



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

«Βενθικοί Μικροοργανισμοί ως Παραγωγείς Βιοενεργών Ενώσεων»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μαρίας Δ. Μπουρμπούλη

ΒΙΟΛΟΓΟΥ - ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΟΥ

Αθήνα, 2015

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Στη μνήμη του πατέρα μου και του Sergio

Ευχαριστίες

Η διεξαγωγή της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής χρηματοδοτήθηκε από το Ερευνητικό Έργο Ηράκλειτος II μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Η εκπόνηση της παρούσας Διατριβής αποτέλεσε αναμφισβήτητα μία πολύ σημαντική κι εποικοδομητική εμπειρία μέσα από αμέτρητες ώρες αφοσιωμένης προσπάθειας κι αγώνα. Η υποστήριξη όλων εκείνων των ανθρώπων με τους οποίους συνεργάστηκα προκειμένου να επιτευχθεί η διεξαγωγή και περαίωσή της, επιβάλλει από μέρους μου την ανάγκη να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Αμαλία Καραγκούνη, για την ουσιαστική καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της Διατριβής συμβάλλοντας στην ικανότητα ανάπτυξης πρωτοβουλιών από πλευράς μου για τη διένεξη των πειραμάτων, στην αισθητική καλλιέργεια του επιστημονικού γραπτού λόγου και της παρουσίας των αποτελεσμάτων μου καθώς και για την ανεκτίμητη κατανόηση και υποστήριξή της στις δύσκολες στιγμές.

Στον Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, κ. Βασίλειο Ρούσση, για το ενδιαφέρον, τη φιλοξενία στο εργαστήριο της Φαρμακευτικής και την υπόδειξη της δυνατότητας εκπόνησης της Διατριβής μέσω του Ερευνητικού Έργου Ηράκλειτος II.

Στον Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, κ. Ευάγγελο Παπαθανασίου, για την πολύτιμη υποστήριξη και την εμπιστοσύνη του τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της Διατριβής καθώς και για τη δυνατότητα να συμμετέχω στην αποστολή του ωκεανογραφικού πλοίου E/V *Nautilus* προκειμένου να συλλεχθούν τα δείγματα για την εκπόνηση της παρούσας Διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: τον Καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, κ. Γεώργιο Διαλλινά για τις πολύτιμες διορθώσεις του στο κείμενο της Διατριβής καθώς και για την υποστήριξη και τις σημαντικές συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια του ερευνητικού έργου. Την

Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, κ. Ευσταθία Ιωάννου για τη σημαντική βοήθεια και τις υποδείξεις της στο πειραματικό μέρος της χημείας καθώς και για την συγγραφή των αποτελεσμάτων. Τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου και τη Λέκτορα Συστηματικής και Οικολογίας Μυκήτων του Τμήματος Βιολογίας, κ. Ζαχαρούλα Γκόνου-Ζάγκου για το χρόνο που διέθεσαν για τις διορθώσεις του κειμένου της παρούσας Διατριβής και τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Ιδιαίτερα επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Ευστάθιο Κατσίφα, τον Δρ. Αλέξανδρο Σαββίδη και τον Δρ. Σωτήριο Αμίλλη του Εργαστηρίου της Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας καθώς και την Δρ. Παναγιώτα Γεωργαντέα και την κ. Ειρήνη Νικολακοπούλου του Εργαστηρίου της Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος της Φαρμακευτικής, των οποίων η ενεργός συνεισφορά και οι επιστημονικές συμβουλές υπήρξαν πολύτιμες σε όλη τη διάρκεια της Διατριβής μου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στην Λέκτορα του Τμήματος Γεωλογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Παρασκευή Νομικού, υπεύθυνη της ελληνικής ομάδας της εξερευνητικής αποστολής με το ωκεανογραφικό πλοίο *E/V Nautilus* καθώς και τους επικεφαλείς ερευνητές της αποστολής Dr. Bob Ballard, Prof. Steven Carey και Dr. Katherine Croff-Bell, τον καπετάνιο και το πλήρωμα του πλοίου για την πολύτιμη βοήθειά τους καθώς και τους χειριστές του τηλεκατευθυνόμενου οχήματος *Hercules*, για τη συλλογή των δειγμάτων.

Δε θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους μου Δρ. Γιάννη Παπαϊωάννου και κ. Μίνωα Ευαγγελινό για τις εποικοδομητικές συμβουλές και παρατηρήσεις τους, όλους τους Υποψήφιους Διδάκτορες του εργαστηρίου της Φαρμακογνωσίας καθώς και τους συναδέλφους μου από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και κυρίως την Δρ. Γραμματική Κανινή, την κ. Αναστασία Δέλλιου, και τον κ. Γιώργο Καπετανάκη για τη βοήθειά τους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην οικογένειά μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Μαρία Δ. Μπουρμπούλη

«... ἐκ πάντων ἓν καὶ ἐξ ἑνὸς πάντα»

ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ποικιλότητας βακτηριακών στελεχών με αντιμικροβιακή δράση που απομονώθηκαν από μικροβιακούς τάπητες του υδροθερμικού πεδίου του υποθαλάσσιου ηφαιστίου Κολούμπο (500 m βάθος). Συλλέχθηκαν δείγματα ιζήματος και καμινάδας με ειδικούς πυρηνολήπτες και τον βραχίονα τηλεχειριζόμενου οχήματος ROV. Μετά τη μεταφορά τους στην επιφάνεια τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4 °C αφού προηγουμένως προστέθηκε ποσότητα αποστειρωμένου θαλασσινού νερού.

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση του ετερότροφου μεσόφιλου βακτηριακού πληθυσμού με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών. Χρησιμοποιήθηκαν τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα Marine Agar, Tryptone Glucose Agar και Tryptone Glycerol Agar. Έγινε επώαση για 7 ημέρες στους 20 °C και απομονώθηκαν συνολικά 832 αερόβια ετερότροφα μεσόφιλα στελέχη βακτηρίων.

Προκειμένου να διακριθούν τα απομονωθέντα στελέχη μεταξύ τους, ακολούθησε η απομόνωση ολικού DNA και ενίσχυση των τμημάτων του βακτηριακού γονιδιώματος που βρίσκονται ανάμεσα σε διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες BOX-A με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ο διαχωρισμός τους έδωσε την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα (bar code), μοναδικού για κάθε βακτήριο. Όλα τα βακτήρια που έδωσαν το ίδιο πρότυπο θεωρήθηκαν ως το ίδιο στέλεχος και συνολικά διακρίθηκαν 230 διαφορετικές αλληλουχίες BOX.

Τα 230 βακτηριακά στελέχη ελέγχθηκαν *in vitro* με τη μέθοδο της διάχυσης για αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι 18 παθογόνων και μη μικροβιακών δεικτών, οι οποίοι ανήκουν σε 3 κατηγορίες (βακτήρια θετικά και αρνητικά κατά Gram και μύκητες). Από τον έλεγχο αυτό προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: 10,43% των στελεχών εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών, 1,3% έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών, 11,74% έναντι ευκαρυωτικών δεικτών, 2,6% έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών, 2,17% έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών δεικτών, 30% έναντι θετικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών δεικτών και 24,35% έναντι των μικροβιακών δεικτών.

Επιλέχθηκαν 42 από τα εξεταζόμενα στελέχη ως πολυενεργά (αναστολή περισσότερων από 5 μικροβιακών δεικτών) και ταυτοποιήθηκαν βάσει της ανάλυσης αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να ανήκουν σε δύο φύλα: στο φύλο *Proteobacteria*, τάξη *α -Proteobacteria*, είδος *Loktanella hongkongensis* και τάξη *γ -Proteobacteria*, είδη *Halomonas sulphidaeris*, *Pseudomonas moraviensis* και *Pseudomonas psychrophyla* καθώς και στο φύλο *Firmicutes*, είδη *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *B.*

halmapalus, *B. megaterium* και *Brevibacterium halotolerans* και μελετήθηκαν οι μεταξύ τους φυλογενετικές αποστάσεις.

Κατόπιν, με τη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών έγινε ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων για τις πιο συντηρημένες από τις καταλυτικές μονάδες που αποτελούν τις μη ριβοσωμικές και τις πολυκετιδικές συνθετάσες. Οι αλληλουχίες των 6 από τα 42 στελέχη που εξετάστηκαν, είχαν υψηλή ομοιότητα με β-κετοακύλ-συνθετάσες, οι οποίες αποτελούν μέρος των πολυκετιδικών συνθετασών. Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση αυτού του ενζύμου, οι 2 είχαν υψηλή ομοιότητα με υβριδικές NRPS-PKS συνθετάσες, ενώ οι υπόλοιπες 4 έδειξαν υψηλή ομοιότητα με *trans*-AT πολυκετιδικές συνθετάσες θαλάσσιας προέλευσης.

Επιπρόσθετα, οι αλληλουχίες 19 από τα 42 στελέχη που εξετάστηκαν, είχαν υψηλή ομοιότητα με αδενυλικές καταλυτικές μονάδες, οι οποίες αποτελούν μέρος των μη ριβοσωμικών συνθετασών. 4 από τις 19 αυτές αλληλουχίες είχαν υψηλή ομοιότητα με την αδενυλική περιοχή των αντιβιοτικών βακίτρακίνη, γραμμική γραμμισιδίνη και τυροσιδίνη. Οι περισσότερες από τις υπόλοιπες αλληλουχίες σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση είχαν υψηλή ομοιότητα με την αδενυλική περιοχή της σουρφακτίνης ενός λιποπεπτιδίου με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.

Τέλος, τα οργανικά εκχυλίσματα από υγρές μικρού όγκου καλλιέργειες 42 στελεχών ελέγχθηκαν, με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H NMR) για την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών και το στέλεχος S222 (*Pseudomonas psychrotolerans*) επιλέχθηκε σαν το πλέον ενδιαφέρον. Το στέλεχος αναπτύχθηκε σε κλειστή υγρή καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Marine Broth συνολικού τελικού όγκου 10 L στους 30 °C για 7 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση. Η υγρή καλλιέργεια εκχυλίστηκε με EtOAc και η οργανική στοιβάδα συμπυκνώθηκε υπό κενό και ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR. Στη συνέχεια το οργανικό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών για την απομόνωση των χημικών συστατικών του με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Έγινε απομόνωση τριών δευτερογενών μεταβολιτών σε καθαρή μορφή, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με βάση την ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR και MS). Από τη σύγκρισή τους με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια προέκυψε ότι πρόκειται για τα γνωστά φυσικά προϊόντα *cis*-κυκλο (προλίνη-βαλίνη), *cis*-κυκλο (προλίνη-φαινύλ-αλανίνη) και *cis*-κυκλο (προλίνη-τυροσίνη). Οι μεταβολίτες αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των 2,5-δικετοπιπεραζινών στην οποία εντάσσονται ενώσεις που έχουν παρουσιάσει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το υδροθερμικό πεδίο βαθιάς θάλασσας στον κρατήρα του υποθαλάσσιου ηφαίστειου Κολούμπο φιλοξενεί πολυπαραγοντικά βακτηριακά στελέχη τα οποία πιθανά να είναι βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμα.

Abstract

The aim of the present PhD thesis was the study of the bacterial diversity associated with antimicrobial activity of mesophilic heterotrophic bacterial strains isolated from microbial mats recovered from sediment and chimney samples from the hydrothermal field of Kolumbo submarine volcano (500 m depth), in the Aegean Sea. Both sediment and chimney samples were collected by ROV *Hercules* manipulator arm (E/V *Nautilus*). Once on board, sterilized sea water was added to the samples before storage at 4 °C.

In the lab, a qualitative analysis of the heterotrophic mesophilic bacterial population was conducted by using the selective nutrient media Marine Agar, Tryptone Glucose Agar and modified Tryptone Glycerol Agar, followed by incubation for 7 days at 25 °C and 832 aerobic heterotrophic mesophilic bacterial strains were isolated.

Then discrimination among the isolated strains was performed by genomic DNA extraction and amplification of bacterial genome segments, located among dispersed, repetitive and highly conserved BOX-A sequences, by polymerase chain reaction. The amplified DNA segments derived from each strain were separated by gel agarose electrophoresis, forming distinct DNA fingerprints. Since same BOX fingerprints are considered to derive from same strains, 230 different BOX-PCR profiles were obtained from the initial 832 strains.

