αρνητικό στους 20°C



Εικόνα 23: Τεστ οξειδάσης (αριστερά) και Τεστ καταλάσης (δεξιά)



Εικόνα 24: Διάσπαση του κιτρικού οξέος (αριστερά) και τέστ λιπόλυσης (δεξιά).

4.3 Μελέτη κινητικότητας και μεγέθους κυττάρων

4.3.1 Μελέτη κινητικότητας

Η κινητικότητα των κυττάρων μελετήθηκε στο μικροσκόπιο με 0,1ml εναιώρημα κυττάρων πρόσφατης καλλιέργειας, μετά από τοποθέτηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, χρώση με αραιωμένη φουξίνη και προσθήκη καλυπτρίδας. Τα κύτταρα παρουσίαζαν έντονη κινητικότητα καθώς κινούνταν διαρκώς σε διαφορετικές κατευθύνσεις.

4.3.2 Μελέτη μεγέθους των κυττάρων μετά από διήθηση

Έπειτα από την διήθηση του βακτηρίου που πραγματοποιήθηκε σε φίλτρα με πόρους 0,45μm αλλά και από 0,2μm και αφού επιστρώσαμε το διήθημα σε Potato Dextrose Agar παρατηρήσαμε ότι είχε την ικανότητα να περνάει και από τα 2 φίλτρα (Εικόνα 24).

4.4 Μελέτη μελανίνης βακτηρίου σε υγρό ζύμωσης Potato Dextrose Agar

Έπειτα από την διήθηση του υγρού ζύμωσης με φίλτρα 0,45μm φασματοφωτομετρήσαμε για την μελέτη της μελανίνης στα 400nm. Οι τιμές της απορρόφησης ήταν 1,886 (Εικόνα 25) ενώ με αραιώση 1/10 του δείγματος μας η απορρόφηση μας ήταν 0,192.



Εικόνα 24: Διήθηση με φίλτρο 0,45μm(αριστερά) και 0,2μm(δεξιά)



Εικόνα 25: Διήθημα καλλιέργειας βακτηρίου για την μέτρηση μελανίνης

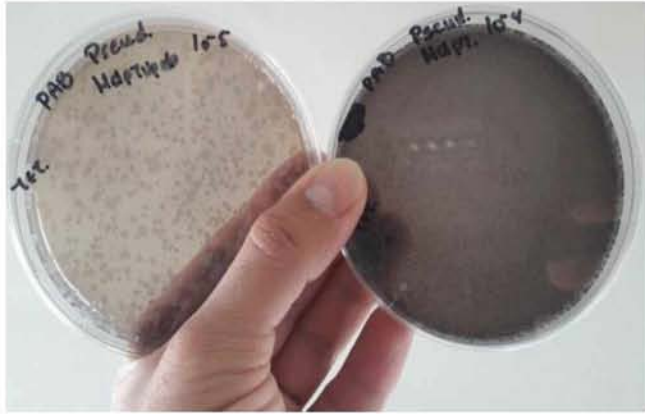
4.5 Μελέτη εμφάνισης αποικιών ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου σε διαφορετικά υποστρώματα γενικής χρήσεως αλλά και σε εκλεκτικά με και χωρίς την χρήση αντιβιοτικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μπορεί και αναπτύσσεται εξίσου καλά για παράδειγμα στο Potato Dextrose Agar το οποίο είναι ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των μυκήτων αλλά και στο Rose Bengal Chloramphenicol Agar με την προσθήκη Chloramphenicol το οποίο είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο προστίθεται στο υπόστρωμα για να αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Ακόμα, σε κάποια υποστρώματα όπως φαίνεται και από τον πίνακα έχουμε την εμφάνιση ενός μπλε- μαύρου χρώματος το οποίο ενδέχεται να είναι μελανίνη.

Πίνακας 17: Υποστρώματα, θερμοκρασίες επώασης και εμφάνιση αποικιών του βακτηρίου

<u>ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ</u>	<u>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ</u> <u>ΕΠΩΑΣΗΣ</u>	<u>ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ</u>
CN agar (Pseudomonas agar base + Cetrимide and Nalidixic acid)	37°C	Μικρές φθορίζουσες Μπεζ-κίτρινες αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
CFC agar (Cephalothin-Sodium Fusidate Cetrимide Agar)	20°C	Φθορίζουσες μπες-κίτρινες αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar)	20°C	Πράσινες- μαύρες με παραγωγή μαύρης χρωστικής
RBCA (Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base + Chloramphenicol supplement)	30°C	Ροζ αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
PDA(Potato Dextrose Agar)	22°C	Μαύρες-λαδί αποικίες με μαύρη χρωστική
SDA(Sabourand Dextrose Agar)	22°C	Μαύρες-λαδί αποικίες με μαύρη χρωστική

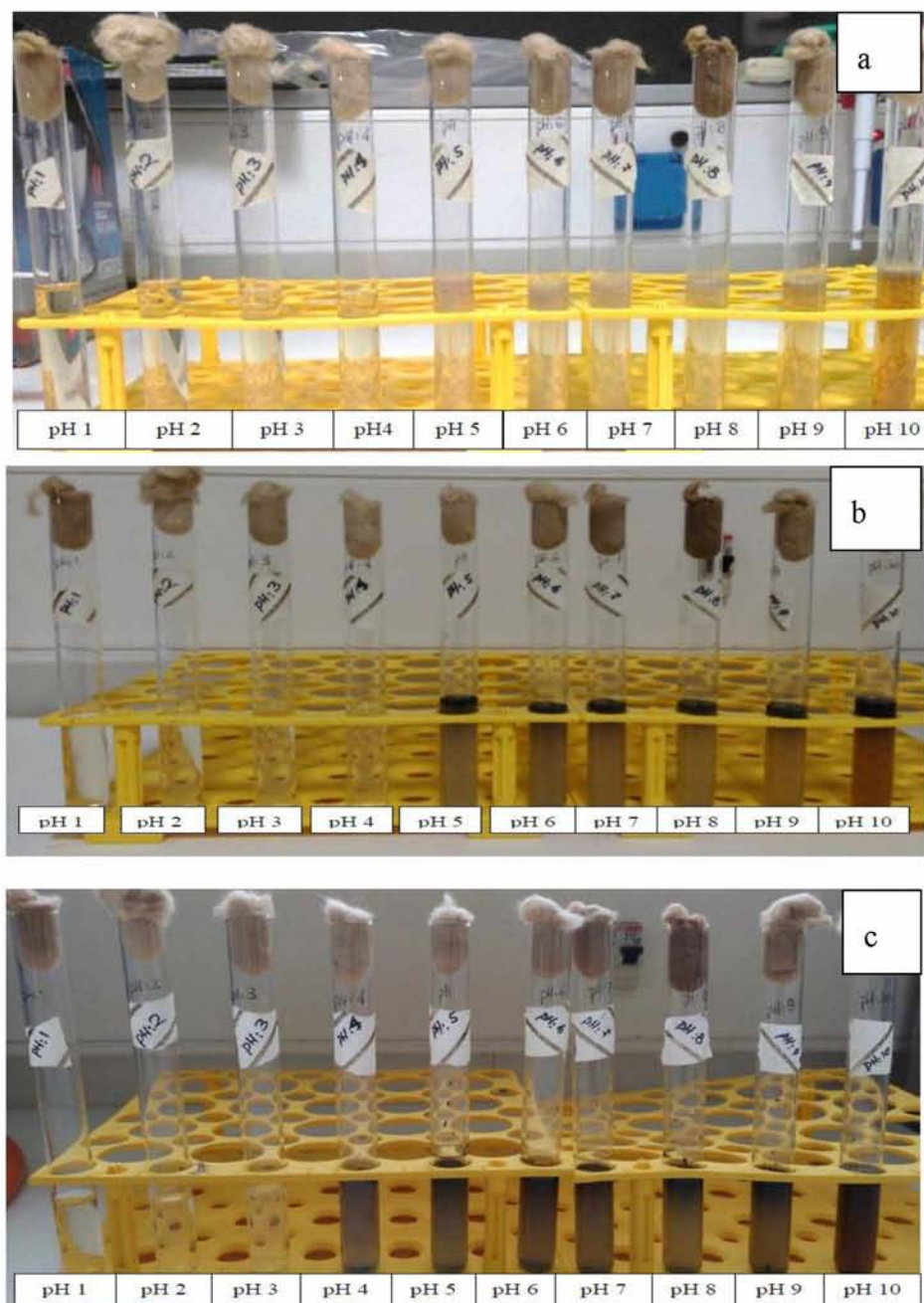
MALT AGAR	22°C	Μαύρες-λαδί αποικίες με μαύρη χρωστική
BLOOD AGAR	30°C	Ροζ αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
MAC-CONKEY	30°C	Ροζ αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
PDA+POLYMXIN B	22°C	Μαύρες αποικίες με μαύρη χρωστική
VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)	37°C	Μωβ αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
PCA(Plate Count Agar)	30°C	Μπεζ αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
Luria Bertani	22°C	Άσπρο αποικίες χωρίς μαύρη χρωστική
MÜLLER-HINTON	22°C	Καφέ με μικρή παραγωγή μαύρης χρωστικής
TSB (Tryptic Soy Broth)	22°C	Μαύρο-καφέ με μαύρη χρωστική (γρήγορη ανάπτυξη)
PDB(Potato Dextrose Broth)	22°C	Μαύρο με πολύ μαύρη χρωστική
Glucose Bromocresol Purple Agar	22°C	Μωβ αποικίες με μαύρη χρωστική
Dextrose Tryptone Agar	25°C	Μαύρες αποικίες
TSC Agar	37°C	Καμία ανάπτυξη



Εικόνα 26: Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της *Pseudomonas sp* σε Pseudomonas Agar Base. Όπως φαίνεται στην μικρότερη αραιώση (δεξιά) έχουμε πιο έντονο το μαύρο χρώμα, δηλαδή η ένταση του μαύρου χρώματος και η παραγωγή της χρωστικής είναι ανάλογη του πληθυσμού των κυττάρων.