Afterwards, the antimicrobial activity of the 230 bacterial strains was tested *in vitro* by diffusion method against 18 microbial test microorganisms (pathogenic and non pathogenic) comprising Gram positive and Gram negative bacterial strains, filamentous fungi and yeasts. According to the results of the aforementioned bioassays 10,43 % of the strains inhibited the growth of Gram positive bacteria, 1,3 % of Gram negative bacteria, 11,74 % of fungi, 2,6 % was bioactive against Gram positive and Gram negative bacterial strains, 2,17 % against Gram negative bacteria and fungi, 30% against Gram positive bacteria and fungi and 24,35% against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi.

42 of the isolates, deriving from both chimney and sediment samples, exhibited strong antimicrobial activity after the repeated transfer to new media and were chosen for sequencing and phylogenetic analysis. Isolate 16S rRNA gene sequences were grouped into two distinct clusters. 11 different 16S rRNA gene OTUs were found, 7 of which were identified at the genus level as *Bacillus* (98–100 % identity) and comprised 35 isolates derived from sediment and chimney samples. In particular, these isolates were assigned to *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. halmapalus*, *B. safensis* and *Brevibacterium halotolerans*. Three OTUs were assigned to the γ -Proteobacteria, *Pseudomonas psychrotolerans* and *moraviensis* spp. and *Halomonas sulfidaeris* (97–99.9 % identity) corresponding to six strains, isolated from the sediment sample and one OTU was affiliated with a

strain isolated from the chimney sample, belonging to α -*Proteobacteria*, *Loktanella hongkongensis* sp. (99.3 % identity).

These 42 strains were then screened for the presence of PKS and NRPS genes, by using degenerated oligonucleotide primers; in the specific, gene fragments of the most conserved domains (ketosynthase KS domain of PKS and adenylation (A) domain of NRPS) were amplified. Sequences of PKS type I and NRPS genes were obtained from 6 and 19 isolates, respectively; two KS domain sequences were related to hybrid NRPS-PKS genes, and four were grouped into the *trans*-acyltransferase (AT) type I polyketide synthases, and all of them showed a close relationship with reported *Actinomycetales* and *Bacillus* PKS genes of marine origin.

Besides, 3 *Pseudomonas* isolates showed high similarity to *Pseudomonas* NRPS-related genes and the rest (1 *Pseudomonas* and 15 *Bacillus*) of the isolates matched with NRPS genes isolated from *Bacillus* spp. All of the deduced NRPS A domain amino acid sequences exhibited high similarity to nonribosomal peptide synthetase subunits with relatives involved in the biosynthesis of tyrocidine (TycC), bacitracin (BacA) and linear gramicidin (LgrD) clustered with the saframycin A-like synthases, while the potent biosurfactant lichenysin (LchAA) clustered into the surfactin domain (SrfA-C)-like group. The latter group contained the majority of the A domains recovered.

Finally, the organic extracts of 500 ml liquid cultures of the 42 bacterial multi-active strains were checked using nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and the strain S222 (*Pseudomonas psychrotolerans*) was selected for further analysis. Specifically, the organic extract from a 10 lt culture of strain S222 underwent chromatographic separation for the isolation of secondary metabolites using liquid gravity chromatography (GCC), solid phase extraction (SPE) and high pressure liquid chromatography (HPLC). 3 secondary metabolites were isolated in pure form, identified by NMR and GS-MS spectroscopy and belong to the 2,5-diketopiperazines family, which comprises compounds of known strong antimicrobial activity. In particular, these metabolites are *cis*-cyclo (proline-valine), *cis*-cyclo (proline-phenyl-alanine) and *cis*-cyclo (proline-tyrosine)

The results of this study lead to the conclusion that the deep-sea hydrothermal vent at the crater floor of Kolumbo submarine volcano hosts multi-functional bacterial strains with potential biotechnological applications.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	Υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας και μικροβιακή ποικιλότητα	2
1.2.	Υδροθερμικά πεδία στη Μεσόγειο	7
1.3.	Υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο	8
1.4.	Βιοϋμένια και παραγωγή βιοενεργών ενώσεων στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας	12
1.4.1.	Οι μικροοργανισμοί ως παραγωγείς δευτερογενών μεταβολιτών	14
1.4.2.	Παραγωγή βιοενεργών ουσιών από θαλάσσιους μικροοργανισμούς υδροθερμικών πεδίων	16
1.4.2.α.	Ανίχνευση	16
1.4.2.β.	Διαλογή δειγμάτων με την εφαρμογή βιολογικών δοκιμών	21
1.5.	Γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση ενζύμων που οδηγούν στον σχηματισμό μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, πολυκετιδίων και λιπαρών οξέων	23
1.5.α.	Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS)	25
1.5.α.i.	Μηχανισμός δημιουργίας πεπτιδικής αλυσίδας	26
1.5.α.ii.	Φυλογένεση των (NRPS)	28
1.5.β.	Πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS)	29
1.5.β.i.	Μηχανισμός δημιουργίας μονομερών	30
1.5.β.ii.	<i>trans</i> -AT πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS)	32
1.5.β.iii.	Φυλογένεση των βακτηριακών (PKS)	33
1.5.γ.	Συνθετάσες λιπαρών οξέων (FAS)	36
1.6.	Μέθοδοι ανάκτησης και μελέτης μικροοργανισμών από υδροθερμικά πεδία	37
1.6.1.	Ανάκτηση μικροοργανισμών από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας	37

1.6.2.	Κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι απομόνωσης και καλλιέργειας μικροοργανισμών προερχόμενων από υδροθερμικά πεδία	38
1.6.3.	Φαινοτυπικές μέθοδοι διάκρισης στελεχών μεταξύ τους	39
1.6.4.	Μοριακές μέθοδοι διάκρισης των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών μεταξύ τους	41
1.6.4.1.	Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στη δημιουργία αποτυπωμάτων DNA	41
1.6.4.1.i.	Ενίσχυση τμημάτων DNA ανάμεσα σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Repetitive element) rep-PCR	41
1.6.4.1.ii.	Ανάλυση περιορισμού του ενισχυμένου 16S ριβοσωμικού DNA (ARDRA)	43
1.6.4.1.iii.	Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους ενισχυμένων τελικών θραυσμάτων (T-RFLP)	44
1.6.4.1.iv.	Αυτοματοποιημένη ανάλυση του ριβοσωμικού εσωγονιδιακού διαχωριστή (ARISA)	44
1.6.4.1.v.	Ανάλυση πολυμορφισμού ενισχυμένου μήκους θραυσμάτων (AFLP)	45
1.6.4.1.vi.	Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD)	45
1.6.4.2.	Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στην αλληλούχιση γονιδίων ή τμημάτων αυτών	46
1.6.4.2.i.	Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA	47
1.7.	Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	48
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.1.	Δειγματοληψία	52
2.1.1.	Θέση δειγματοληψίας της μελέτης	52
2.1.2.	Μεθοδολογία δειγματοληψίας	53

2.2.	Μικροοργανισμοί και καλλιέργειες	55
2.2.1.1.	Απομόνωση των μικροοργανισμών από τα δείγματα ιζήματος και καμινάδας	55
2.2.2.	Διατήρηση μικροοργανισμών	55
2.2.3.	Μικροβιακοί δείκτες	55
2.2.3.α.	Προκαρυωτικοί δείκτες	55
2.2.3.β.	Ευκαριωτικοί δείκτες	56
2.2.4.	Καλλιέργεια των μικροοργανισμών	57
2.2.4.α.	Εκτίμηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ($\mu_{\max}$) και του χρόνου διπλασιασμού της καλλιέργειας (t_d)	57
2.2.4.β.	Καλλιέργεια του επιλεγμένου βακτηριακού στελέχους και εκχύλιση	58
2.2.5.	Ανίχνευση παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη	58
2.2.6.	Απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από την εκχύλιση του στελέχους S222	59
2.2.6.1.	Οργανολογία	59
2.2.6.2.	Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	60
2.3.	Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα	61
2.4.	Μοριακές μέθοδοι	62
2.4.1.	Απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων	62
2.4.2.1.	Αντίδραση BOX-PCR	63
2.4.2.2.	Στατιστική ανάλυση και ομαδοποίηση των προτύπων που προκύπτουν από την αντίδραση BOX-PCR	64
2.4.3.	Ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των πολυενεργών στελεχών	65
2.4.4.	Ανίχνευση του υπεύθυνου γονιδίου για τη σύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων	66
2.4.5.	Ανίχνευση του υπεύθυνου γονιδίου για τη σύνθεση πολυκετιδίων	67
2.4.6.	Σύγκριση των αλληλουχιών 16S rDNA, NRPS και PKS	69
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71

3.1.	Μικροβιακή ποικιλότητα του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο	72
------	---	----

3.1.α.	Μεσόφιλα βακτήρια του Κολούμπο	72
3.1.β.	Διάκριση και ομαδοποίηση των απομονωθέντων στελεχών	73
3.1.γ.	Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών βάσει της ανάλυσης αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου	84
3.1.δ.	Τιμές ειδικού ρυθμού αύξησης ($\mu_{\max}$) και χρόνου διπλασιασμού (t_d) κλειστής καλλιέργειας των 42 επιλεγμένων στελεχών	88
3.1.ε.	Παραγωγή βιοενεργών ενώσεων από τα 230 μοναδικά στελέχη	90
3.1.στ.	Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το βακτηριακό στέλεχος S222	120
3.2.1.	Απομόνωση του γονιδίου NRPS	135
3.2.2.	Απομόνωση του γονιδίου PKS	136
3.2.3.	Φυλογενετική μελέτη των γονιδίων 16S rDNA, NRPS και PKS	137
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	144
4.1.	Ποικιλότητα των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών	146
4.2.	Αντιμικροβιακή δράση όλων των μοναδικών βακτηριακών στελεχών	147
4.3.	Πολυενεργά βακτηριακά στελέχη	150
4.4.	Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών σε καθαρή μορφή από το στέλεχος <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> S222	153
4.5.	Ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων για την αντιμικροβιακή δράση	153
4.5.1.	Ανίχνευση γονιδίων πολυκετιδικών συνθετασών (PKS)	154
4.5.2.	Ανίχνευση γονιδίων μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS)	155
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	160

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας και μικροβιακή ποικιλότητα

Τα υδροθερμικά πεδία σε μεγάλα βάθη που ανακαλύφθηκαν μόλις πριν από 38 χρόνια, χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας σε σχέση με το ολιγοτροφικό περιβάλλον του πυθμένα και μεγάλες διαβαθμίσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων που απαιτούν στρατηγικές προσαρμοστικότητας από τους μικροοργανισμούς προκειμένου να επιβιώσουν.

Τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας βρίσκονται σε βάθη >200 m (Tarasov και συνεργάτες, 2005) όπου επικρατεί σκοτάδι, με μεγάλες διαβαθμίσεις στα επίπεδα οξυγόνου, θερμοκρασίας (έως και 2 °C) και υδροστατικής πίεσης (>1000 atm στις βαθιές τάφρους) και όταν πρόκειται για τον πυθμένα, εκεί φτάνει πολύ μικρό ποσοστό από το οργανικό υλικό που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση (Van Dover και συνεργάτες, 2002).

Το 1977 στα νησιά Γκαλαπάγκος (Ειρηνικός Ωκεανός) ανακαλύφθηκε το πρώτο υδροθερμικό πεδίο κατά μήκος της τεκτονικής τάφρου σε βάθος 2500 m από το οποίο εξέρχονταν θερμό ρευστό υλικό πλούσιο σε μέταλλα και πυκνούς πληθυσμούς μικροοργανισμών και ασπόνδυλων. Η ανακάλυψη αυτή άλλαξε την επιστημονική σκέψη για την προέλευση της ζωής στον πλανήτη, αλλά και την πεποίθηση πως η βαθιά θάλασσα αποτελούσε ένα οικοσύστημα που χαρακτηριζόταν από χαμηλές τιμές θερμοκρασίας κι εξαιρετικά χαμηλή συγκέντρωση μικροβιακών πληθυσμών (Thornburg και συνεργάτες, 2010).

Τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας σχηματίζονται με την έξοδο του μάγματος από ρηξιγενείς τάφρους κατά τον σχηματισμό νέου ωκεάνιου φλοιού. Η τεκτονική καταπόνιση από τις συμπιεστικές τάσεις που επικρατούν εκεί προκαλεί χιλιάδες θραύσεις και ρήγματα μέσα από τα οποία το ωκεάνιο νερό πιέζεται, διεισδύει σε μεγάλο βάθος, διαλύει σημαντικές ποσότητες στοιχείων και μεταλλικών αλάτων και εξέρχεται σαν υπέρθερμο υδροθερμικό ρευστό από πόρους του πυθμένα, ψύχεται όταν έρχεται σε επαφή με το ωκεάνιο νερό αποθέτοντας σημαντικές ποσότητες του φορτίου περιφερειακά του πόρου εξαγωγής με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σταδιακά καμινάδες από τις οποίες εξέρχεται το υπέρθερμο ρευστό (Thornburg και συνεργάτες, 2010).

Σε μεγάλα βάθη, τα υδροθερμικά πεδία συναντώνται σε μεσο-ωκεάνιες ράχες, θερμές κηλίδες, ηφαιστειακά τόξα και υποθαλάσσια όρη. Σε καθένα από τα παραπάνω οικοσυστήματα διαφέρει η σύσταση των υδροθερμικών ρευστών με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται σε μεγάλο βαθμό και η ποικιλότητα των μικροοργανισμών και γενικότερα των οργανισμών (Schrenk και συνεργάτες, 2010). Τα υδροθερμικά ρευστά εμπλουτίζονται με αναγωγικές ενώσεις όπως H_2 , H_2S , Fe^{+2} , CO_2 και μεθάνιο, η σύνθεση και η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από τη γεωλογική σύσταση του πυθμένα, η οποία παράλληλα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό και τη μικροβιακή ποικιλότητα (Amend και συνεργάτες, 2011). Τα βακτήρια και τα αρχαία είτε αιωρούνται στη στήλη του νερού και το υδροθερμικό ρευστό υλικό, είτε δημιουργούν «μικροβιακούς τάπητες» διαφόρων χρωμάτων και μορφολογίας στην επιφάνεια του βασάλτη (πέτρωμα που προέρχεται από την ψύξη της ηφαιστειογενούς λάβας) (Moyer και συνεργάτες, 1994, Santelli και συνεργάτες, 2008), στις ελικοειδείς καμινάδες (Kormas και συνεργάτες, 2006) και στο ίζημα (Lopez-Garcia και συνεργάτες, 2003). Αποτελούν τροφή μεγάλου αριθμού θηρευτών (Van Dover και Fry, 1994) και γι' αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αποικιών μακροβενθικών οργανισμών γύρω από το υδροθερμικό πεδίο (Alain και συνεργάτες, 2004).

Η θερμοκρασία, το pH και η περιεκτικότητα σε σίδηρο και θειώδη άλατα είναι οι κύριοι βιογεωχημικοί παράγοντες του υδροθερμικού περιβάλλοντος. Εκτός από τις ακραίες τιμές θερμοκρασίας και πίεσης και την απουσία φωτός είναι εξαιρετικά μεγάλες και οι διαβαθμίσεις του pH και της θερμοκρασίας μεταξύ του ρευστού και του περιβάλλοντος ωκεάνιου νερού (Luther και συνεργάτες, 2001, Le Bris και συνεργάτες, 2003).

Απουσία φωτός τα πλούσια σε μέταλλα υδροθερμικά ρευστά και τα αναγωγικά αέρια H_2S , CH_4 και CO_2 , παρέχουν την απαραίτητη χημική ενέργεια για τον μικροβιακό μεταβολισμό (Kelley και συνεργάτες, 2002). Η ανάμειξη των αναγωγικών ενώσεων με κρύο οξυγονωμένο θαλασσινό νερό προκαλεί αντιδράσεις χημικής ανισορροπίας από τις οποίες απελευθερώνεται ενέργεια την οποία χρησιμοποιούν χημολιθότροφοι μικροοργανισμοί για να παράγουν οργανική ύλη (χημειοσύνθεση). Συγκεκριμένα, η οξείδωση αναγωγικών ενώσεων όπως HS^- , H_2S , S^0 , CH_4 , H_2 , NH_4^+ ή μεταλλικών συμπλεγμάτων που περιέχουν $Fe(II)$ - και $Mn(II)$ - παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια

για τη σύνθεση οργανικού άνθρακα από ανόργανες πηγές όπως CH_4 και CO_2 (Jannasch και Wirsén, 1979).

Οι αναερόβιοι χημιοσυνθετικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν CO_2 , Fe^{3+} , NO_3^{2-} , ή οργανικές ενώσεις προκειμένου να οξειδώσουν H_2 (Schmidt και συνεργάτες, 2008), μάλιστα για τον μεταβολισμό του CO_2 χρησιμοποιείται ο βιοχημικός κύκλος των φυτών, Calvin - Benson. Αναερόβιοι μικροοργανισμοί (κυρίως μεθανογενή αρχαία) έχουν εντοπιστεί σε μεγάλο βάθος κάτω από το θερμό πυθμένα (Takai και συνεργάτες, 2004), στα εσωτερικά τοιχώματα των καμινάδων και σε στενή επαφή με το πλούσιο σε θρεπτικά όξινο θερμό εκλυόμενο ρευστό (Winn και συνεργάτες, 1986).

Συνήθως η συγκέντρωση υδρόθειου στο εκλυόμενο ρευστό είναι εξαιρετικά υψηλή (3 με 110 mmol ανά kg θαλασσινού νερού) και γι' αυτό η οξείδωσή του από το διαλυμένο οξυγόνο (O_2) στο νερό αποτελεί την κύρια μικροβιακή χημιοσυνθετική πηγή ενέργειας των υδροθερμικών κοινοτήτων. Οι αερόβιοι χημιοσυνθετικοί μικροοργανισμοί (κυρίως θείο-οξειδωτικά βακτήρια) συναντώνται κοντά στις ενεργές καμινάδες, δηλαδή στην περιοχή που το H_2S αναμειγνύεται με το ωκεάνιο H_2O (Kelley και συνεργάτες, 2002).

Μεμονωμένοι χημιοσυνθετικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιούν και οργανικό άνθρακα όταν οι συνθήκες τους το επιτρέπουν, προκειμένου να αντλήσουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας. Ωστόσο, όταν αυτό δεν είναι εφικτό, οι χημιοσυνθετικοί αυτοί οργανισμοί παράγουν οργανικό άνθρακα για να εφοδιάσουν τις υπόλοιπες μικροβιακές κοινωνίες αποτελώντας έτσι δεξαμενές αναγωγικών υδροθερμικών ενώσεων (Van Dover, 2000).

Η μεταφορά ενέργειας από τη γεωθερμική πηγή σε υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας επιτυγχάνεται με την κατανάλωση του οργανικού υλικού από ετερότροφους μικροβιακούς πληθυσμούς και την εγκατάσταση πλούσιας πανίδας που τρέφεται από τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με τους μικροοργανισμούς (Thornburg και συνεργάτες, 2010).

Σε πειράματα που έγιναν προκειμένου να μελετηθεί η διαδικασία δημιουργίας αποικιών σε υδροθερμικό πεδίο βρέθηκε πως οι πρώτοι μικροβιακοί πληθυσμοί αποτελούνταν από αποικίες βακτηρίων νηματοειδούς μορφολογίας χάρις στην οποία αυξάνεται η κυτταρική τους επιφάνεια ευνοώντας έτσι την προσκόλλησή τους σε στερεό υπόστρωμα (υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο). Με την έκκριση

εξωπολυσακχαριτών οι βακτηριακές αυτές αποικίες δημιούργησαν βιοϋμένια, διευκολύνοντας έτσι την προσκόλληση άλλων μικροοργανισμών και ασπόνδυλων. Οι πρώτοι αυτοί μικροοργανισμοί ήταν αυτότροφα βακτήρια ικανά να μεταβολίζουν ανόργανα συστατικά (H_2 , S^0 , NO_3^-) προκειμένου να δεσμεύσουν διοξείδιο του άνθρακα για να το μετατρέψουν σε οργανικό υλικό απαραίτητο για τον μεταβολισμό ετερότροφων μικροοργανισμών (Alain και συνεργάτες, 2004). Ειδικότερα, η κλάση των *ε*-πρωτοβακτηρίων και συγκεκριμένα τα είδη των γενών *Arcobacter*, *Sulfurovum*, *Sulforimonas*, *Hydrogenimonas* και *Nitratiruptor* παίζουν σημαντικό ρόλο στον αρχικό αποικισμό υδροθερμικών πεδίων από μικρόβια και ασπόνδυλα και συμμετέχουν ενεργά στους κύκλους του θείου, υδρογόνου, αζώτου και άνθρακα (Alain και συνεργάτες, 2004, Nakagawa και συνεργάτες 2005, Takai και συνεργάτες, 2006).

Εκτός από το ίζημα και τα τοιχώματα των καμινάδων τα βακτήρια και τα αρχαία ζουν αιωρούμενα στο εκλυόμενο υδροθερμικό υγρό σε θερμοκρασίες έως και 121 °C και μπορούν να παρατηρηθούν έως και αρκετά χιλιόμετρα μακριά από το υδροθερμικό πεδίο με κυτταρική πυκνότητα των πληθυσμών πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο περιβάλλον ωκεάνιο νερό (Juniper και συνεργάτες, 1998). Η μικροβιακή πυκνότητα ελαττώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας η οποία προκαλεί μεταβολές στην αφθονία και τη μικροβιακή ποικιλότητα. Σε υψηλές θερμοκρασίες κυριαρχούν θερμόφιλοι και υπερθερμόφιλοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί. Θερμόφιλοι θεωρούνται οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία υψηλότερη των 50 °C και υπερθερμόφιλοι σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 80 °C. Ανάλογα με τον μεταβολισμό τους οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί ταξινομούνται σε: ζυμώτες, μεθανογενείς, αερόβιους ετερότροφους, αυτότροφους ή ετερότροφους νιτρικό-, θειο-, θειικό- και σίδηρο-αναγωγείς (Nakagawa και Takai, 2006). Μερικοί από τους θερμόφιλους αυτούς μικροοργανισμούς συναντώνται σε όλα τα υδροθερμικά πεδία που έχουν ανακαλυφθεί ως τώρα (κοσμοπολιτική κατανομή). Συγκεκριμένα, τα θερμόφιλα και υπερθερμόφιλα χημολιθότροφα βακτήρια που ανήκουν στην ομάδα των Aquificales συναντώνται σε σημαντικά ποσοστά στις μικροβιακές κοινότητες του υδροθερμικού ρευστού υλικού, στα τοιχώματα των καμινάδων, σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το υδροθερμικό ρευστό και σε μικρό βάθος κάτω από τον πυθμένα (Nakagawa και Takai, 2008, Hugler και Sievert, 2011).

Τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας εκτός από το να αποτελούν ακραία περιβάλλοντα θεωρούνται ένα από τα πιο δυναμικά οικοσυστήματα του πλανήτη. Η δραστηριότητα του πεδίου μεταβάλλεται στο χρόνο, ο όγκος της θερμικής ροής, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση υδρόθειου μειώνονται, με αποτέλεσμα οι πρώτοι ακραιόφιλοι πληθυσμοί να αντικαθιστώνται από μεσόφιλα είδη (Van Dover, 2000). Σε διαφορετικές περιόδους συλλογής δειγμάτων από το ίδιο πεδίο παρατηρήθηκε αλλαγή στις χημικές συγκεντρώσεις, τη θερμοκρασία, τη δυναμική των ρευστών και τη χημική σύσταση των καμινάδων με αποτέλεσμα τα συλλεγμένα δείγματα να αποτελούνται από εντελώς διαφορετικούς οργανισμούς (Childress και Fisher, 1992). Σε ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από απότομες φυσικοχημικές διαβαθμίσεις, οι μικροβιακοί πληθυσμοί χρειάζεται να προσαρμόζονται γρήγορα προκειμένου να επιβιώσουν υιοθετώντας στρατηγικές ανθεκτικότητας και υποχρεωτικά ή προαιρετικά μεταβολικά μονοπάτια πράγμα που σημαίνει πως η μικροβιακή ποικιλότητα συσχετίζεται στενά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του ακραίου αυτού οικοσυστήματος. Για παράδειγμα, τα μεσόφιλα θειο-οξειδωτικά βακτήρια που ανήκουν στην κλάση των *ε*-πρωτεοβακτηρίων έχουν παρόμοιο μεταβολισμό και κατ' επέκταση παρεμφερή οικολογικό ρόλο με τα θερμόφιλα και υπερθερμόφιλα βακτήρια της ομάδας των *Aquificales*. Και οι δύο ομάδες σε διαφορετικές θερμοκρασίες (*ε*-πρωτεοβακτήρια: 20–60 °C, *Aquificales*: 60–80 °C) οξειδώνουν αναγωγικές ενώσεις θείου και υδρογόνου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και νιτρικά άλατα ενώ παράλληλα δεσμεύουν ανόργανο άνθρακα (Hugler και Sievert, 2011). Η ιδιότητά τους να χρησιμοποιούν διαφορετικούς δότες και δέκτες ηλεκτρονίων πιθανά να ευθύνεται για την ικανότητα αποικισμού δυναμικών οικοσυστημάτων όπως τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας (Campbell και συνεργάτες, 2006). Επίσης, το γεγονός πως διαφορετικά είδη χρησιμοποιούν παρόμοια μεταβολικά μονοπάτια, εκτελούν τις ίδιες λειτουργίες, αλλά ευδοκimούν σε διαφορετική θερμοκρασία εξηγεί την ικανότητα επιβίωσης των μικροβιακών κοινοτήτων σε απότομες διαβαθμίσεις των οξειδοαναγωγικών και φυσικοχημικών παραγόντων (Sievert και Vetriani, 2012).