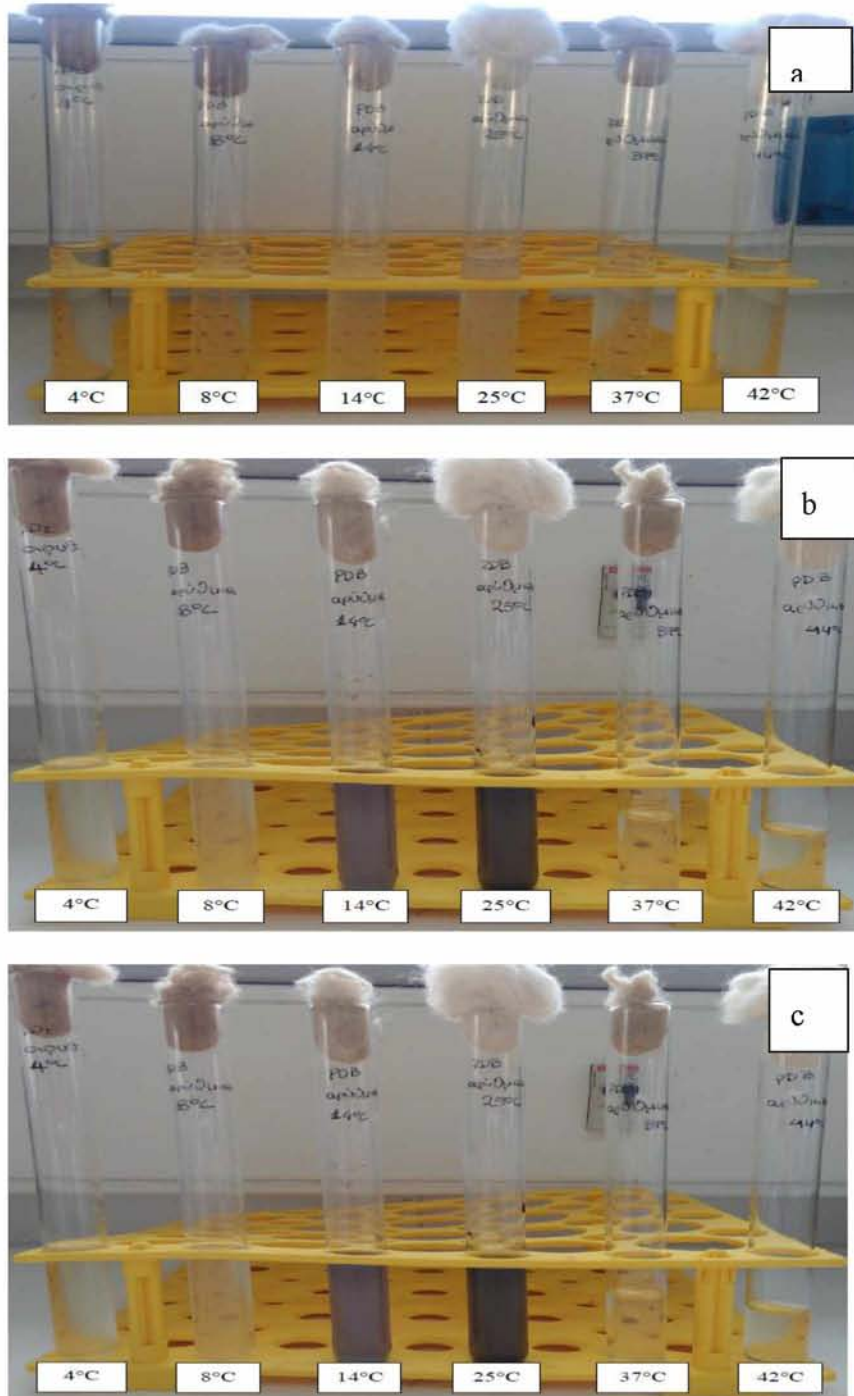
4.5.1 Μελέτη φυσιολογίας και συνθηκών ανάπτυξης

Στην παρακάτω εικόνα 25 (Α, Β και Γ) έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου σε σωλήνες με Potato Dextrose Broth με ρυθμισμένο pH από το 1 μέχρι το 10. Παρατηρούμε ότι ήδη από την 2d έχουμε εμφανή την εμφάνιση θολώματος (το οποίο υποδεικνύει ανάπτυξη) από το pH 5 μέχρι το pH 10. Από τις 8d έχουμε ανάπτυξη από το pH 4 μέχρι το pH 10 και την εμφάνιση του μπλε- μαύρου χρώματος πλέον.



Εικόνα 25: Εμβολιασμός με 0,1ml από την καλλιέργεια του βακτηρίου στα σωληνάκια με ρυθμισμένο pH και επώαση στους 25°C x 2d (Α), 25°C x 4d (Β), 25°C x 8d (Γ).

Στην εικόνα 26 (Α, Β, Γ) έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου σε σώληνες με Potato Dextrose Broth με pH 5 και επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρατηρούμε ότι από την 2d έχουμε ανάπτυξη από τους 4°C μέχρι τους 25°C. Από τις 4d μέχρι και τις 8d μόνο στα σωληνάκια των 14°C και 25°C έχουμε την εμφάνιση του μπλε χρώματος ενώ στους 4°C και 8°C δεν μαυρίζει.



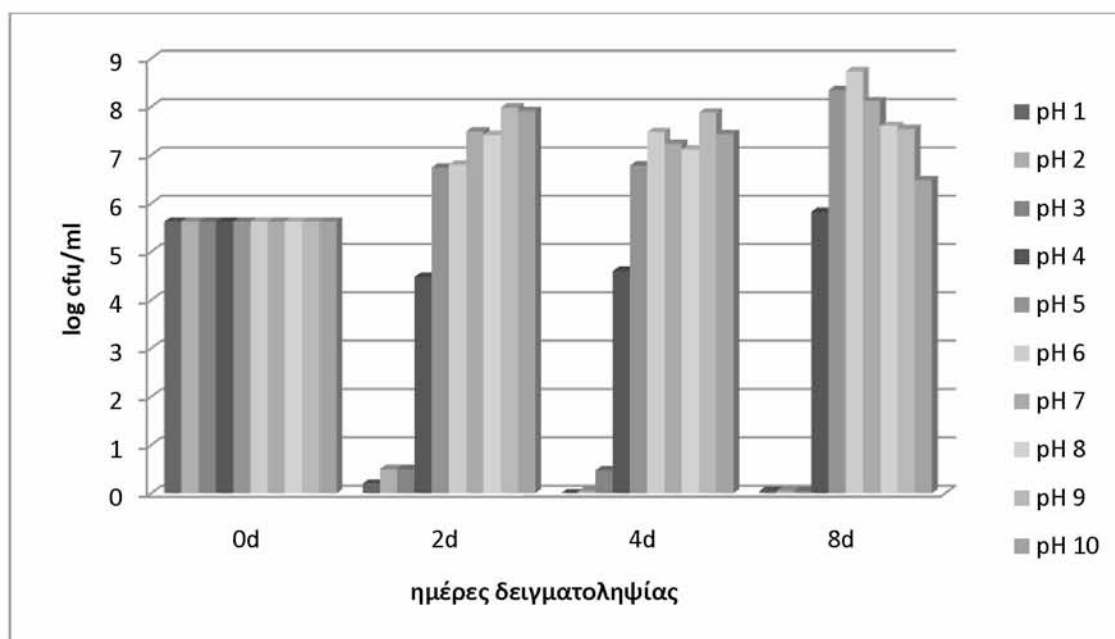
Εικόνα 26: Εμβολιασμός με 0,1ml από την καλλιέργεια σε σωληνάκια με pH 5 και επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες Α (2d), Β (4d), Γ (8d).

Στην εικόνα 27 (Α,Β, Γ) έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου σε σωλήνες με Potato Dextrose Broth σε pH 5, θερμοκρασία επώασης 25°C και διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (NaCl) 0% μέχρι 5%. Από τις 2d έχουμε ανάπτυξη και στο 0% (χωρίς αλάτι) στο 1% και στο 2% αν και βλέπουμε ότι έχουμε πιο έντονη παραγωγή του μαύρου χρώματος στο 1% και 2% σε σχέση με τον μάρτυρα. Το ίδιο ισχύει και για τις 4d και τις 8d.



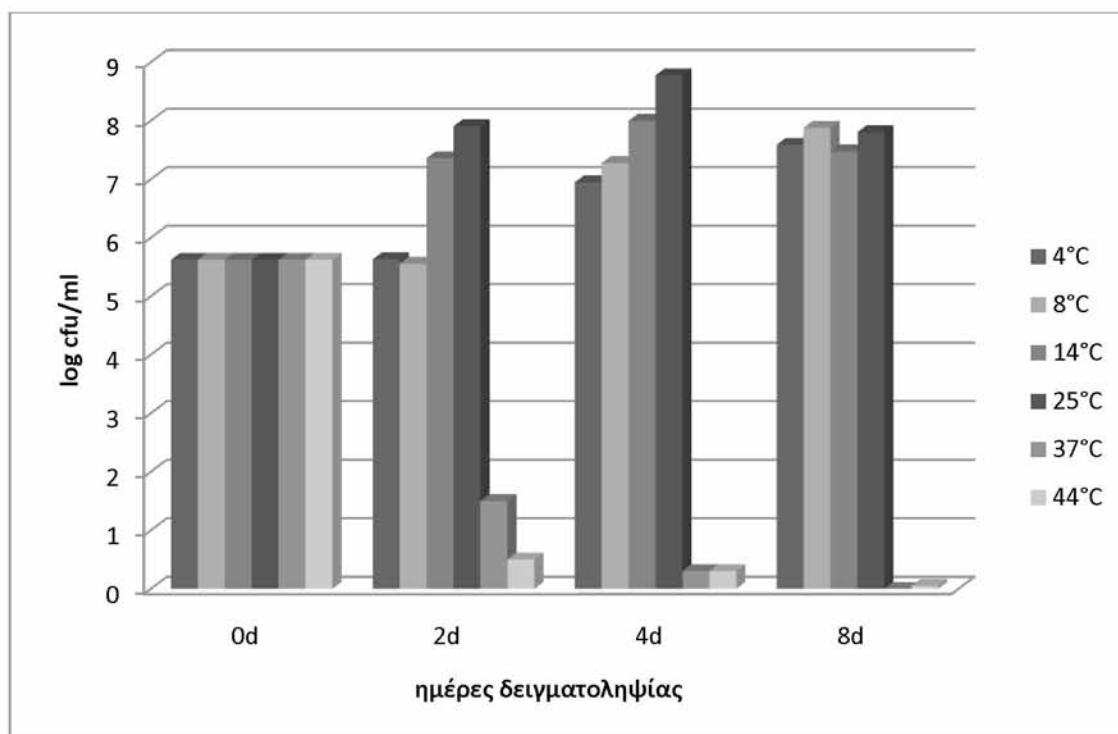
Εικόνα 27: Εμβολιασμός με 0,1ml από την καλλιέργεια του βακτηρίου στα σωληνάκια με pH 5, διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος και επώαση στους 25°C x 2d (Α), 25°C x 4d (Β), 25°C x 8d (Γ).

Στο Διάγραμμα 1 έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth με ρύθμιση του σε διαφορετικά pH και επώασης τους στους 25°C. Από τις 2d μέχρι τις 8d έχουμε ανάπτυξη του βακτηρίου από το pH 5 μέχρι το pH 10 με βέλτιστο pH το 9.



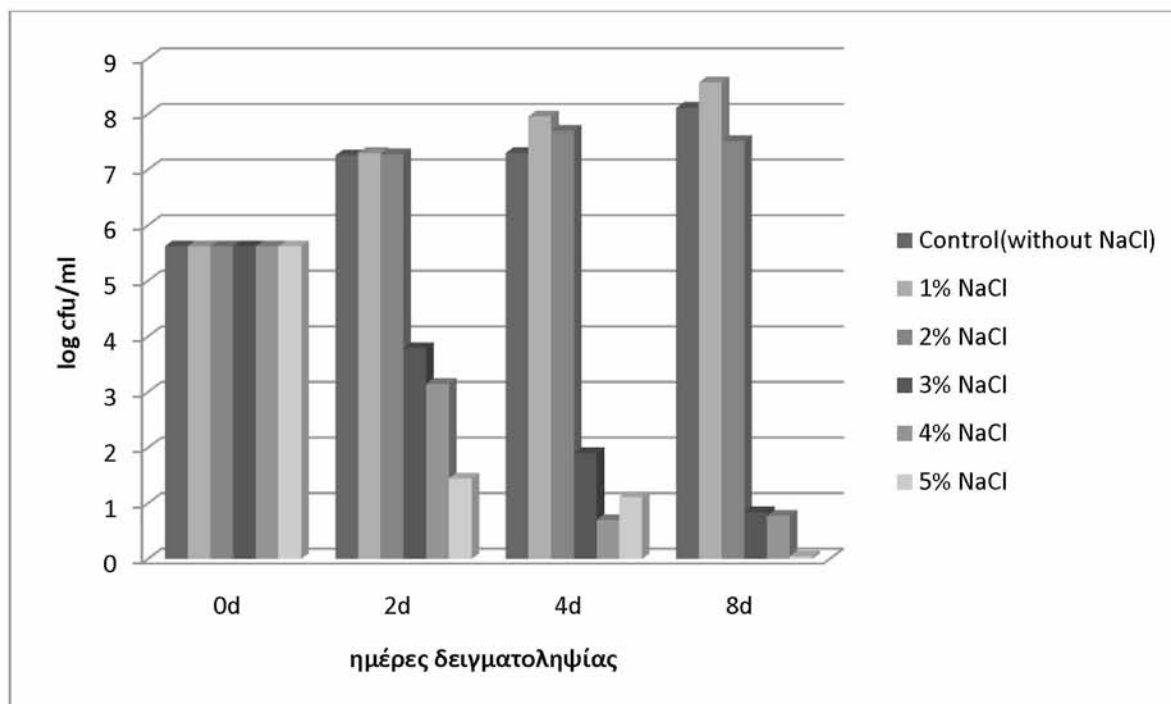
Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth με ρύθμιση του σε διαφορετικά pH και επώασης τους στους 25°C.