Σε μικρή απόσταση από το σημείο έκλυσης του υδροθερμικού ρευστού ευδοκimούν πολλά από τα είδη που ανήκουν στην κλάση των θειο-οξειδωτικών *γ*- και *ε*-πρωτεοβακτηρίων, την κλάση *Actinobacteria* (με υψηλό ποσοστό G+C), μία από τις μεγαλύτερες πηγές φυσικών προϊόντων (Teske και συνεργάτες, 2002), την ομάδα *Firmicutes* (χαμηλό ποσοστό G+C) και συγκεκριμένα τις κλάσεις *Bacilli*, *Clostridia*

και Mollicutes (Huber και συνεργάτες, 2002) καθώς και το φύλο Bacteroidetes (Alain και συνεργάτες, 2002).

Αντίθετα, πληθυσμοί αρχαίων (και κυρίως η ομάδα DHVE-2, φύλο Euryarchaeota) κυριαρχούν στο εσωτερικό τοίχωμα των καμινάδων, το υδροθερμικό ρευστό και σε μεγάλο βάθος κάτω από τον πυθμένα (Harmsen και συνεργάτες, 1997, Takai και Horikoshi, 1999, Schrenk και συνεργάτες, 2003).

1.2. Υδροθερμικά πεδία στη Μεσόγειο

Τα υδροθερμικά πεδία της Μεσογείου βρίσκονται σε τεκτονικά ενεργές περιοχές τόσο στη Δυτική Μεσόγειο (Αιόλιες Νήσοι, Τυρρηνικό Πέλαγος) σε βάθη τις περισσότερες φορές μικρότερα από 200 m (ρηχά υδροθερμικά πεδία) όσο και στην Ανατολική Μεσόγειο (Αιγαίο Πέλαγος, Μήλος 100 m βάθος, ενώ το Κολούμπο βρίσκεται σε βάθος 500 m).

Η νήσος Vulcano είναι μία από τις επτά ενεργές ηφαιστειακές νήσους του Αιολικού Αρχιπελάγους κοντά στη βόρεια ακτή της Σικελίας στην οποία βρίσκεται το πιο μελετημένο υποθαλάσσιο ρηχό υδροθερμικό πεδίο. Στους μικροβιακούς αποίκους συγκαταλέγονται αερόβια και αναερόβια, θερμόφιλα και υπερθερμόφιλα αρχαία και βακτήρια (Huber και συνεργάτες, 1986, Stetter, 1988). Η μεγάλη μικροβιακή ποικιλότητα που παρατηρείται, εξηγείται από τη γεωχημική διαφοροποίηση στη σύσταση των υδροθερμικών ρευστών και τη μεταβολή της θερμοκρασίας (42–89 °C) και του pH (1,9–6,3) σε διαφορετικά σημεία του υδροθερμικού πεδίου. Έχουν απομονωθεί μοναδικά θαλάσσια υπερθερμόφιλα αναερόβια Fe^{+2} -οξειδωτικά και θειοαναγωγικά αρχαία όπως στελέχη των ειδών *Ferroglobus placidus* και *Archaeoglobus fulgidus* (Rusch και συνεργάτες, 2005).

Το πιο ενεργό υποθαλάσσιο υδροθερμικό πεδίο των Αιολίων Νήσων βρίσκεται σε βάθος 150 m (Νήσος Παναρέα) (Italiano και Nuccio, 1991). Το υδροθερμικό αυτό οικοσύστημα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλία στη σύσταση του υδροθερμικού ρευστού με αποτέλεσμα να ευνοείται η συνύπαρξη πολλών προκαρυωτικών μικροοργανισμών (Manini και συνεργάτες, 2008). Αξίζει να σημειωθεί πως απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη τα οποία ανήκουν στο γένος *Thiobacillus* και παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με στελέχη που ανακτήθηκαν από υδροθερμικό

πεδίο στο υποθαλάσσιο όρος Loihi Seamount στη Hawaii (Maugeri και συνεργάτες, 2008).

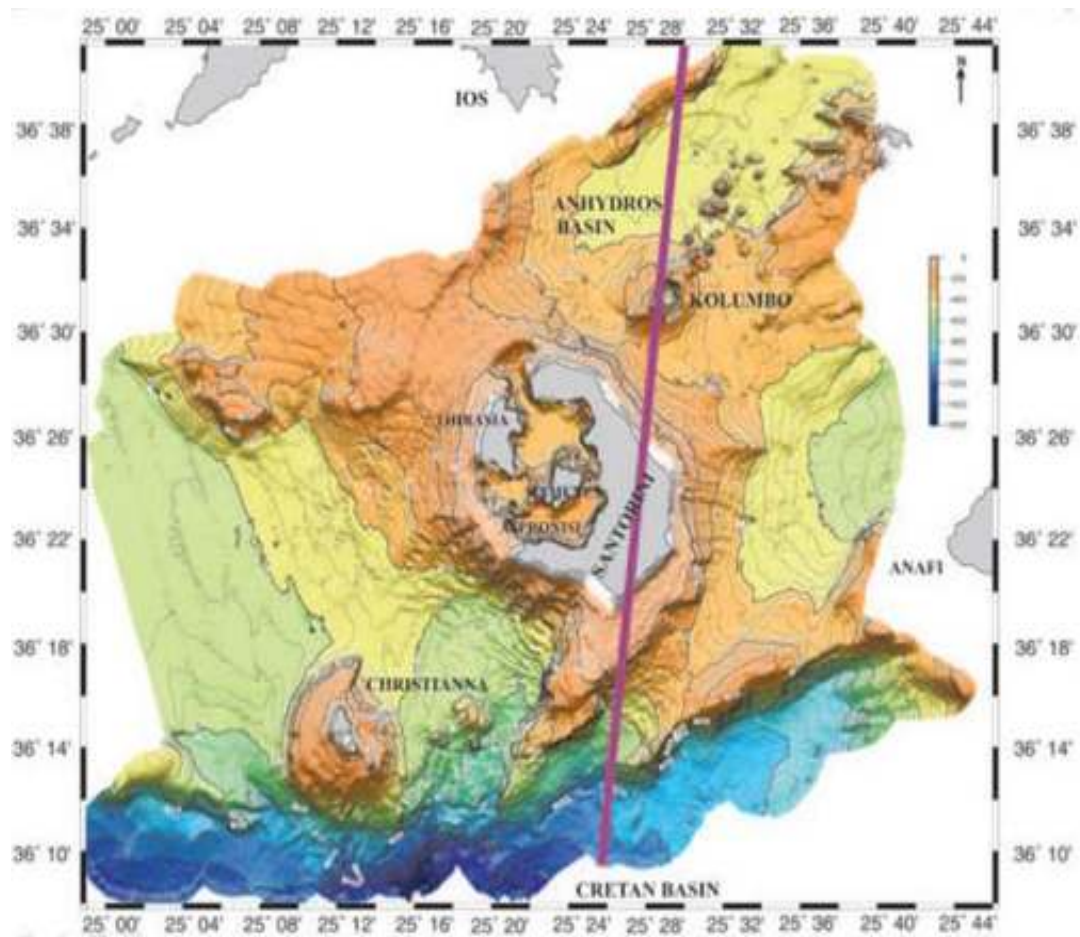
Στην Ανατολική Μεσόγειο, κοντά στην ακτή Παλαιοχώρι της νήσου Μήλος βρίσκονται υδροθερμικές πηγές έως και 100 m βάθος στις οποίες το εκλυόμενο υδροθερμικό ρευστό έχει θερμοκρασία 30-60 °C και pH 5,0-5,7. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που ανιχνεύθηκαν αποτελούνταν κυρίως από ετερότροφα βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούν την οργανική ύλη που παράγουν θειο-οξειδωτικά βακτήρια (*Thiomicrospira* spp.) καθώς και φωτοσυνθετικά διάτομα (Giovannelli και συνεργάτες, 2013). Σε αντίθεση με τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, σε μικρά βάθη η δέσμευση του CO₂ επιτυγχάνεται και με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης η οποία συνεισφέρει στην παροχή ενέργειας στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Sievert και συνεργάτες, 2000).

1.3. Υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο

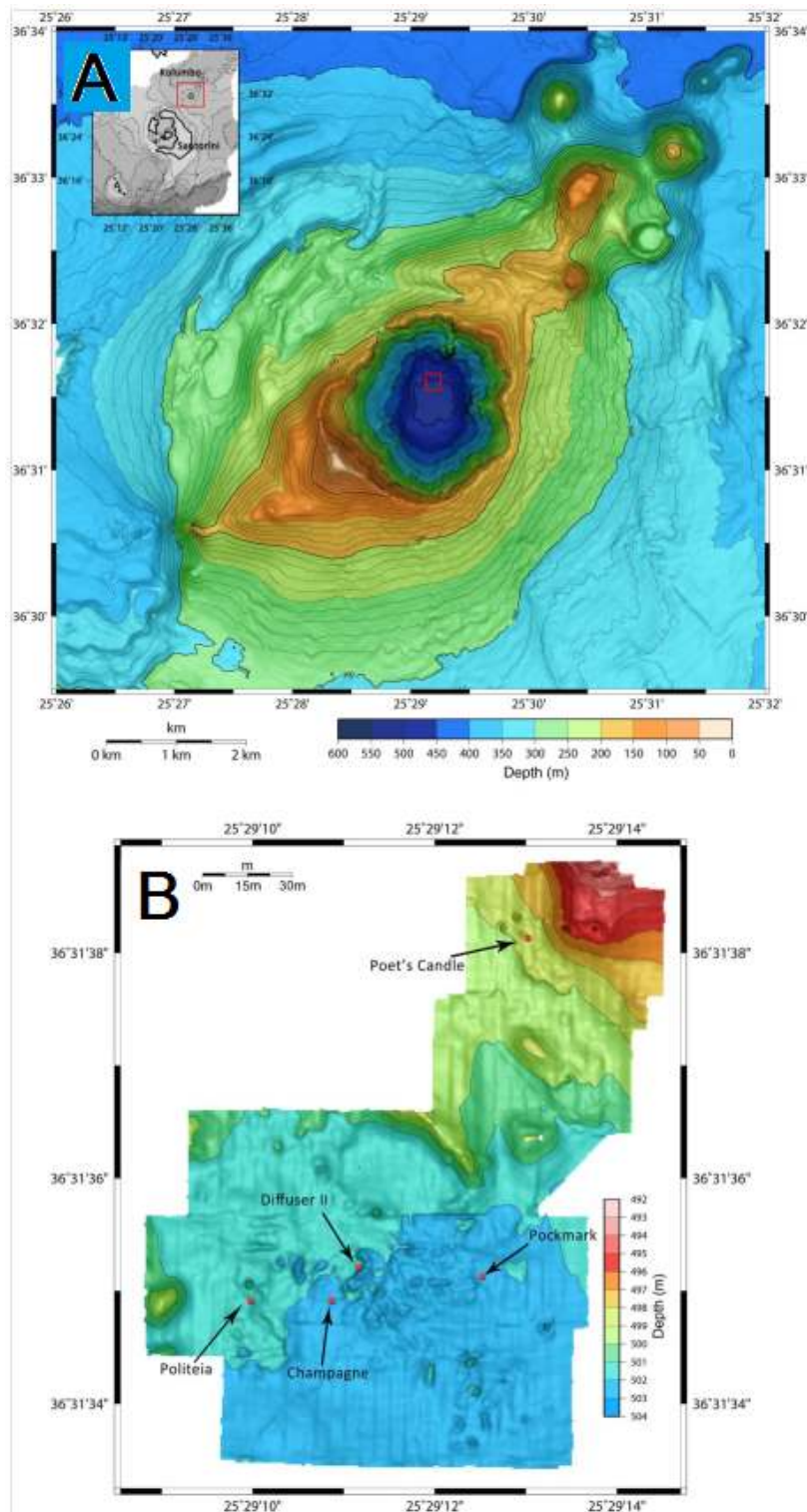
Στον Ελληνικό χώρο η σύγκλιση της Ευρασιατικής λιθοσφαιρικής πλάκας με την Αφρικανική πλάκα προκαλεί την καταβύθιση ωκεάνιου φλοιού της Αφρικανικής πλάκας κάτω από την Ευρασιατική, με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται μία αλυσίδα ηφαιστείων, η οποία διαγράφει το Ελληνικό Ηφαιστειακό Τόξο. Συγκεκριμένα, η ηφαιστειακή δράση καθορίζεται από την κατάδυση της λιθόσφαιρας της Ανατολικής Μεσογείου (πρόσθιο μέρος της Αφρικανικής λιθοσφαιρικής πλάκας κάτω από το Αιγαίο) και από την επέκταση της λιθόσφαιρας του Αιγαίου (πρόσθιο μέρος της Ευρασιατικής πλάκας) κατά τη διεύθυνση Βορρά-Νότου. Η επέκταση της λιθόσφαιρας του Αιγαίου στο ηφαιστειακό τόξο έχει ως συνέπεια τη διάρρηξη της λιθόσφαιρας σε κανονικά ρήγματα και την εκδήλωση των ηφαιστειακών φαινομένων. Το ηφαιστειακό πεδίο της Σαντορίνης περιλαμβάνει τα ηφαιστειακά κέντρα Χριστιανών, Σαντορίνης και Κολούμπο. Όλα τα ηφαιστειακά κέντρα εντοπίζονται κατά μήκος δύο ηφαιστειακών-τεκτονικών γραμμών, της Γραμμής Καμένης και της Γραμμής Κολούμπο (Εικ. 1.1.).

Το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο βρίσκεται 7 km βορειοανατολικά της Σαντορίνης και το 1650 μ.Χ για πρώτη φορά καταγράφηκε η έκρηξή του, με την ανάβλυση τοξικών αερίων προκαλώντας 70 νεκρούς στο νησί. Περιλαμβάνει έναν

από τους 20 υποθαλάσσιους κώνους που βρίσκονται βόρεια και ανατολικά του ρήγματος. Ο κρατήρας έχει διάμετρο 1700 m, το χείλος του βρίσκεται 18 m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας, ενώ ο πυθμένας σε βάθος 505 m. Το 2006, στα πλαίσια της εξερευνητικής αποστολής ΦΑΙΔΡΑ με το ωκεανογραφικό πλοίο ΑΙΓΑΙΟ και στη συνέχεια το 2010 και 2011 με το ωκεανογραφικό πλοίο *Nautilus* και τη χρήση υποβρύχιου οχήματος ROV (Remote Operating Vehicle) πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη του υδροθερμικού πεδίου, επιφάνειας περίπου 25 m², που βρίσκεται στη βορειοανατολική πλευρά του κρατήρα (αυτήν την εργασία αφορούν τα αποτελέσματα από την εξερευνητική αποστολή του 2010).



Εικόνα 1.1. Βυθομετρικός χάρτης του ηφαιστειακού συμπλέγματος Σαντορίνης – Κολούμπο με ένδειξη της ηφαιστειακής-τεκτονικής γραμμής (Γραμμή Κολούμπο) κατά μήκος της οποίας εντοπίζονται ηφαιστειακά κέντρα (μωβ γραμμή). Η περιοχή της Γραμμής Κολούμπο αποτελεί μία ρηξιγενή ζώνη οριζόντιας ολίσθησης, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την άνοδο του μάγματος και οριοθετείται από τις ρηξιγενείς ζώνες Ίου και Ανύδρου Λεκάνης (Kiliás και συνεργάτες, 2013).



Εικ. 1.2. (Α) Βαθυμετρικός χάρτης του υποθαλάσσιου ηφαιστίου Κολούμπο, με επισήμανση (κόκκινο τετράγωνο) της βόρειας περιοχής του κρατήρα, όπου εντοπίστηκε το υδροθερμικό πεδίο. (Β) Λεπτομερής βαθυμετρικός χάρτης του παραπάνω υδροθερμικού πεδίου. Με κόκκινες κηλίδες αναφέρεται η τοποθεσία των μεγαλύτερων υδροθερμικών καμινάδων που παρατηρήθηκαν: «Πολιτεία» (δείγμα της οποίας έχει χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία), «Σαμπάνια», «Διαχυτής 2» και «Κερί του Ποιητή». Οι πιο ενεργές από τις καμινάδες ανιχνεύθηκαν στο νότιο τμήμα, ενώ οι περισσότερες ανενεργές καμινάδες εντοπίστηκαν στο βόρειο τμήμα του υδροθερμικού πεδίου (Kilias και συνεργάτες, 2013).

Τα τοιχώματα του κρατήρα σε βάθη 150 - 270 m παρουσιάζουν διαστρωμάτωση αποθέσεων κίσηρης, ενός ηφαιστειογενούς πετρώματος που σχηματίζεται από την ψηχόμενη λάβα, ενώ σε μικρότερα βάθη είναι καλυμμένα από πυκνούς μικροβιακούς τάπητες. Το ίζημα του πυθμένα παρουσιάζει επιστρώσεις οξυυδροξειδίου του σιδήρου και λευκών και πορτοκαλί μικροβιακών ταπήτων και θερμοκρασία 16,2–17 °C (Kilias και συνεργάτες, 2013).

Σε διάσπαρτα σημεία παρατηρούνται κοιλότητες από τις οποίες εκλύονται ρευστά και φυσαλίδες διοξειδίου του άνθρακα σε θερμοκρασία ≤ 70 °C. Μετά τα 250 m βάθος, στην κολώνα του νερού παρατηρούνται πυκνά διασκορπισμένα μικρά τμήματα ιζήματος με αποικίες μικροοργανισμών. Παρατηρήθηκε επίσης ισχυρή διαστρωμάτωση με έντονη διαβάθμιση της πυκνότητας του νερού και του pH (~ 5). Σε ορισμένα κοιλώματα του κρατήρα βρίσκονται υπολείμματα από ανενεργές καμινάδες.

Οι ενεργές καμινάδες (Εικ. 1.2.) που φτάνουν σε ύψος τα 4 m, εκλύουν άχρωμα αέρια (99% CO₂) και ρευστά σε θερμοκρασία έως και 220 °C. Πυκνές αποικίες νηματοειδών μικροοργανισμών καλύπτουν τα τοιχώματα των καμινάδων ενώ στο εσωτερικό τους είναι πορώδεις κι αποτελούνται από έναν κεντρικό αγωγό με πολύ διαπερατά τοιχώματα επιτρέποντας τη ροή ρευστού προς την επιφάνεια. Το εξωτερικό περίβλημα των τοιχωμάτων αποτελείται από δικτυωτό ιστό κρυστάλλων βαρύτη (BaSO₄) και ανυδρίτη (CaSO₄), ενώ το εσωτερικό από εναλλασσόμενα στρώματα βαρύτη και ορυκτών θειούχων μετάλλων όπως σιδηροπυρίτη (FeS₂), σφαλερίτη (ZnS), μαρκασίτη (FeS₂) και γαληνίτη (PbS). Αντίθετα, οι ανενεργές καμινάδες έχουν διαφορετική σύσταση κι αποτελούνται από άμορφο πυρίτιο (Si), γκαιτίτη [Fe³⁺+O(OH)] και αλίτη (NaCl). Η διαδικασία ορυκτοποίησης που οδηγεί στον σχηματισμό των καμινάδων με την παραπάνω σύσταση έχει συναντηθεί για πρώτη φορά σε υποθαλάσσια υδροθερμικά πεδία στην τάφρο Okinawa (Ιαπωνία) κι ονομάζεται Kuroko-type mineralization (Sigurdsson και συνεργάτες, 2006β).

Φυλογενετική μελέτη σε δείγματα ιζήματος και καμινάδων (Kilias και συνεργάτες, 2013) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού αποτελούσαν αρχαία του είδους *Nitrosopumilus maritimus*, φύλο *Thaumarchaeota*. Πρόκειται για μεσόφιλους χημειοανότροφους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας αμμωνία (νιτροποίηση) και ανόργανο άνθρακα (CO₂). Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη ανάμεσα στους βακτηριακούς πληθυσμούς, ο μεγαλύτερος

ήταν εκείνος των πρωτεοβακτηρίων, τα οποία θεωρούνται από τους πιο συνήθεις μικροοργανισμούς τέτοιων οικοσυστημάτων.

1.4. Βιοϋμένια και παραγωγή βιοενεργών ενώσεων στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας

Στα υδάτινα οικοσυστήματα τα βακτήρια οργανώνονται σε εδραία πολύ πυκνά συσσωματώματα κυττάρων (βιοϋμένια) και καταφέρνουν να παραμένουν ενωμένα επειδή περιβάλλονται από ένα στρώμα εκκρινόμενων εξωπολυσακχαριτών. Η μεγάλη πυκνότητα των βιοϋμενίων οφείλεται στην ανθεκτικότητα σε εξωγενείς παράγοντες καταπόνησης και στη συσσώρευση θρεπτικών ουσιών (Costerton και συνεργάτες, 1999, Hall-Stoodley και συνεργάτες, 2004) αλλά και στην προστασία των βακτηρίων έναντι των θηρευτών τους (Darby και συνεργάτες, 2002, Matz και Kjelleberg, 2005) επιτρέποντας πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυττάρων σε σχέση με τους μικροβιακούς πληθυσμούς στη στήλη του νερού. Από το γεγονός πως τα μικρόβια στο νερό επικοινωνούν χημικά μεταξύ τους τόσο σε επίπεδο διαφορετικών ειδών όσο και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Sieg και συνεργάτες, 2011) συμπεραίνεται ότι και για τους βενθικούς μικροοργανισμούς είναι απαραίτητη η χημική επικοινωνία προκειμένου να προσκολλώνται σε επιφάνειες και να σχηματίζουν πυκνούς μικροβιακούς τάπητες.

Η δημιουργία βιοϋμενίων θεωρείται πως προέρχεται από χημικές ενώσεις που δρουν ως αυτο-επαγωγείς και προκαλούν συγχρονισμένες μεταβολές σε επίπεδο φυσιολογίας του κυττάρου. Δεδομένου ότι τα βιοϋμένια ανιχνεύονται σχεδόν αμέσως από τα πρωτόζωα, οι βακτηριακοί πληθυσμοί μετατρέπονται σε είδη ανθεκτικά στη θήρευση. Πειράματα που έγιναν με βακτηριοφάγα πρωτόζωα απέδειξαν πως η οργάνωση των βενθικών βακτηριακών πληθυσμών σε βιοϋμένια τους προστατεύει από τους θηρευτές τους (Jurgens και Matz, 2002). Η δημιουργία μικροβιακών συσσωματωμάτων υπό τη μορφή βιοϋμενίων προσφέρει προστασία στους μικροοργανισμούς ενώ παράλληλα αποτελεί γι' αυτούς ένα άκρως ανταγωνιστικό περιβάλλον, όσον αφορά στον χώρο και στις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες. Με την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών διατηρείται σταθερή η σύσταση του βιοϋμενίων (Penesyan και συνεργάτες, 2010) και παρέχεται χημική άμυνα έναντι των ευκαρυωτικών θηρευτών (Matz και συνεργάτες, 2008). Μελέτες που αφορούσαν τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις, οδήγησαν στην ανακάλυψη πολλών αντιμικροβιακών

ενώσεων επειδή βασίστηκαν στο γεγονός πως οι περισσότεροι μικροοργανισμοί είναι παραγωγοί βιοενεργών ουσιών προκειμένου να εμποδίσουν την προσκόλληση, ανάπτυξη και/ή την επιβίωση των ανταγωνιστών τους (Rahman και συνεργάτες, 2010). Οι μικροοργανισμοί που παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να στερούν την ικανότητα αναπαραγωγής ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των ανταγωνιστών τους κι ίσως αυτή να είναι η αιτία που τα βακτήρια στο φυσικό περιβάλλον είναι πολύ ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (D'Costa και συνεργάτες, 2006, Dantas και συνεργάτες, 2008). Η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων επιδρά σημαντικά και στη σταθερότητα των πληθυσμών του βιοϋμενίου, συμμετέχοντας στη μικροβιακή τροφική αλυσίδα και τη διαχείριση της ενέργειας σε σχέση με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών.