Στο Διάγραμμα 2 έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth (χωρίς ρύθμιση του pH) σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης. Το βακτήριο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται από τους 4°C μέχρι τους 25°C καθ' όλη την διάρκεια των δειγματοληψιών με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25°C



Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth (χωρίς ρύθμιση του pH) σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης.

Στο Διάγραμμα 3 έχουμε την ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth (χωρίς ρύθμιση του pH) έπειτα από την προσθήκη NaCl σε διάφορες συγκεντρώσεις και επώασης τους στους 25°C. Το βακτήριο μπορεί και αναπτύσσεται και στο 1% και στο 2% NaCl ενώ από το 3%-5% αναστέλλεται. Στο 1% έχουμε την καλύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου.



Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp* σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth (χωρίς ρύθμιση του pH) έπειτα από την προσθήκη NaCl σε διάφορες συγκεντρώσεις και επώασης τους στους 25°C.

4.6 Έλεγχος σπορογονίας

Έπειτα από τον βρασμό του βακτηρίου σε διαδοχικές θερμοκρασίες βρασμού πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακας 18).

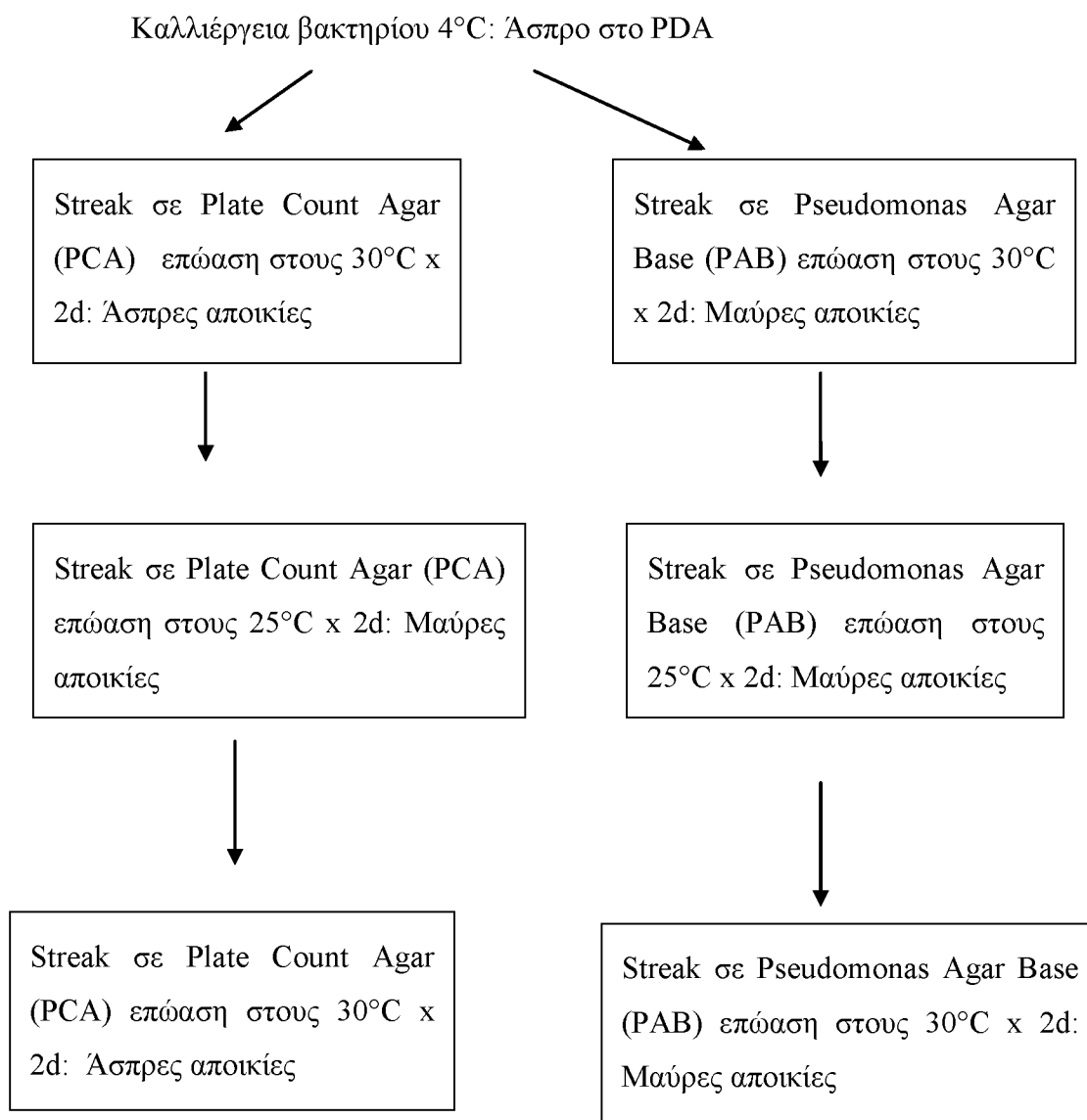
Πίνακας 18: Έλεγχος σπορογονίας σε διαφορετικές θερμοκρασίες βρασμού

Δείγμα - Θερμοκρασία βρασμού	Υπόστρωμα Dextrose Tryptone Agar	Υπόστρωμα Potato Dextrose Agar
Μάρτυρας χωρίς βρασμό	+	+
Δείγμα + 50°C x10'	+	+
Δείγμα + 60°C x10'	+	+
Δείγμα + 70°C x10'	-	-
Δείγμα + 80°C x10'	-	-

(Το+ στον πίνακα σημαίνει ανάπτυξη ενώ το – σημαίνει ότι δεν έχουμε ανάπτυξη)

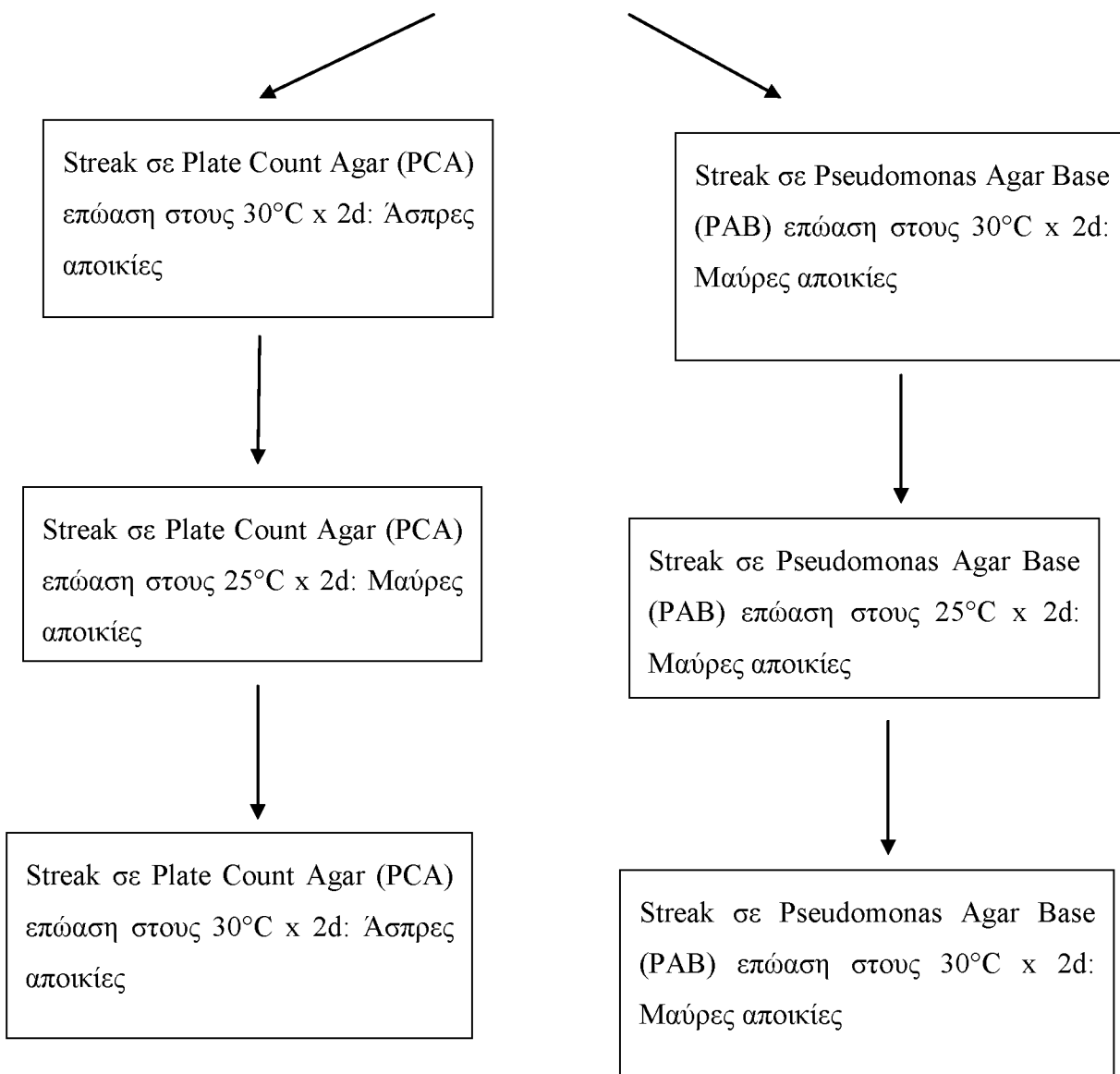
4.7 Έλεγχος αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο.

Στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση έχουμε τον έλεγχο της αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο για το βακτήριο που καλλιεργούνται στους 4°C. Με βάση την εναλλαγή του χρώματος του βακτηρίου ανάλογα με την θερμοκρασία επώασης και με το υπόστρωμα αντιλαμβανόμαστε ότι η έκφραση της μελανίνης δεν είναι ένα επίκτητο χαρακτηριστικό.

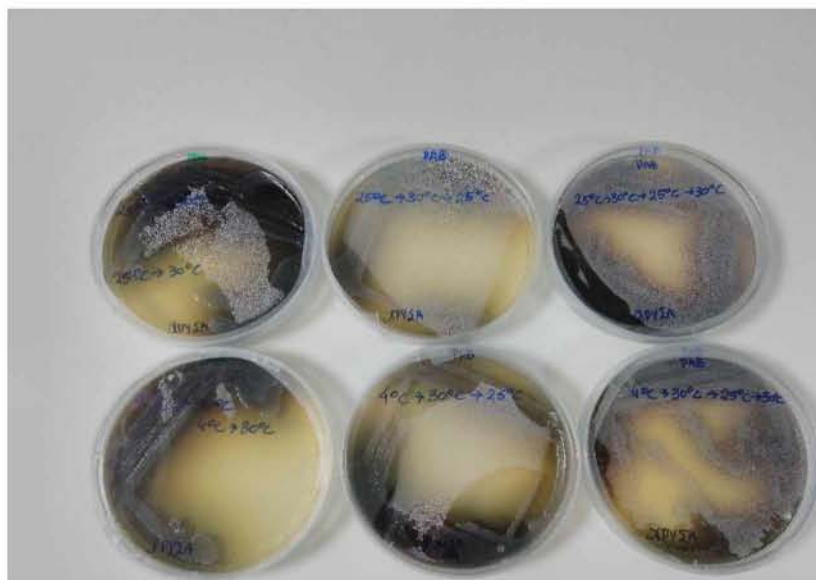


Στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση έχουμε τον έλεγχο της αντιστρεπτής έκφρασης μελανίνης από πλασμίδιο για το βακτήριο που καλλιεργούνται στους 4°C. Με βάση την εναλλαγή του χρώματος του βακτηρίου ανάλογα με την θερμοκρασία επώασης και με το υπόστρωμα αντιλαμβανόμαστε ότι η έκφραση της μελανίνης δεν είναι ένα επίκτητο χαρακτηριστικό.