Μελέτες που έγιναν για να αξιολογηθεί η αλλαγή του ποσοστού έκφρασης του γονιδιώματος σε σχέση με το μέγεθός του, απέδειξαν πως το μέγεθος του γονιδιώματος συσχετίζεται με τον δευτερογενή μεταβολισμό και συγκεκριμένα το ποσοστό των υπεύθυνων γονιδίων για την έκφραση του δευτερογενούς μεταβολισμού αυξάνεται με την αύξηση του γονιδιώματος. Τα αποτελέσματα μεταγονιδιακών αναλύσεων βακτηρίων από το νερό αποκάλυψαν πως το γονιδίωμα βακτηριακών πληθυσμών βαθιάς θάλασσας έχει μεγαλύτερο μέγεθος από εκείνο που συναντάται σε μικρά βάθη και άρα χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη μεταβολική ποικιλότητα (Konstantinidis και συνεργάτες, 2009).

Τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας αποτελούν οάσεις του πυθμένα, με εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις χημιοσυνθετικών μικροοργανισμών (πρωτογενής παραγωγή απουσία φωτός), δείκτη βιοποικιλότητας και ρυθμούς ανάπτυξης της ίδιας τάξης με τα ρηχά τροπικά οικοσυστήματα (Corliss και συνεργάτες, 1979). Οι κοραλλιογενείς ύφαλοι, αντίθετα με τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, έχουν μελετηθεί εκτενώς και κυρίως οι οργανισμοί που αποτελούν τροφή ευρέως φάσματος θηρευτών επειδή παράγουν μεγάλο ποσοστό δευτερογενών μεταβολιτών (Hay και Steinberg, 1992, Paul, 1992).

Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο λόγος για τον οποίο οι θηρευτές δεν τρέφονται με τη διαθέσιμη ζωική ύλη των υδροθερμικών πεδίων βαθιάς θάλασσας, συλλέχθηκαν ασπόνδυλα και αφού διαχωρίστηκαν οι διάφοροι ιστοί, δόθηκαν ως τροφή σε ψάρια. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν πως οι ιστοί που δεν καταναλώθηκαν περιείχαν συμβιωτικά βακτήρια, πράγμα που αποδεικνύει πως δεν είναι το τοξικό

υδρόθειο υπεύθυνο για την παρεμπόδιση της θήρευσης, αλλά οι μικροβιακοί μεταβολίτες που παρήγαγαν τα βακτήρια αυτά (Kicklighter και συνεργάτες, 2004).

Τα πρωτεοβακτήρια αποτελούν τη μεγαλύτερη ταξινομική ομάδα βακτηρίων στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα οργανισμών όσον αφορά στα μεγέθη του γονιδιώματος και στον μεταβολισμό τους. Περιλαμβάνονται θειο-οξειδωτικά βακτήρια (π.χ. το γένος *Beggiatoa*), μεθανότροφα (γένος *Methylobacter*), νιτροποιητικά (γένος *Nitrococcus*) όπως και βακτήρια που εκλύουν βιοφωταύγεια (ορισμένα από τα είδη του γένους *Vibrio*). Τα γ - και δ -πρωτεοβακτήρια, που περιλαμβάνουν αρπακτικά είδη με ικανότητα κίνησης και ασυνήθιστα μεγάλα μεγέθη γονιδιώματος, πιστεύεται πως παράγουν βιοενεργές ουσίες προκειμένου να αποδυναμώσουν ή να ακινητοποιήσουν τη λεία τους (Nett, και Konig, 2007).

Τα ϵ -πρωτεοβακτήρια αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων των υδροθερμικών πεδίων. Πρόκειται για μικροαερόφιλα βακτήρια που μεταβολίζουν θείο και παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ενδημισμού για συγκεκριμένους οικοτόπους χάρις στην πλαστικότητα του γονιδιώματός τους, το οποίο δεν περιλαμβάνει πολλά από τα υπεύθυνα γονίδια για την επιδιόρθωση του DNA τους (Nakagawa και συνεργάτες, 2007). Οι χημικές ενώσεις που παράγουν, συνεισφέρουν στον σχηματισμό των αποικιών τους υπό τη μορφή νηματοειδών συσσωματωμάτων (Harmsen και συνεργάτες, 1997, Cary και συνεργάτες, 1997, Santelli και συνεργάτες, 2008).

1.4.1. Οι μικροοργανισμοί ως παραγωγείς δευτερογενών μεταβολιτών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι φυσικά παραγόμενες ουσίες, χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από μεμονωμένα είδη ή γένη για συγκεκριμένους φυσιολογικούς, «κοινωνικούς» ή προστατευτικούς λόγους κι είναι στενά συνδεδεμένοι με την οικολογία των οργανισμών που τους συνθέτουν. Ο πρώτος δευτερογενής μεταβολίτης που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία από τον Gosio το 1860 ήταν το μυκοφαινολικό οξύ, το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium glaucoma* (Bérdy J., 2005).

Στους δευτερογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνονται πεπτίδια, πολυκετίδια, υδατάνθρακες, λιπίδια, τερπενοειδή, στεροειδή και αλκαλοειδή τα οποία σχηματίζονται από πρωτογενείς μεταβολίτες. Παράγονται κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες κι έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες που στοχεύουν στη ρύθμιση των σχέσεων αλληλεξάρτησης μεταξύ των μικροοργανισμών. Για τον λόγο αυτό πιστεύεται πως σε συνθήκες εργαστηρίου δε μπορεί να παρατηρηθεί ολόκληρο το μεταβολικό φάσμα τέτοιου τύπου ενώσεων αφού οι μικροβιακοί παραγωγείς τους δεν αναπτύσσονται όπως στο φυσικό τους περιβάλλον.

Υποστηρίζεται πως αρχικά τα αντιβιοτικά αλλά κι άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονταν από χημικές αντιδράσεις απουσία ενζύμων κι έπαιζαν πολύ σημαντικό εξελικτικό ρόλο στην πραγματοποίηση και διαμόρφωση προϊστορικών αντιδράσεων, όπως η πρωτόγονη μεταγραφή και μετάφραση, αντιδρώντας με υποδοχείς πρωτόγονων μακρομορίων (O'Brien και Wright, 2011). Αργότερα, αντικαταστάθηκαν από τα πολυπεπτίδια αλλά συνέχισαν να διατηρούν την ικανότητα σύνδεσής τους με υποδοχείς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Έτσι, αντί να συμμετέχουν στη σύνθεση μακρομορίων, απέκτησαν ανταγωνιστική λειτουργία δρώντας ως αναστολείς ενζύμων, ανταγωνιστές υποδοχέα κ.ά. διεγείροντας τη μεταφορά γονιδίων, τη μεταγραφή, την έκφραση, την κυτταρική ανάπτυξη και μεταλλαξιγένεση (O'Brien και συνεργάτες, 2011). Τα αντιβιοτικά για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης θεωρούνται ότι παράγονται από «επιτυχημένα» μεταβολικά μονοπάτια.

Στο περιβάλλον, κάποιοι από τους μικροβιακούς μεταβολίτες παράγονται σε μικρές συγκεντρώσεις κι ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται συμβάλλουν στη διατήρηση της σταθερής σύστασης των μικροβιακών πληθυσμών. Με την τροποποίηση της γονιδιακής μεταγραφής ρυθμίζεται η γονιδιακή τους έκφραση και άρα οι αλληλεπιδράσεις τους με τους οργανισμούς που τους περιβάλλουν. Εκτός από ανταγωνιστικές, λόγω της παραγωγής ουσιών με αντιβιοτική δράση, οι μικροβιακές κοινότητες παρουσιάζουν κι ένα οργανωμένο δίκτυο επικοινωνίας (Li και Tian, 2012). Δεδομένου ότι ο κύριος μηχανισμός ελέγχου των κυτταρικών λειτουργιών είναι η ρύθμιση της μεταγραφής, έχει αποδειχτεί ότι σε μικρές συγκεντρώσεις οι μεταβολίτες μπορούν να προκαλέσουν τη βακτηριακή υπέρ- ή υπό- έκφραση μεγάλου αριθμού μεταγράφων που καθορίζουν τις περιβαλλοντικές επιδράσεις (Goh και συνεργάτες, 2002). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως στη φύση, οι περισσότεροι μικρομοριακοί μεταβολίτες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τις διαδικασίες

μεταγραφής σε κύτταρα στόχους (στα βακτήρια τροποποιείται το 5-10% του συνόλου των μετάγραφων) όταν η τιμή της συγκέντρωσή τους είναι από 1 έως 50% της τιμής που παρουσιάζουν όταν εμφανίζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Goh και συνεργάτες, 2002). Ανάλογα λοιπόν με τη συγκέντρωσή τους οι βιοενεργοί μεταβολίτες έχουν διαφορετική δράση (φαινόμενο το οποίο ονομάζεται όρμηση) κι αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς μακρομοριακούς υποδοχείς (ριβόσωμα ή RNA πολυμεράση).

Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, κάποιοι από τους δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αντιβιοτική δράση προστατεύοντας τους οργανισμούς που τους παράγουν και θεωρούνται πιο σημαντικά όπλα από τις μακρομοριακές τοξίνες όπως οι κολικίνες και τα ζωικά δηλητήρια λόγω της ικανότητας διάχυσής τους στα κύτταρα και των πολύπλευρων τρόπων δράσης τους (Cavalier-Smith, 2006). Οι αντιβιοτικές ουσίες που έχουν απομονωθεί και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών και λοιμώξεων διαχωρίζονται σε βακτηριοκτόνες και βακτηριοστατικές και περιλαμβάνουν κεφαλοσπορίνες, γλυκοπεπτίδια, λιποπεπτίδια κ.τ.λ. Στελέχη από τα Ακτινοβακτήρια και το γένος *Streptomyces* περιλαμβάνονται στους πιο σημαντικούς προκαρυωτικούς παραγωγούς αντιβιοτικών καθώς και αντικαρκινικών ουσιών (Hopwood, 2007). Αναλύσεις στο γονιδίωμα του στρεπτομύκητα *Streptomyces coelicolor* έδειξαν πως περιέχει περισσότερες από 20 βιοσυνθετικές ομάδες γονιδίων δευτερογενούς μεταβολισμού εκ των οποίων μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός εκφράζεται σε εργαστηριακές συνθήκες (Bentley και συνεργάτες, 2002). Η γνώση των οικολογικών λειτουργιών και των προϋποθέσεων για τη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών θα συνδράμει στην κατανόηση των βιοσυνθετικών ρυθμιστικών μονοπατιών δίνοντας τη δυνατότητα για τη βιοσύνθεσή τους *in vitro* (Newman και Cragg, 2007, Bull, 2010).

1.4.2. Παραγωγή βιοενεργών ουσιών από θαλάσσιους μικροοργανισμούς υδροθερμικών πεδίων

α) Ανίχνευση

Η διαδικασία διερεύνησης της παραγωγής βιοενεργών ουσιών γίνεται πάντα στο εργαστήριο και σε μικροβιακά στελέχη που έχουν απομονωθεί από το φυσικό περιβάλλον. Αφού τα βακτήρια απομονωθούν, καλλιεργούνται σε μεγαλύτερους

όγκους για τη χημική ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών και την ταυτοποίηση των ενώσεων, αλλά και τη βελτιστοποίηση της παραγωγής τους με την επιλογή των κατάλληλων φυσικοχημικών συνθηκών.