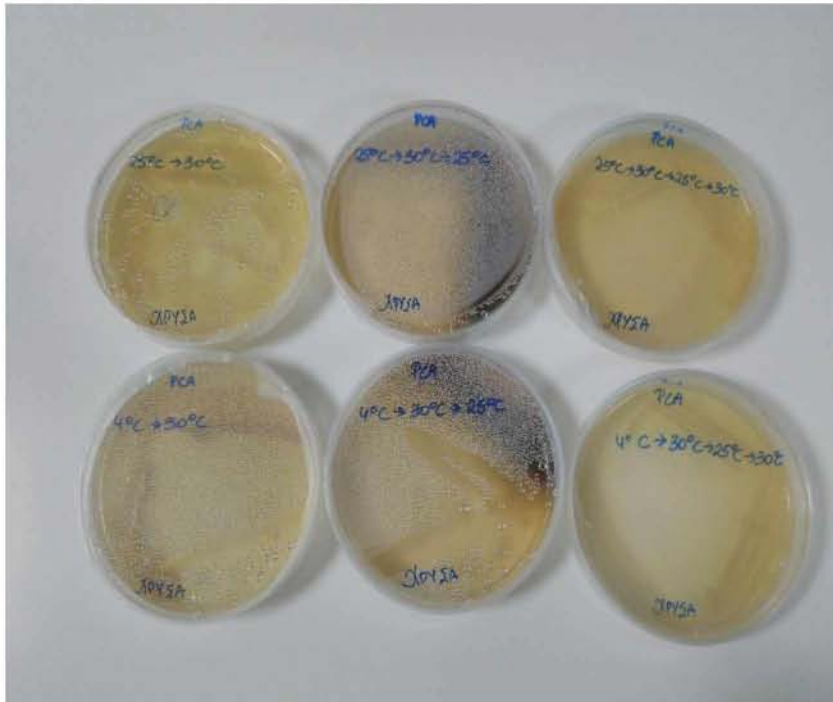
Καλλιέργεια βακτηρίου 25°C: Μαύρο στο PDA



Στην εικόνα 28a και 28b έχουμε την μελέτη της αντιστρεπτής έκφρασης της μελανίνης από πλασμίδιο. Στην εικόνα 28a στην πάνω σειρά έχουμε το βακτήριο με επίστρωση στο Pseudomonas Agar Base όπου έχουμε το βακτήριο μας που το έχουμε καλλιεργήσει στους 25°C (μαύρο) το επιστρώσαμε στο Pseudomonas Agar Base και το επωάσαμε στους 30°C και πάλι μαύρισε. Στην συνέχεια, παίρνοντας μια μεμονωμένη αποικία και κάνοντας πάλι επίστρωση το επωάσαμε στους 25°C όπου και πάλι μαύρισε. Τέλος, παίρνοντας πάλι μια μεμονωμένη αποικία και κάνοντας πάλι επίστρωση το επωάσαμε στους 25°C όπου και πάλι μαύρισε. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κάτω σειρά όπου έχουμε την *Pseudomonas sp* σε καλλιέργεια των 4 °C η οποία είναι άσπρη πήραμε τα ίδια αποτελέσματα με την καλλιέργεια των 25°C. Στην εικόνα 28b έχουμε ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία μόνο που η επίστρωση έγινε στο υπόστρωμα Plate Count Agar. Όπως παρατηρούμε όταν επιστρώνουμε την καλλιέργεια από τους 25 °C στους 30 °C δεν μαυρίζει ενώ όταν πάλι το επωάσουμε στους 25 °C μαυρίζει. Τέλος, όταν το ξανά επωάζουμε στους 30 °C πάλι δεν μαυρίζει. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κάτω σειρά όπου έχουμε την *Pseudomonas sp* σε καλλιέργεια των 4 °C η οποία είναι άσπρη πήραμε τα ίδια αποτελέσματα με την καλλιέργεια των 25°C.



Εικόνα 28a: Μελέτη της αντιστρεπτής έκφρασης της μελανίνης από πλασμίδιο στο υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base. Στην επάνω σειρά έχουμε το βακτήριο που καλλιεργούμε στους 25°C μετά στους 30°C , έπειτα 25°C και τέλος πάλι 30°C και όπως βλέπουμε σε όλες τις εναλλαγές μαυρίζει. Στην κάτω σειρά έχουμε το βακτήριο που το καλλιεργήσαμε στους 4°C ακολουθώντας τις ίδες εναλλαγές θερμοκρασίας .



Εικόνα 28b: Μελέτη της αντιστρεπτής έκφρασης της μελανίνης από πλασμίδιο στο υπόστρωμα Plate Count Agar Στην επάνω σειρά έχουμε το βακτήριο που καλλιεργούμε στους 25°C μετά στους 30°C , έπειτα στους 25°C και τέλος πάλι 30°C και όπως βλέπουμε σε όλες τις εναλλαγές μαυρίζει. Στην κάτω σειρά έχουμε το βακτήριο που το καλλιέργησαμε στους 4°C ακολουθώντας τις ίδες εναλλαγές θερμοκρασίας . Όπως φαίνεται και από την εικόνα και στις 2 περιπτώσεις μαυρίζει μόνο στους 25°C.

4.8 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης

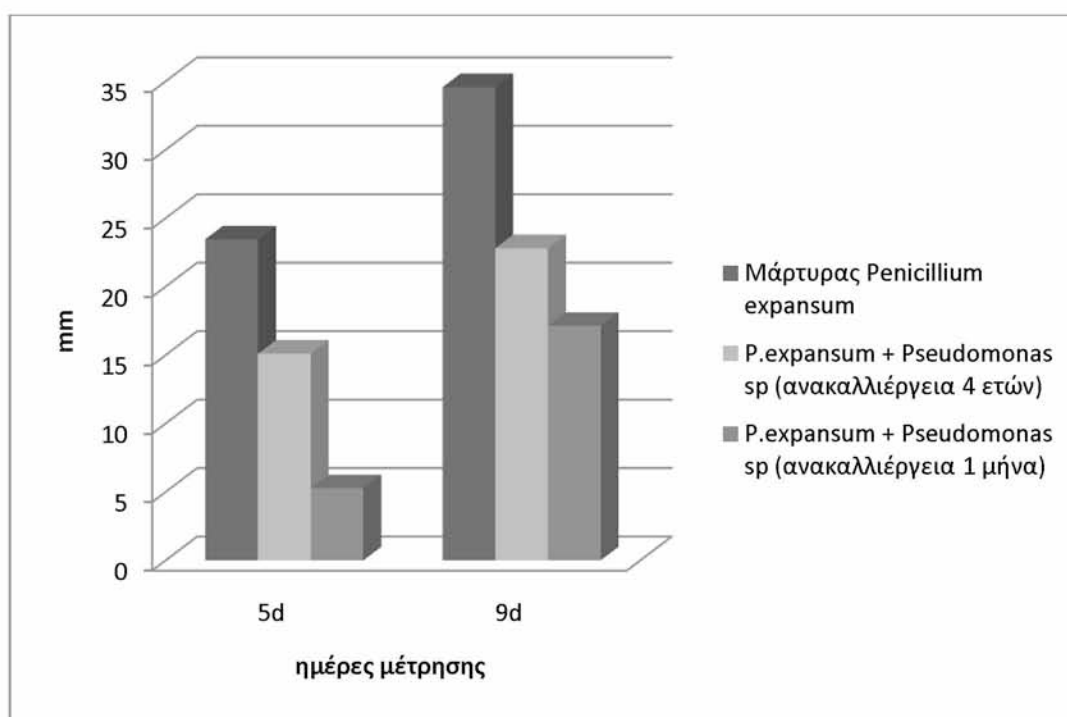
4.8.1 Μέτρηση ζωνών αναστολής σε βοθρία (well diffusion assay)

Ζώνες αναστολής σε βακτήρια

Σύμφωνα με τις μετρήσεις μας δεν είχαμε καμία ανασταλτική δράση από το βακτήριο *Pseudomonas sp* ενάντια σε παθογόνα βακτήρια ούτε από τα ζωντάνα κύτταρα, υπερκείμενο αλλά ούτε και από το ίζημα

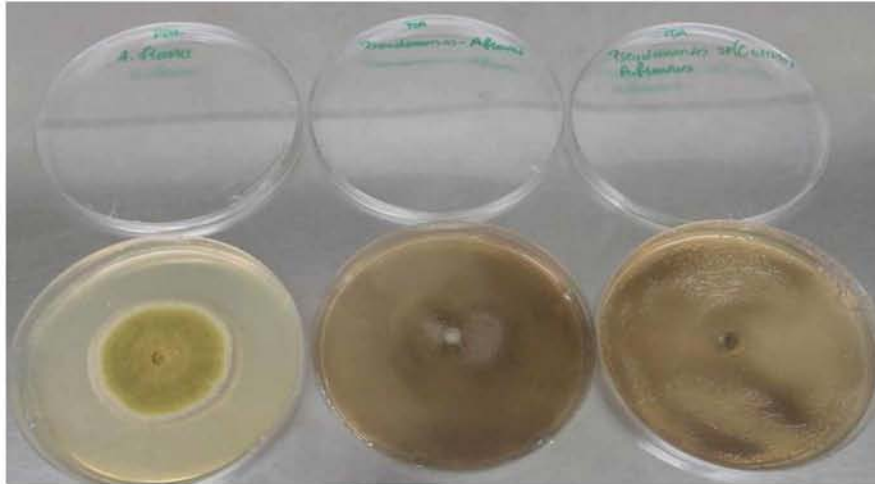
Ζώνες αναστολής σε μύκητες

Στο Διάγραμμα 4 με την μέτρηση του μυκηλίου του μύκητα *Penicillium expansum* έχουμε μείωση στο μυκήλιο και από τις 2 *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 4 ετών και ανακαλλιέργεια 1 μήνα). Στην *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) είχαμε μεγαλύτερη μείωση του μυκηλίου περίπου 15mm σε σχέση με τον μάρτυρα.

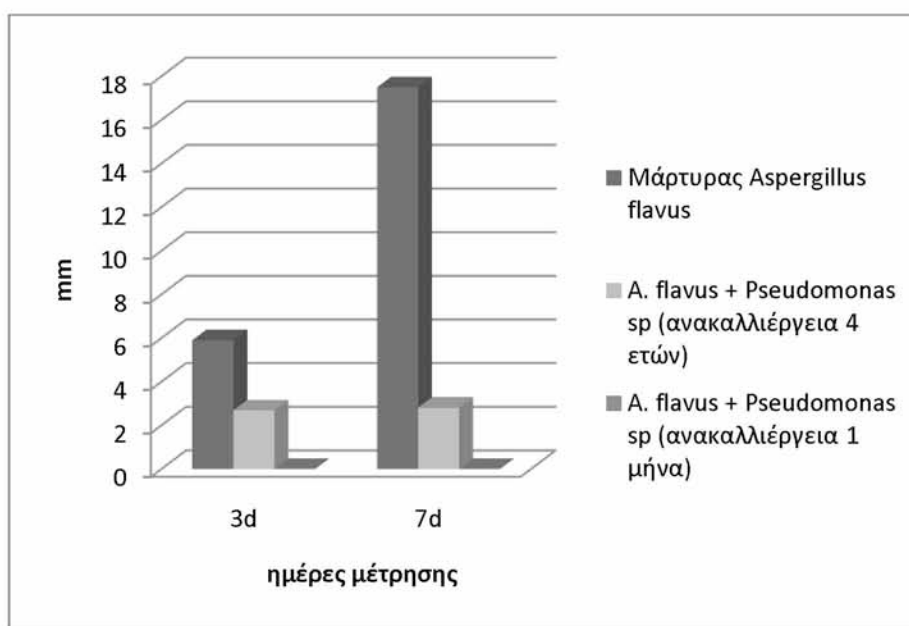


Διάγραμμα 4: Μέτρηση μυκηλίου του μύκητα *Penicillium expansum*.