Η καλλιέργεια μικροοργανισμών σε συνθήκες εργαστηρίου για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών συχνά αποκαλύπτει μία μικρή ποικιλία μεταβολικών προτύπων. Αν και είναι γνωστό πως συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε καθαρές καλλιέργειες συνδέονται με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, παραμένει άγνωστος ο ακριβής μηχανισμός που τη στηρίζει. Η συμμετοχή χημικών ή περιβαλλοντικών σημάτων που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της διαδικασίας δεν έχει αποδειχτεί διεξοδικά αν και πρόσφατα εντοπίστηκε σε στέλεχος στρεπτομύκητα ένα μονοπάτι σηματοδότησης που συνδέει τις συνθήκες καταπόνησης που προκύπτουν λόγω έλλειψης θρεπτικών με την παραγωγή αντιβιοτικού (Rigali και συνεργάτες, 2008). Η γνώση των φυσικών συνθηκών που οδηγούν στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων είναι πολύ περιορισμένη, αλλά θα ήταν χρήσιμη για την ανάπτυξη νέων τεχνικών καλλιέργειας κι απομόνωσης. Για να μελετηθεί σε βάθος η μικροβιακή επικοινωνία που θα μπορούσε να προσφέρει στην ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων, έγινε προσπάθεια προσομοίωσης του φυσικού περιβάλλοντος με τη συγκαλλιέργεια μικροοργανισμών από το ίδιο ενδιαίτημα ή χρήση των ενώσεων που δραστηριοποιούνται στη διακυτταρική επικοινωνία (Shank και Kolter, 2009).

Προκειμένου να ανιχνευθεί η βιοδραστικότητα των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών επιλέγεται ένα ευρύ φάσμα από προσεχτικά σχεδιασμένες βιολογικές δοκιμασίες. Οι δοκιμές αυτές περιλαμβάνουν τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης έναντι επιλεγμένων μικροοργανισμών όπως ιούς, βακτήρια αρνητικά και θετικά κατά Gram, ζύμες, μύκητες παθογόνους και μη, οι οποίοι αποτελούν τους «μικροβιακούς δείκτες» καθώς επίσης και ιστοκαλλιέργειες διαφόρων καρκινικών κυττάρων και ένζυμα που αφορούν στη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών και που σχετίζονται με τον μεταβολισμό (Luesch και συνεργάτες, 2006, Mayer και συνεργάτες, 2010). Σε κάθε περίπτωση, οι δοκιμές αυτές χρειάζεται να είναι συμβατές με τις βιοενεργές ενώσεις και συγκεκριμένα με τα εκχυλίσματα των υπό εξέταση οργανισμών, τα οποία μερικές φορές δρουν ανασταλτικά ή παρεμβαίνουν με τη μέθοδο της ανίχνευσης.

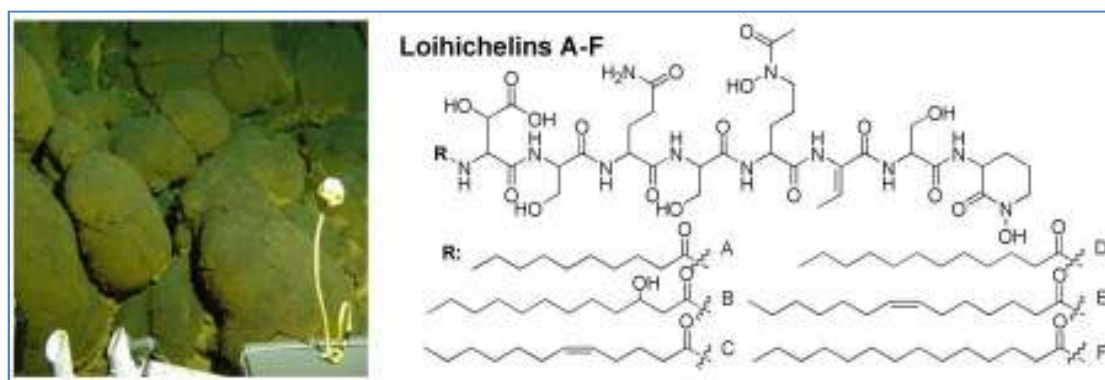
Τα φυσικά οικοσυστήματα αποτελούν σημαντική πηγή βιοενεργών ενώσεων και άρα πιθανών νέων φαρμάκων. Μέσα σε λίγες δεκαετίες έχει ανακαλυφθεί πλήθος

βιοενεργών ενώσεων από φυσικά οικοσυστήματα χωρίς όμως να αποφεύγεται ταυτόχρονα και η απομόνωση ήδη γνωστών ενώσεων (Penesyan και συνεργάτες, 2010). Έχουν γίνει προσπάθειες για την προκαταρκτική ανίχνευση γνωστών βιοενεργών ενώσεων σε ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα όπως με τη διαφορική ανάλυση των συστοιχιών των φασμάτων 2D NMR (Schroeder και συνεργάτες, 2007) σε συνδυασμό με τη δημιουργία μεγάλων βάσεων δεδομένων, ώστε να επιτυγχάνεται γρήγορα η ταυτοποίηση των γνωστών και συγχρόνως η ανίχνευση πιθανά νέων ενώσεων. Προκειμένου να ελεγχθούν αυτές οι ενώσεις, χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν βιβλιοθήκες ακατέργαστων εκχυλισμάτων καθώς και προ-κλασματικές βιβλιοθήκες φυσικών προϊόντων επειδή η επεξεργασία των δειγμάτων σε αυτή την περίπτωση έχει χαμηλότερες απαιτήσεις εργαστηριακής προετοιμασίας (Wagenaar, 2008). Η χρήση τεχνικών φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με φασματικές βάσεις δεδομένων, μεθόδους προετοιμασίας με HPLC και ποιοτικό έλεγχο με ανάλυση NMR αποτελούν ισχυρά εργαλεία που διευκολύνουν σε μεγάλο βαθμό τον προκαταρκτικό χαρακτηρισμό και την αποτελεσματική δημιουργία βιβλιοθηκών φυσικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Η παραπάνω προσέγγιση που συνδυάζει τη βασική έρευνα με την απομόνωση καθαρών κλασμάτων και τη σύγκρισή τους με βιβλιοθήκες καθαρών ενώσεων, θα μπορούσε να προσφέρει νέες δυνατότητες για την εξεύρεση νέων φυσικών προϊόντων από θαλάσσιους πόρους (Koehn, 2008).

Τα πρώτα νέα φυσικά προϊόντα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και προέρχονται από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας είναι οι λοϊχικελίνες A-F (Thornburg και συνεργάτες 2010) (Εικ. 1.3.). Πρόκειται για αμφιφιλικά πεπτιδικά σιδηροφόρα που απομονώθηκαν από καλλιέργειες του ετερότροφου βακτηρίου *Halomonas* LOB-5. Στελέχη του γένους *Halomonas* δημιουργούν αποικίες στις καμινάδες και στο διαβρωμένο ηφαιστιακό βασάλτη κι έχουν τη λειτουργική ικανότητα να οξειδώνουν Fe(II) και Mn(II).

Συγκεκριμένα, το παραπάνω στέλεχος αναπτύχθηκε σε κλειστή καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα (ASG-Fe) και μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Κατόπιν συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση το υπερκείμενο της καλλιέργειας και στη συνέχεια έγινε σε διαδοχικά στάδια η εξαγωγή των σιδηροφόρων σε στερεή φάση (Martinez και συνεργάτες, 2000). Τα κλάσματα (A-F) που προέκυψαν συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν προκειμένου να διαχωριστούν περαιτέρω με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης και τα κλάσματα που προέκυψαν κατόπιν,

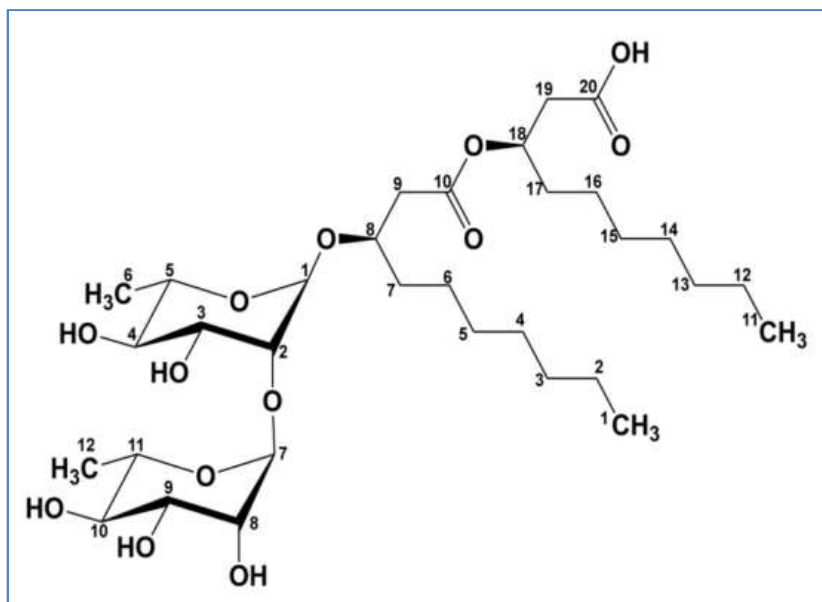
συμπυκνώθηκαν υπό μειωμένη πίεση και λυοφιλιώθηκαν. Η ανάλυση των αμινοξέων για καθένα από τα κλάσματα αυτά έγινε με την υδρόλυσή τους σε υδροϊωδικό οξύ, την παραγοντοποίηση με αντιδραστήριο Marfey (Marfey, 1984) και την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης. Η ταυτοποίηση των στερεοϊσομερών D- και L- που προέκυψαν έγινε από τη σύγκρισή τους με γνωστές δομές από τη βιβλιογραφία. Ο καθορισμός της θέσης των D- και L- αμινοξέων στα πεπτίδια έγινε με υδρόλυση, παραγοντοποίηση με (DABITC) (Chang, 1981) και διαχωρισμό σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης. Το καθένα από τα πεπτιδικά χειρόμορφα κλάσματα που προέκυψαν, διαχωρίστηκε με αεριοχρωματογραφία / φασματομετρία μαζών (GC/MS). Οι χαρακτηριστικές ομάδες των λιπαρών οξέων αναγνωρίστηκαν με τη δημιουργία αντίστοιχων μεθυλ-εστέρων οι οποίοι αναλύθηκαν με αεριοχρωματογραφία/φασματομετρία μαζών (GC/MS) και στη συνέχεια οι δομές τους συγκρίθηκαν με αντίστοιχες στη βιβλιογραφία. Η θέση του ακόρεστου δεσμού του λιπαρού οξέως καθορίστηκε με οζονόλυση (Homann και συνεργάτες, 2009).



Εικόνα 1.3. Η δομή των 6 απομονωθέντων σιδηροφόρων: στο επάνω μέρος της εικόνας φαίνεται ο κοινός υδρόφιλος σκελετός R των μορίων και από κάτω παραθέτονται τα διαφορετικά λιπαρά οξέα (A-F) που αποτελούν το υδρόφιλο τμήμα τους (Homann και συνεργάτες, 2009).

Οι σιδηροφόρες ενώσεις που προέκυψαν (λοϊχηκελίνες) αποτελούν τα πιο υδρόφιλα αμφιφιλικά σιδηρόφορα που έχουν περιγραφεί και παρουσιάζουν ομάδες οκταπεπτιδικών πολικών κέντρων και λιπαρών οξέων. Τα ιόντα σιδήρου συγκρατώνται από τις λοϊχηκελίνες χάρις στο σύμπλεγμα που δημιουργείται από 2 υδροξαμικές ομάδες και 1 υδροξυασπαρτικό υπόλειμμα. Ο δεσμευόμενος σίδηρος από τις ενώσεις αυτές δεν έχει ακόμα διαπιστωθεί αν χρησιμοποιείται ως τροφή ή καταναλώνεται για την παροχή ενέργειας.