Στην εικόνα 29 και στο Διάγραμμα 5 έχουμε την μέτρηση του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* (μάρτυρας) (αριστερά) *A. flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 4 ετών) (μέση), *A. flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 1 μήνα) (δεξιά). Όπως φαίνεται στο δεξιά τρυβλίο έχουμε αναστολή του μύκητα

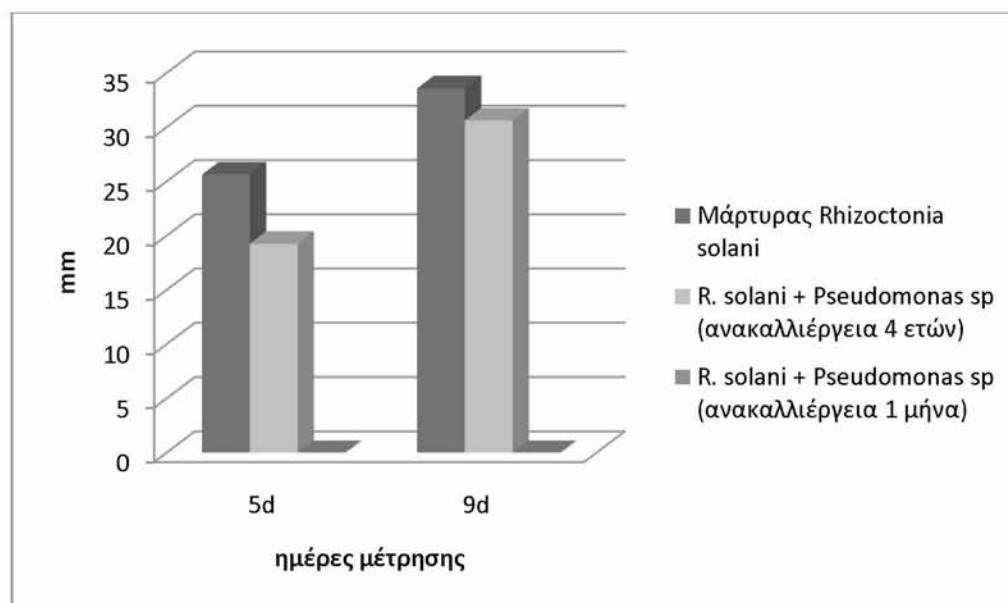


Εικόνα 29: Μέτρηση του μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus* από το κέντρο προς την περιφέρεια του τρυβλίου μετά από επίστρωση με 0,1ml εναιώρημα κυττάρων *Pseudomonas sp* και επώαση 12d x 25°C. Μάρτυρας μόνο με *A. flavus* (αριστερά), *A. flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 4 ετών) (μέση), *A. flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 1 μήνα) (δεξιά).



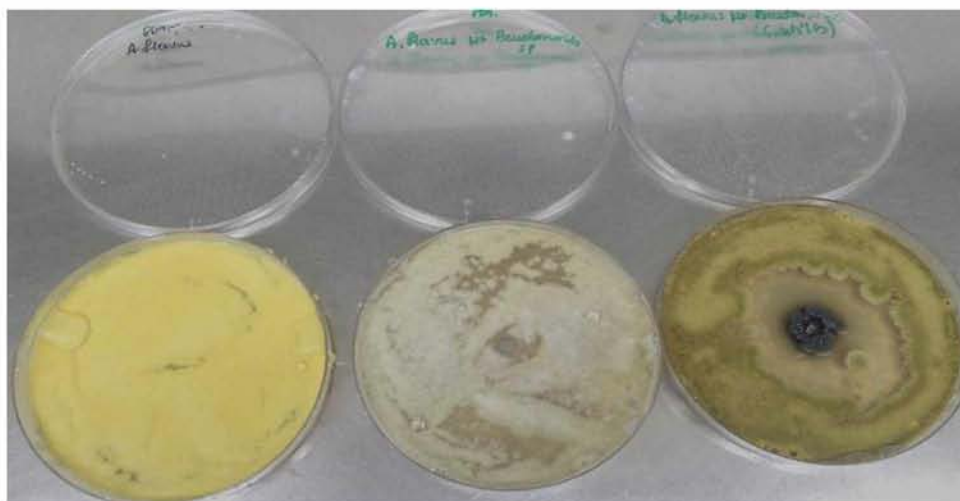
Διάγραμμα 5: Μέτρηση μυκηλίου του μύκητα *Aspergillus flavus*. Παρατηρούμε ότι και στις 2 μετρήσεις η *Pseudomonas* sp (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) ανέστειλλε την ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα.

Στο Διάγραμμα 6 έχουμε την μέτρηση του μυκηλίου του μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η *Pseudomonas* sp (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 4 ετών) μείωσε το μυκήλιο του μύκητα σε σχέση με τον μάρτυρα και η *Pseudomonas* sp (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 1 μήνα) ανέστειλλε την ανάπτυξη του μύκητα.



Διάγραμμα 6: Μέτρηση μυκηλίου του μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Στην εικόνα 29 έχουμε την μέτρηση της ζώνης αναστολής του μύκητα *Aspergillus flavus* μετά από επώαση 15d x 25°C. Όπως βλέπουμε στο τρυβλίο με τον *Aspergillus flavus* και την *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) είχαμε αναστολή του μύκητα.



Εικόνα30: Μέτρηση ζώνης αναστολής στον μύκητα *Aspergillus flavus*, μετά από επίστρωση 0,1ml εναιώρημα спорίων μύκητα και τοποθέτηση 20ml καλλιέργειας *Pseudomonas* στο βοθρίο στο κέντρο, μετά από επώαση 15 dx 25°C. Μάρτυρας μόνο με εμβόλιο *A. flavus* (αριστερά), *A. Flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 4 χρόνια) (κέντρο), *A.flavus* με *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια βακτηρίου 1 μήνα) (δεξιά).

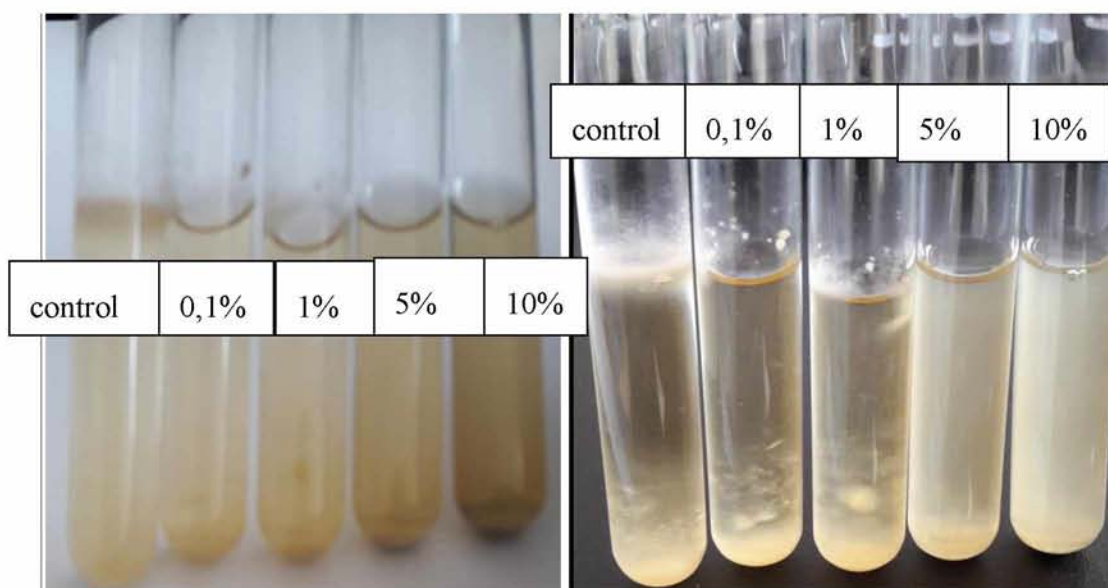
Στον πίνακα 19 έχουμε τις μετρήσεις των ζωνών αναστολής του βακτηρίου *Pseudomonas sp* με τους μύκητες *R.solani*, *A.flavus* και *P.expansum*. Σύμφωνα με τις μετρήσεις μας η αναστολή είναι διαφορετική σε κάθε μύκητα. Την μεγαλύτερη αναστολή έχουμε στον μύκητα *A.flavus*.

Πίνακας19: Ζώνες αναστολής μυκήτων από το βακτήριο *Pseudomonas sp*.

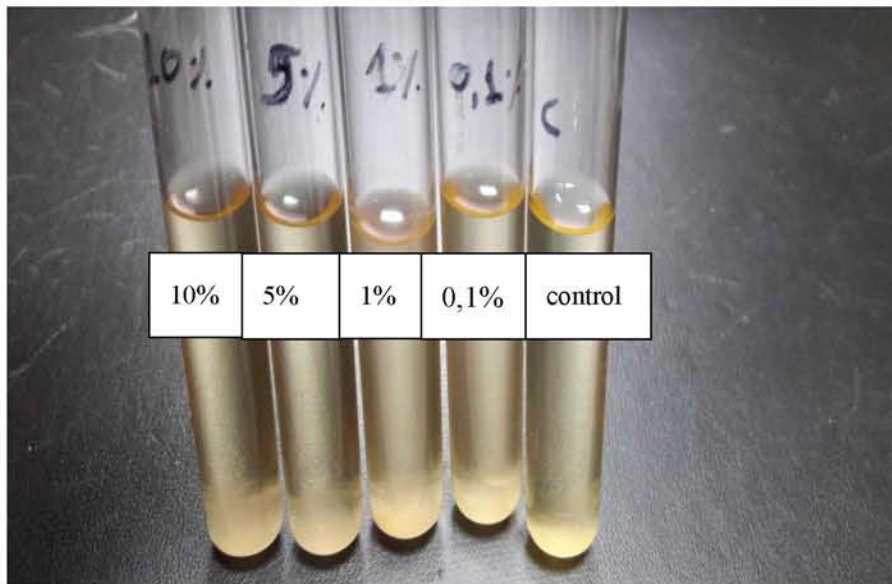
Ζώνες αναστολής (mm)	3d	9d
<i>Pseudomonas sp</i> (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) + <i>Rhizoctonia solani</i>	10,02	8,89
<i>Pseudomonas sp</i> (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) + <i>Aspergillus flavus</i>	26,38	15,9
<i>Pseudomonas sp</i> (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) + <i>P.expansum</i>	3,96	3,41

4.8.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου *Pseudomonas sp* ενάντια στους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Rhizoctonia solani*

Στις εικόνες 31 και 32 έχουμε την μέτρηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του βακτηρίου ενάντια στην *R.solani* με ολόκληρα κύτταρα και με διηθημένο υπερκείμενο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 31 στο 5% έχουμε αναστολή του μύκητα ενώ στην εικόνα 32 δεν έχουμε καμία ανασταλτική δράση από το διήθημα ενάντια στον μύκητα.

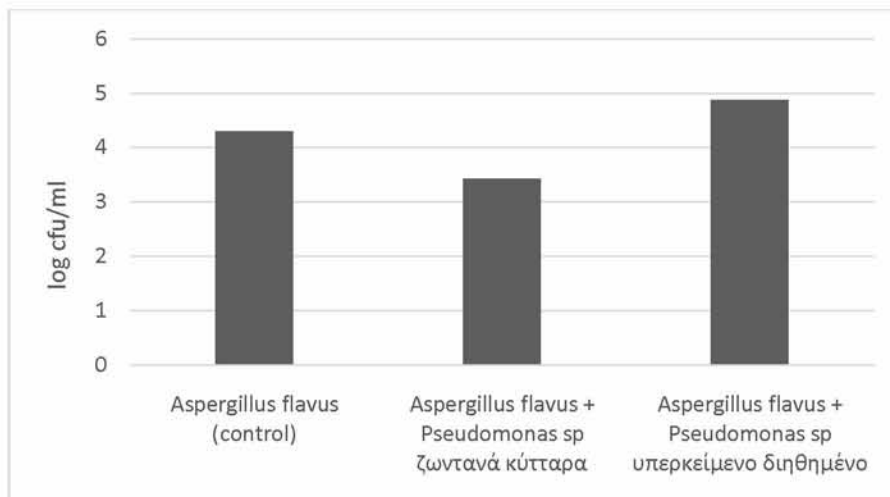


Εικόνα 31: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου *Pseudomonas sp* (ζωντανά κύτταρα) για τον μύκητα *Rhizoctonia solani* (από αριστερά προς τα δεξιά η ελάχιστη προς την μέγιστη συγκέντρωση του βακτηρίου). Παρατηρούμε ότι στο 5% και 10% έχουμε αναστολή του μύκητα. Επίσης, στην αριστερή εικόνα στο 5% και 10% παρατηρούμε μαύρο ίζημα το οποίο οφείλεται στην ανάπτυξη του βακτηρίου



Εικόνα 32: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου *Pseudomonas sp* (υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας, διηθημένο στα 0,45μm) για τον μύκητα *Rhizoctonia solani* (από αριστερά προς τα δεξιά η μέγιστη προς την ελάχιστη συγκέντρωση του βακτηρίου). Δεν παρατηρούμε καμία μείωση στο ίζημα της *Rhizoctonia solani* έπειτα από την προσθήκη του βακτηρίου σε σχέση με τον μάρτυρα.

Στο Διάγραμμα 10 έχουμε την μέτρηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης της *Pseudomonas sp* με τον *A.flavus*. Παρατηρούμε ότι με τα ζωντανά κύτταρα είχαμε μείωση 1log σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και με το διήθημα της *Pseudomonas sp*.



Διάγραμμα 10: Καταμέτρηση πληθυσμού *A. flavus* σε PDB (30°Cx 2d) ως μονοκαλλιέργεια – μάρτυρας (αριστερά), μετά από συγκαλλιέργεια με ίσο όγκο καλλιέργειας ζωντανών κυττάρων *Pseudomonas sp* (κέντρο), και μετά από συγκαλλιέργεια με το διήθημα (από φίλτρα 0,45μm) του υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας κυττάρων *Pseudomonas sp* (δεξιά).

4.8.3 Μέτρηση μείωσης πληθυσμού του μύκητα *Penicillium expansum* και της ζύμης *Rhodotorula mucilaginosa* μετά από συγκαλλιέργεια με το βακτήριο *Pseudomonas sp*

Στην εικόνα 33 έχουμε τον *Penicillium expansum* (μάρτυρας), *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* (στην μέση), *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* pasteurized (δεξιά). Παρατηρούμε ότι στην μεσαία κωνική έχουμε εμφανή μείωση στο μύκητα. Το ίδιο φαίνεται και στην εικόνα 34 έχουμε δηλαδή μείωση της ανάπτυξης του μύκητα.

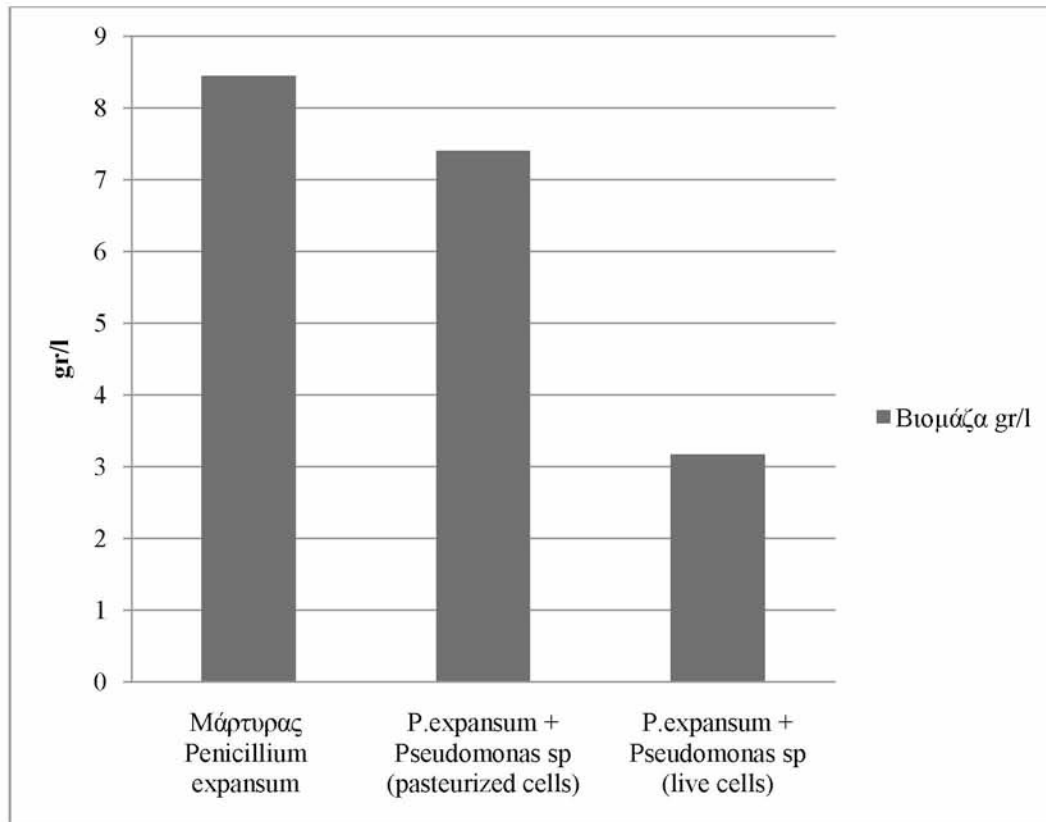


Εικόνα 33: *Penicillium expansum* (μάρτυρας), *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* (στην μέση), *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* pasteurized (δεξιά).



Εικόνα 34: Συγκαλλιέργεια *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* στις 3d ζύμωσης στα 250rpm x 25°C (τρυβλίο αριστερά) και συγκαλλιέργεια *Penicillium expansum-Pseudomonas sp* στις 18d ζύμωσης στα 250rpm x 25°C (τρυβλίο δεξιά).

Στο Διάγραμμα 8 έχουμε την μέτρηση της βιομάζας του μύκητα *P.expansum*. Παρατηρούμε ότι στην κωνική με την συγκαλλιέργεια της *Pseudomonas sp* 1ml και του *Penicillium expansum* 1ml έχουμε σημαντική μείωση στην βιομάζα του μύκητα σε σχέση τον μάρτυρα η οποία είναι περίπου στα 5gr/l (~60% μείωση βιομάζας).



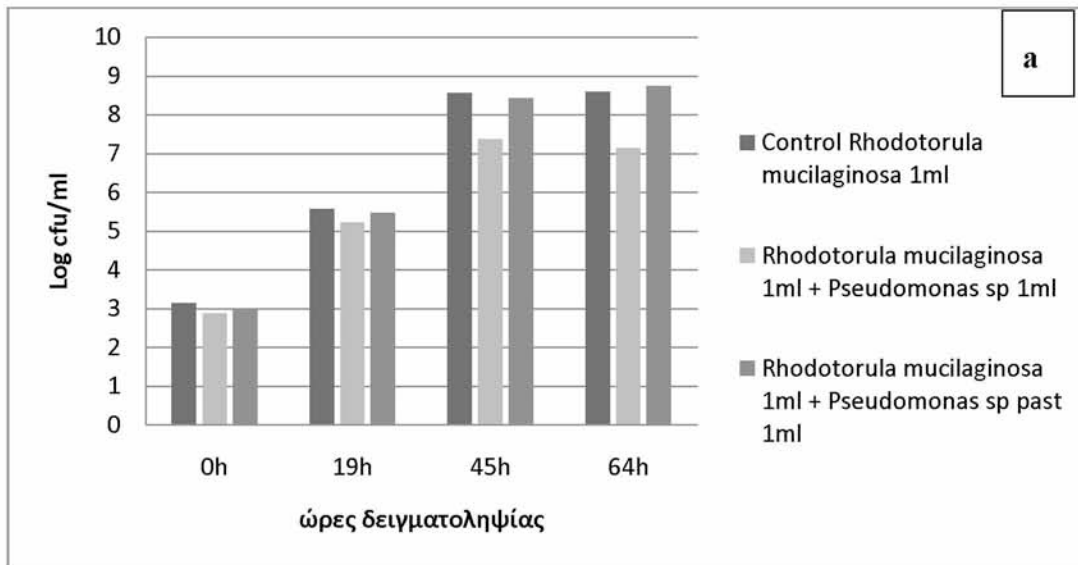
Διάγραμμα 7: Μέτρηση βιομάζας του μύκητα *Penicillium expansum* στις 8d ζύμωσης.

Στην εικόνα 48 έχουμε κωνικές με τις καλλιέργειες *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pseudomonas sp* και τις συγκαλλιέργειες *Rhodotorula mucilaginosa* – *Pseudomonas sp*, *Rhodotorula mucilaginosa*- *Pseudomonas sp* pasteurized

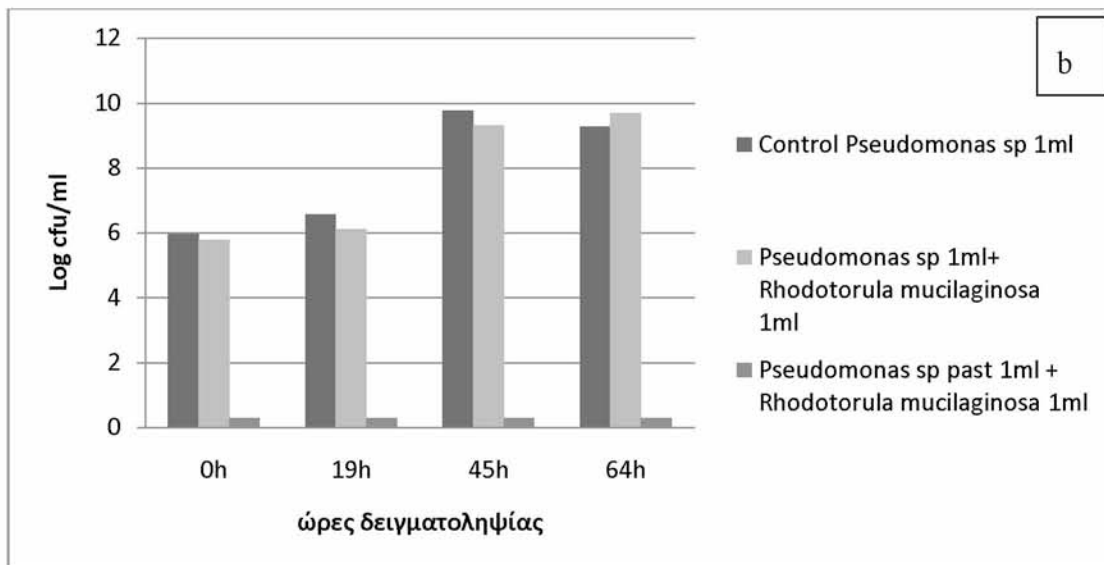


Εικόνα48: *Rhodotorula mucilaginosa* (μάρτυρας), *Pseudomonas sp* (μάρτυρας), *Rhodotorula mucilaginosa*- *Pseudomonas sp*, *Rhodotorula mucilaginosa*- *Pseudomonas sp* pasteurized (από αριστερά προς τα δεξιά) στις 64h ζύμωσης στα 250rpm x 25°C.

Στα Διαγράμματα 8a και 8b παρατηρούμε ότι σε όλες τις ώρες των δειγματοληψιών έχουμε μείωση στον πληθυσμό της *Rhodotorula mucilaginosa* στην κωνική με την συγκαλλιέργεια *Rhodotorula mucilaginosa* 1ml και *Pseudomonas sp* 1ml. Η σημαντικότερη μείωση παρατηρείται στις 45-64h η οποία είναι περίπου 1,1log σε σχέση με τον μάρτυρα. Ενώ ο πληθυσμός της *Pseudomonas sp* δεν επηρεάζεται από την προσθήκη της *Rhodotorula mucilaginosa*.



Διάγραμμα 8a: Καταμέτρηση του πληθυσμού της *Rhodotorula mucilaginosa* στα 250rpm στους 25°C.



Διάγραμμα 8b: Καταμέτρηση πληθυσμού *Pseudomonas sp* στα 250rpm στους 25°C.

4.9 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τις μοριακές και βιοχημικές δοκιμές πρόκειται για ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο ανήκει στο γένος *Pseudomonas* και έχει συγγένεια με την *Pseudomonas fluorescens* FH5 ή την *P.sp. FSL W5-0203*. Είναι θετικό για την παραγωγή οξειδάσης και καταλάσης, με κινητικότητα και έχει την ικανότητα να διασπά το κιτρικό οξύ, επίσης έχει λιπολυτική ικανότητα μόνο στους 8°C και όχι στους 20°C. Έχει την ικανότητα όταν διηθείται να περνάει από τα 0,45μm αλλά και από τα 0,2μm, το οποίο είναι ασύνηθες και καινούργιο, καθώς σχεδόν όλες οι *Pseudomonas* έχουν διάμετρο 0,5 μέχρι 1μm και σε μήκος 1,5 με 5μm (Palleroni et al., 1984) αν και το στέλεχος *Pseudomonas chlororaphilis* GP72 έχει διάμετρο 0,3-0,8 x 1-1,1μm (Liu et al., 2006). Κατά την διάρκεια της καλλέργειάς του παρατηρείται η ανάπτυξη ενός μπλέ-μαύρου χρώματος το οποίο συνάδει με την βιβλιογραφία καθώς υπάρχει μια νέα ομάδα που ανήκει στην *Pseudomonas fluorescens* που παράγει αυτήν την μπλε χρωστική αλλά ακόμα δεν έχει διερευνηθεί το γεγονός γιατί παράγει αυτήν την χρωστική και κάτω από ποιες συνθήκες (Andreani et al., 2015; Andreani et al., 2014; Martin et al., 2011). Ακόμα, δεν έχει ταυτοποιηθεί η χρωστική αυτή. Επίσης, σύμφωνα με την Andreani et al., 2015 η χρωστική αυτή παράγεται στους 6°C και 22°C στο Potato Dextrose Agar, ενώ εμείς σύμφωνα με τις μετρήσεις μας την βέλτιστη παραγωγή του μαύρου χρώματος την είχαμε μόνο στους 25°C καθώς στις χαμηλότερες θερμοκρασίες δεν παρατηρήθηκε μαύρος χρωματισμός των κυττάρων. Το βέλτιστο pH ανάπτυξης του βακτηρίου που μελετήθηκε είναι το pH 9, ενώ το βέλτιστο pH των *Pseudomonas* είναι συνήθως κοντά σε ουδέτερο pH (μπορούν και αναπτύσσονται και σε pH 4,5, αλλά αναπτύσσονται με μικρότερο ρυθμό). Ωστόσο, υπάρχουν ψευδομονάδες όπως η *Pseudomonas alcaliphila* που έχει βέλτιστο pH ανάπτυξης 10 (Yomoto et al., 2001). Επίσης, η ανάπτυξη σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος κάποιες φορές υφίσταται και σε άλλα στελέχη *Pseudomonas* καθώς το NaCl βοηθάει στις ενδοκυτταρικές λειτουργίες (Yomoto et al., 2001; Garcia et al., 1983; Krulwich et al., 1982; Guffanti et al., 1980).

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση, γενικά οι *Pseudomonas* χρησιμοποιούνται για την βιοπροστασία ενάντια φυτοπαθογόνων μυκήτων καθώς παράγουν μια μεγάλη γκάμα από μεταβολίτες οι οποίοι έχουν αντιμυκητιακή δράση (Ligon et al., 2000). Η *Pseudomonas stutzeri* YP-L παράγει εξωκυτταρικά χιτινάσες

και λαμιναρινάσες τα οποία μπορούν να αναστείλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium solani* (Lim et al., 1991). Η *Pseudomonas fluorescens* A506 χρησιμοποιείται για την εξάλειψη του βακτηριακού καψίματος το οποίο οφείλεται από την *Erwinia amylovora* σε μήλα και αχλάδια (Temple et al., 2004). Σύμφωνα με τις δικές μας μετρήσεις, όσον αφορά τα βακτήρια δεν είχαμε καμία αναστολή στα τροφοπαθογόνα βακτήρια που μελετήθηκαν ούτε από τα ζωντανά κύτταρα, αλλά ούτε από τις ενδοκυτταρικές ή εξωκυτταρικές ουσίες που μπορεί να παράγει το βακτήριο. Στους μύκητες από την άλλη πλευρά είχαμε σημαντικά αποτελέσματα. Είχαμε αναστολή από τα ζωντανά κύτταρα της *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) στους μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Aspergillus flavus*. Επίσης, και με την παλιά καλλιέργεια *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 4 χρόνια), αλλά και την πρόσφατη καλλιέργεια *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) είχαμε σημαντική μείωση του μυκηλίου των μυκήτων *P.expansum*, *A.flavus*, *R.solani* σε σχέση με τους μάρτυρες τους. Οι μύκητες αυτοί είναι φυτοπαθογόνοι και επιπλέον ο *A. Flavus* παράγει αφλατοξίνες σε τρόφιμα, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει πιθανώς περιθώριο αξιοποίησης αυτού του βακτηρίου στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων και τη συντήρηση και ασφάλεια τροφίμων. Στην συγκαλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) με τον *P.expansum* είχαμε σημαντική μείωση στην βιομάζα του μύκητα σε σχέση με τον μάρτυρα η οποία ήταν περίπου της τάξεως του 60% (ως συγκέντρωση ξηρής βιομάζας). Στην συγκαλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas sp* (ανακαλλιέργεια 1 μήνα) με την *Rhodotorula mucilaginosa* είχαμε σημαντική μείωση στον πληθυσμό της *Rhodotorula mucilaginosa* στις 45h και 64h περίπου 1,1log σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και για τα ζωντανά κύτταρα *Pseudomonas* αλλά και για τα εξωκυτταρικό του διήθημαέναντι του μύκητα *Aspergillus flavus* είναι πάνω από συγκέντρωση 10% σε συνθετικό υπόστρωμα. Πάντως, ύστερα από συγκαλλιέργεια του *Aspergillus flavus* με ζωντανά κύτταρα *Pseudomonas sp* παρατηρήθηκε μείωση του μύκητα κατά 1 log cfu/ml, ενώ η συγκαλλιέργεια *Aspergillus flavus* με παστεριωμένα κύτταρα *Pseudomonas sp* δεν προκάλεσε καμμία μείωση στον πληθυσμό του μύκητα σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην *Rhizoctonia solani* είχαμε αναστολή σε συγκέντρωση 5% και 10% (MIC = 5%) ζωντανών κυττάρων του βακτηρίου *Pseudomonas sp*, χωρίς να υπάρχει θανάτωση του μύκητα σε αυτές τις δύο συγκεντρώσεις του βακτηρίου (όταν πραγματοποιήθηκε

ανακαλλιέργεια με επίστρωση σε Potato Dextrose Agar για να διαπιστώσουμε αν έχουμε και θανάτωση του μύκητα, τελικά ο μύκητας αναπτύχθηκε απουσία του *Pseudomonas*).

Κεφάλαιο 5^ο: Συμπεράσματα

- ✓ Σύμφωνα με τις βιοχημικές και τις μοριακές μεθόδους ταυτοποιήσεις έχουμε ένα Gram αρνητικό βακτήριο που ανήκει στο γένος *Pseudomonas*. Σύμφωνα με το φυλογενετικό δένδρο μέχρι στιγμής μπορεί να πρόκειται για ένα νέο στέλεχος το οποίο έχει συγγένεια με την *Pseudomonas fluorescens FH5*, ή *P.sp FSL W5-0203*. Η τελική ταυτοποίηση του γονιδιώματος είναι σε αναμονή.
- ✓ Το βακτήριο έχει την ικανότητα να περνάει από φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2μm και να αναπτύσσεται κανονικά, πράγμα σπάνιο σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.
- ✓ Επίσης, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πληθώρα υποστρωμάτων είτε εκλεκτικών είτε γενικής χρήσεως με και χωρίς την χρήση αντιβιοτικών. Παρά το γεγονός ότι είναι βακτήριο αναπτύσσεται πολύ καλύτερα σε υποστρώματα μυκήτων με την παρουσία ή όχι αντιβιοτικού (π.χ. χλωραμφενικόλη). Για παράδειγμα, αναπτύσσεται πιο γρήγορα στο κατάλληλο για μύκητες Potato Dextrose Agar χωρίς αντιβιοτικό από ότι στο υπόστρωμα για Ψευδομονάδες *Pseudomonas Agar Base*, και επιπλέον αναπτύσσεται και στο υπόστρωμα *Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base* με την προσθήκη *Chloramphenicol*, το οποίο είναι αντιβιοτικό που προστίθεται στο υπόστρωμα για την αναστολή των βακτηρίων.
- ✓ Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες 4°C- 25°C με την σημαντικότερη διαφορά ότι από τους 14°C περίπου και πάνω, και κυρίως στους 25°C έχουμε την εμφάνιση ενός λαδί/μαύρου χρώματος, πιθανότατα λόγω παραγωγής χρωστικής τύπου μελανίνης, η σύσταση και ο βιολογικός ρόλος της οποίας χρήζει περαιτέρω προσδιορισμού και διερεύνησης. Σημειωτέον ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (4°C και 8°C) οι αποικίες είναι άσπρες, δηλαδή δεν υπάρχει παραγωγή της χρωστικής. Μέχρι στιγμής στην βιβλιογραφία δεν εξακριβωθεί τι είναι η χρωστική αυτή.

- ✓ Μπορεί και αναπτύσσεται πολύ καλά σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH από το pH4 μέχρι και το pH10 με βέλτιστο το 9, γεγονός επίσης ασυνήθιστο. Ακόμα, μπορεί να αναπτύσσεται και παρουσία άλατος (NaCl) μέχρι 2% εξίσου καλά και παράγοντας την χρωστική. Αντίθετα, αναστέλλεται σε συγκέντρωση αλατιού (NaCl) 3% .
- ✓ Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση την οποία ελέγξαμε ενάντια σε βακτήρια και μύκητες είτε χρησιμοποιώντας ολόκληρα τα ζωντανά κύτταρα, είτε παστεριωμένα κύτταρα, είτε το διηθημένο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας, παρατηρήσαμε ότι τα ζωντανά κύτταρα και σε κάποιες περιπτώσεις και το διηθημένο υγρό της καλλιέργειας του βακτηρίου είχαν σημαντική αντιμυκητιακή δράση, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια αντιβακτηριακή δράση στα βακτήρια-στόχους που εξετάστηκαν. Έναντι των μυκήτων που εξετάστηκαν είχαμε σημαντικές μειώσεις αλλά και αναστολή ανάπτυξης και στους τρεις μύκητες που χρησιμοποιήσαμε *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* αλλά και στην ζύμη *Rhodotorula mucilaginosa*. Αυτό που διαπιστώσαμε ήταν ότι σε σχέση με το βακτήριο που καλλιεργούσαμε τα τελευταία 4 χρόνια, το βακτήριο που ανακαλλιεργούσαμε μόνο για 1 μήνα είχε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση, πράγμα που σημαίνει ότι ίσως μετά από τις συνεχείς ανακαλλιέργειες σε συνθετικό υπόστρωμα (χωρίς την παρουσία μυκήτων-στόχων) υποβαθμίστηκε σταδιακά η δραστηριότητα του έναντι των μυκήτων.
- ✓ Συνολικά, η έρευνά μας έδειξε ότι μάλλον πρόκειται για ένα καινούργιο είδος ή στέλεχος *Pseudomonas* με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, το οποίο έχει αντιμυκητιακή δράση που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων και στην ασφάλεια και συντήρηση τροφίμων ως βιοπροστατευτική καλλιέργεια.

Βιβλιογραφία

Ädel Druvefors, U. (2004). "Yeast biocontrol of grain spoilage moulds" Vol. 466. Uppsala : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Agraria, 1401-6249;466. ISBN 91-576-6493-5. Doctoral thesis.

Ädel Druvefors, U., & Schnürer, J. (2005). Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 373-378.

Ajit, N. S., Verma, R., & Shanmugam, V. (2006). Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Current Microbiology*, 52(4), 310-316.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

Andreani, N. A., Carraro, L., Martino, M. E., Fondi, M., Fasolato, L., Miotto, G., ...& Cardazzo, B. (2015). A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in *Pseudomonas fluorescens*. *International journal of food microbiology*, 213, 88-98.

Andreani, N.A., Martino, M.E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P., Cardazzo, B., (2014) "Tracking the blue: a MLST approach to characterize the *Pseudomonas fluorescens* group" *Food Microbiology* 39, 116-126.

Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., & Medina, M. (2008). Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of dairy science*, 91(1), 70-75.

Atta, H. M., & Ahmad, M. S. (2009). Antimycin-A antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* Sp. AZ-AR-262: taxonomy, fermentation, purification and biological activities. *Aust J Basic Appl Sci*, 3(1), 126-135.

Bakkal, S., Robinson, S. M., & Riley, M. A. (2012). Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. In *Health and environment in aquaculture*. InTech.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution*, *17*(4), 540-552.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, *71*(1), 1-20.

Cox, C. D., & Adams, P. A. T. R. I. C. I. A. (1985). Siderophore activity of pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, *48*(1), 130-138.

da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(6), 284-292.

De Muynck, C., Leroy, A. I., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, *159*(4), 339-346.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, *16*(9), 1058-1071.

Del Marmol, V., & Beermann, F. (1996). Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS letters*, *381*(3), 165-168.

Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L., & Britigan, B. E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and immunity*, *66*(12), 5777-5784.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, *32*(5), 1792-1797.

EFSA, A.N.S. (2012). Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2012. *Guidance for submission for food additive evaluations. EFSA Journal*, 10(7), 2760.

Espín, J. C., Jolivet, S., & Wichers, H. J. (1999). Kinetic study of the oxidation of γ -L-glutaminy-4-hydroxybenzene catalyzed by mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(9), 3495-3502.

Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., & Horinouchi, S. (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400(6747), 897.

Garcia, M. L., Guffanti, A. A., & Krulwich, T. A. (1983). Characterization of the Na⁺/H⁺ antiporter of alkalophilic bacilli in vivo: delta psi-dependent 22Na⁺ efflux from whole cells. *Journal of bacteriology*, 156(3), 1151-1157.

Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M., & Rodriguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 479-485.

Garcia, P., Rodriguez, L., Rodriguez, A., & Martinez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373-382.

Gibello, A., Ferrer, E., Sanz, J., & Martin, M. (1995). Polymer production by *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenylacetic acid hydroxylase genes cloned in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 61(12), 4167-4171.

Govan, J. R. W., Hughes, J. E., & Vandamme, P. (1996). *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *Journal of Medical Microbiology*, 45(6), 395-407.

GUFFANTI, A. A., BLANCO, R., BENENSON, R. A., & KRULWICH, T. A. (1980). Bioenergetic properties of alkaline-tolerant and alkalophilic strains of *Bacillus firmus*. *Microbiology*, 119(1), 79-86.

Guo, C. H. E. N., Daomao, Y. A. N. G., Yaqin, X. I. A. O., & Hongwen, C. H. E. N. (2011). Influence of conditions on reuterin accumulation by the resting

cell biotransformation process. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(6), 1023-1027.

Hassan, H. M., & Fridovich, I. R. W. I. N. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *Journal of bacteriology*, 141(1), 156-163.

Herrera-Estrella, A., & Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *EXS-BASEL-*, 87, 171-184.

Hoster, F., Schmitz, J. E., & Daniel, R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(4), 434-442.

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, S139-S150.

Jacobson, E. S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 708-717.

Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532.

Jay, J.M., (2000) "Modern Food Microbiology" Sixth Edition. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Kallinteri, L. D., Kostoula, O. K., & Savvaidis, I. N. (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food microbiology*, 36(2), 176-181.

Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Gabler, F. M., Mansour, M., & Droby, S. (2003). Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Disease*, 87(11), 1384-1389.

Keith, Karen E., et al. "Burkholderia cenocepacia C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate." *Journal of bacteriology* 189.24 (2007): 9057-9065.

Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., & Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of clinical pathology*, 52(5), 385-387.

Kobayashi, T., Vieira, W. D., Potterf, B., Sakai, C., Imokawa, G., & Hearing, V. J. (1995). Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2301-2309.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). Diagnostic microbiology. The nonfermentative gram-negative bacilli. *Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers*, 253-320.

Kotob, S. I., Coon, S. L., Quintero, E. J., & Weiner, R. M. (1995). Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1620-1622.

Kravchenko, L. V., Azarova, T. S., Leonova-Erko, E. I., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N. M., & Tikhonovich, I. A. (2003). Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology*, 72(1), 37-41.

Krulwich, T. A., Guffanti, A. A., Bornstein, R. F., & Hoffstein, J. (1982). A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB. *Journal of Biological Chemistry*, 257(4), 1885-1889.

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 7072-7077.

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 143-158.

Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., & Pée, K. H. V. (2000). Natural products with antifungal activity

from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 56(8), 688-695.

Lim, H. S., Kim, Y. S., & Kim, S. D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 510-516.

Liu, H., He, Y., Jiang, H., Peng, H., Huang, X., Zhang, X., & Xu, Y. (2007). Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Current microbiology*, 54(4), 302-306.

Lluch, C., Callao, V., & Olivares, J. (1973). Pigment production by *Pseudomonas reptilivora*. *Archiv für Mikrobiologie*, 93(3), 239-243.

Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1-5.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., & Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology letters*, 219(1), 129-135.

Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y., & Vandamme, P. (2000). DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), 3165-3173.

Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of microbiology*, 174(3), 135-142.

Michel-Briand, Y., & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6), 499-510.

Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2013). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. In *Food Microbiology*(pp. 3-18). American Society of Microbiology.

Mulet, M., Bennasar, A., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2009). An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and cellular probes*, 23(3-4), 140-147.

Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.

Muller, M. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1527-1533.

Nappi, A. J., & Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5), 469-480.

Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. *Food microbiology*, 37, 78-95.

Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology*, 12(6), 1377-1383.

Palleroni, N.J. (1984) Pseudomonadaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Biology*. Kreig, N.R., and Holt, J.G. (eds). Baltimore: The Williams and Wilkins Co., pg. 141-199.

Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132-1147.

Pintado, C. M., Ferreira, M. A., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240-246.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage*(pp. 3-9). Springer, Boston, MA.

Plonka, P. M., & Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429-443.

Poulos, C. D., Matsumura, S. O., Willey, B. M., Low, D. E., & McGeer, A. (1995). In vitro activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) maltophilia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(10), 2220-2223.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.

Resa, C. P. O., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35(1), 101-108.

Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European molecular biology open software suite.

Rodriguez, E., Arques, J. L., Rodriguez, R., Nunez, M., & Medina, M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in applied microbiology*, 37(3), 259-263.

Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514.

Satish, S., Mohana, D. C., Ranhavendra, M. P., & Raveesha, K. A. (2007). Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *An International Journal of Agricultural Technology*, 3(1), 109-119.

Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592.

Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 70-78.

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.

Sipiczki, M. (2006). Metschnikowia strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), 6716-6724.

Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., & Garber, R. L. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959.

Strauch, E., Hammerl, J. A., & Hertwig, S. (2007). Bacteriophages: new tools for safer food? *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(2), 138-143.

Sundh, I., & Melin, P. (2011). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(1), 113-119.

Tatusova, T., Ciufu, S., Fedorov, B., O'Neill, K., & Tolstoy, I. (2013). RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic acids research*, 42(D1), D553-D559.

Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, 17(2), 57-86.

Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing.

Temple, T.N., Stockwell, V. O., Loper, J.e., & Johnson, K. B (2004). Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple. *Phytopathology*, 94(12), 1286-1294

Tirloni, E., Cattaneo, P., Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., & Stella, S. (2014). In vitro evaluation of *Lactobacillus animalis* SB310, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SB137 and their mixtures as potential bioprotective agents for raw meat. *Food Control*, 41, 63-68.

Trias Mansilla, R. (2008). Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. Universitat de Girona.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 50-60.

Tümmler, B., Wiehlmann, L., Klockgether, J., & Cramer, N. (2014). Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000prime reports*, 6.

Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., & Whyte, M. K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *The Journal of Immunology*, 168(4), 1861-1868.

Vesković Moračanin, S., Stefanović, S., & Turubatović, L. (2011). Application of bioprotectors in meat industry. *Journal of food hygienic engineering and design*, 1, 130-134.

Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 37-44.

Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P. A., Mukerji, P., Weller, D. M., & Pierson, E. A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2928-2934.

Wan, X., Liu, H. M., Liao, Y., Su, Y., Geng, J., Yang, M. Y., & Shen, P. (2007). Isolation of a novel strain of *Aeromonas media* producing high levels of

DOPA-melanin and assessment of the photoprotective role of the melanin in bioinsecticide applications. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2533-2541.

Whelan, S., Liò, P., & Goldman, N. (2001). Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *TRENDS in Genetics*, 17(5), 262-272.

Wilson, C. L., & Chalutz, E. (1989). Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 40(2), 105-112.

Woods, D. E., & Sokol, P. A. (1986). Role of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular enzymes in lung disease. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, 9(2), 108-112.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146(10), 2385-2394.

Yumoto, I., Yamazaki, K., Hishinuma, M., Nodasaka, Y., Suemori, A., Nakajima, K., & Kawasaki, K. (2001). *Pseudomonas alcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 349-355.

Zhang, Z., & Yuen, G. Y. (2000). The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, 90(4), 384-389.

Ιστοσελίδες φωτογραφιών

(<http://www.deomedica.com/services/bacteriophage>)

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas_aeruginosa_SEM.jpg)

(<http://www.szu.cz/ocekavane-vysledky-ehk-954-bakteriologicka-diagnostika>)

(https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_fluorescens)