Επίσης, το 2014 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η απομόνωση μίας επιφανειοδραστικής ουσίας από δείγμα ιζήματος σε υδροθερμικό πεδίο βαθιάς θάλασσας (1.490 m), στη βορειοδυτική μεσο-ωκεάνια ράχη του Ινδικού Ωκεανού. Η ουσία αυτή ανήκει στην κατηγορία των δι-ραμνολιπιδίων και απομονώθηκε από το στέλεχος *Dietzia maris* AS-13-3 (οικογένεια *Dietziaceae*, *Actinobacteria*). Τα ραμνολιπίδια είναι γλυκοσιδικές ενώσεις που παράγονται κυρίως από πρωτεοβακτήρια, όπως στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Οι βιοτεχνολογικές τους εφαρμογές περιλαμβάνουν τη βιοαποικοδόμηση του πετρελαίου, τη χρήση τους στη βιομηχανία καλλυντικών, ως ενυδατικά συστατικά και στη φαρμακοβιομηχανία λόγω της αντιμικροβιακής και αντικής δράσης τους. Η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (CMC) του απομονωθέντος δι-ραμνολιπιδίου (Εικ. 1.4.) ήταν 120 mg l^{-1} , ενώ η επιφανειακή τάση του νερού παρουσία του τασιοενεργού μειώθηκε από 74 ± 0.2 σε $38 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$.



Εικόνα 1.4. Δομή του του δι-ραμνολιπιδίου που παράχθηκε από το στέλεχος AS-13-3 (Wang και συνεργάτες, 2014).

Η απομόνωση του μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την κλειστή καλλιέργεια του ακτινοβακτηρίου σε θρεπτικό υπόστρωμα (MSM) και μόνη πηγή άνθρακα το n-εξαδεκάνιο (Qiao και Shao, 2010). Ακολούθησε φυγοκέντρωση για την απομόνωση της υδρόφοβης στοιβάδας, απομάκρυνση των αλκανίων και χρωματογραφία σε στήλη πυριτικής γέλης και σύστημα αυξανόμενης πολικότητας. Όσα από τα κλάσματα που προέκυψαν, ήταν τασιοενεργά, διαχωρίστηκαν περαιτέρω με εκχύλιση στερεής φάσης κι επιλέχθηκαν τα κλάσματα εκείνα με υψηλή επιφανειοδραστικότητα. Ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε 4 διαφορετικά συστήματα διαλυτών για

την ανίχνευση γλυκολιπιδίων, λιποπεπτιδίων, φωσφολιπιδίων και λιπαρών οξέων και υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Από τα κλάσματα που προέκυψαν, επιλέχθηκε το κλάσμα που προκαλούσε τη μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης του νερού. Η επιφανειοδραστική ουσία ανιχνεύθηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία μάζας (MS) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Εκτός από τη χημική απομόνωση, έγινε γονιδιωματική ανάλυση κι ανιχνεύθηκε το μεταβολικό μονοπάτι για την βιοαποικοδόμηση αλκανίων. Στη συνέχεια, με την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου διαπιστώθηκε η έκφραση των υπεύθυνων γονιδίων για την οξείδωση αλκανίων όταν το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε *n*-τετραδεκάνιο, *n*-εξαδεκάνιο και πριστάνιο (Wang και συνεργάτες, 2014).

β) Διαλογή δειγμάτων με την εφαρμογή βιολογικών δοκιμών

Η διαδικασία ανίχνευσης και απομόνωσης βιοενεργών ουσιών είναι δαπανηρή και χρονοβόρα, γι' αυτό οι προκαταρκτικές μέθοδοι βιοελέγχου *in vitro* χρησιμεύουν ως σημείο εκκίνησης της παραπάνω διαδικασίας. Ο σκοπός του βιοελέγχου είναι η ταχεία διαλογή μεταξύ μεγάλου αριθμού δειγμάτων και η επιλογή εκείνων που παρουσιάζουν βιοδραστικότητα για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Τα πειράματα βασίζονται στην ανίχνευση της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από τα εξεταζόμενα στελέχη, οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη κατάλληλων μικροβιακών δεικτών. Για την επιλογή των δεικτών, προτιμούνται στελέχη αντιπροσωπευτικών πληθυσμών του ίδιου ενδιαφέροντος από το οποίο απομονώθηκαν και τα υπό εξέταση στελέχη. Σε μελέτες που οι δοκιμές αποσκοπούν στην απομόνωση νέων αντιμικροβιακών ουσιών για την παραγωγή φαρμάκων, χρησιμοποιούνται ως δείκτες και στελέχη που όχι μόνο έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται στο ίδιο οικοσύστημα με τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς, αλλά και που συσχετίζονται με ανθρώπινες αρρώστιες. Η επιτυχής εφαρμογή των βιολογικών δοκιμών για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναστολής ανάπτυξης ενός δείκτη, βασίζεται στην ευαισθησία του δείκτη αυτού και στην αντιμικροβιακή δράση των βιοενεργών ουσιών στις οποίες εκτίθεται.

Ένα κριτήριο επιλογής μικροβιακών δεικτών είναι η φυλογενετική τους κατάταξη. Στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας τα βακτήρια που απαντώνται ανήκουν κυρίως στο φύλο *Proteobacteria* και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στα φύλα

Firmicutes, Bacteroidetes και Actinobacteria (Thornburg και συνεργάτες, 2010). Επίσης, από αυτά τα οικοσυστήματα έχουν απομονωθεί νηματοειδείς μύκητες και ζύμες που ανήκουν στα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota*, με κύριους εκπρόσωπους από τα γένη *Aspergillus*, *Candida*, *Debaryomyces* και *Rhodotorula* (Burgaud και συνεργάτες, 2010, Jiang και συνεργάτες, 2013). Εκτός από τη φυλογένεση, άλλο κριτήριο για την επιλογή μικροβιακών δεικτών αποτελεί η ανάπτυξη στρατηγικών προσαρμοστικότητας στις αντίξοες συνθήκες όπως η ικανότητα βιοαποικοδόμησης εξαιτίας της συσσώρευσης οργανικού τοξικού υλικού (Guerrero-Barajas και συνεργάτες, 2011) και η ανθεκτικότητα στην γ-ακτινοβολία (Jolivet και συνεργάτες, 2003).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να είναι αποδοτικές δίνοντας αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι βιοελέγχου, όπως η μέθοδος της αραίωσης και η μέθοδος της διάχυσης, επιτρέπουν την ανίχνευση βιοενεργότητας ενάντια σε περισσότερες από μία κατηγορίες μικροοργανισμών (Rahman και συνεργάτες, 2005).

Με τη μέθοδο της διάχυσης μπορεί να διαπιστωθεί η βιοενεργότητα περισσότερων από ένα διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, οι καλλιέργειες των οποίων επιστρώνονται σε στερεό υπόστρωμα. Μετά από 96 ώρες επώασης για πιθανή παραγωγή βιοενεργών ενώσεων, στο τριβλίο επιστρώνεται ο μικροοργανισμός δείκτης και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών εμφανίζεται ως ζώνη αναστολής ανάπτυξης του δείκτη γύρω από την αποικία του βακτηρίου (Penesyan και συνεργάτες, 2009). Με τη μέθοδο της διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, οι ζώνες αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού δείκτη, παράγονται όμοια με τα αντιβιογράμματα. Η μέθοδος αυτή είναι η περισσότερο χρησιμοποιημένη, παρ' όλα τα μειονεκτήματα και τους περιορισμούς που παρουσιάζει κατά την εφαρμογή της. Η απόδοση της μεθόδου, η οποία είναι επίπονη και χρονοβόρα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανθρώπινη ικανότητα και ακρίβεια, ενώ στις περιπτώσεις που οι ζώνες αναστολής δεν είναι ξεκάθαρες ή απόλυτα κυκλικές, τα αποτελέσματα αξιολογούνται με υποκειμενικά κριτήρια. Τέλος, επιπρόσθετος περιορισμός κατά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου αποτελεί η δυσκολία διάχυσης ορισμένων βιοενεργών ουσιών (Papagianni και συνεργάτες, 2006).

Η μέθοδος της αραίωσης εφαρμόζεται σε δείγμα που βρίσκεται διαλυμένο σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και εκτός από τη βιοενεργότητα, μπορεί να δώσει πληροφορίες

για τις συγκεντρώσεις δείγματος και δείκτη. Η ανάπτυξη του οργανισμού δείκτη ελέγχεται φωτομετρικά εκτιμώντας την Οπτική Πυκνότητα (ΟΠ) ή χρησιμοποιώντας χρωματικούς δείκτες προκειμένου να υπολογιστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή ανάπτυξης του δείκτη (minimum inhibitory concentration, MIC) (Pohanka, 2006). Η μέθοδος της αραίωσης παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση των ελάχιστων τιμών βιοενεργότητας σε σχέση με τη μέθοδο της διάχυσης και χρησιμοποιείται για ποσοτικές αναλύσεις. Πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και γι' αυτό οι μετρήσεις δεν υπόκεινται σε υποκειμενικά κριτήρια αν και μπορούν να δώσουν λάθος αποτελέσματα όταν το δείγμα περιέχει σωματίδια σκόνης ή σκουπίδια αφού η καθαρότητα του εμβολίου δεν μπορεί αν εξακριβωθεί (Jorgensen και Ferraro, 2009).

1.5. Γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση των ενζύμων που οδηγούν στον σχηματισμό μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, πολυκετιδίων και λιπαρών οξέων

Πολλές από τις βιοενεργές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους μικροοργανισμούς, όπως τα πεπτίδια μη ριβοσωμικής προέλευσης, τα πολυκετίδια και τα λιπαρά οξέα, φαίνεται πως προέρχονται από παρόμοια βιοσυνθετικά μονοπάτια με ενώσεις που έχουν απομονωθεί από χερσαίους μικροοργανισμούς και γι' αυτό προσεγγίζονται με βάση τις γνώσεις μας για ανάλογα χερσαία οικοσυστήματα. Η προσέγγιση αυτή, αφορά στον εντοπισμό των υπεύθυνων γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα τα οποία οδηγούν στη σύνθεση των μεταβολιτών καθώς και στην ανίχνευση των συντηρημένων περιοχών των γονιδίων αυτών. Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια, τα πολυκετίδια και τα λιπαρά οξέα, αποτελούν μεγάλες κατηγορίες φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης, με σημαντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Αν και στο σύνολό της, η δομή τους διαφέρει, παρουσιάζουν εντυπωσιακές ομοιότητες στον μηχανισμό με τον οποίο συναρμολογούνται. Οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες συνθέτονται από ενζυμικά σύνολα, όμοια όχι μόνο στη δομή αλλά και στην καταλυτική τους δραστηριότητα, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία υβριδικών συμπλόκων που διευρύνουν ακόμη περισσότερο την ποικιλία των παραπάνω δευτερογενών μεταβολιτών (Salomon και συνεργάτες, 2004).

Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια και τα πολυκετίδια αποτελούν κατηγορίες φυσικών προϊόντων μαζί με τα τερπένια, τα αλκαλοειδή, τα λιπαρά οξέα κτλ. Ο ημιάκαμπος σκελετός που αποτελεί τη βάση της ξεχωριστής δομής τους, αντικατοπτρίζει τα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν τα υπεύθυνα βιοσυνθετικά ένζυμα για την παραγωγή τους. Η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια και τα πολυκετίδια, φαίνεται να ενεργοποιείται ως απάντηση σε ιδιαίτερες συνθήκες και ερεθίσματα. Για παράδειγμα, οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες λειτουργούν ως χημικά σηματοδοτικά μόρια που εκκρίνονται όταν οι μικροβιακοί πληθυσμοί έχουν πολύ αυξημένες τιμές πυκνότητας σε μικροβιακές καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της φάσης επιβράδυνσης και όταν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών έχουν πολύ υψηλές τιμές (Walsh, 2003).

Τα δομικά στοιχεία των φυσικών προϊόντων αποτελούνται συνήθως από μονομερή συστατικά όπως τα αμινοξέα στην περίπτωση των μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, οι ακυλο-CoA θειοεστέρες των πολυκετιδίων, τα λιπαρά οξέα των λιπιδίων, οι ισοπρενύλ-φωσφατάσες των τερπενίων κ.ο.κ. Τα μονομερή αυτά συστατικά παράγονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό των κυττάρων και παραπέμπονται σε δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια ως άμεση απάντηση σε ενδο και εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Όσον αφορά στα μη ριβοσωμικά πεπτίδια και στα πολυκετίδια, η παραπάνω διαδικασία προϋποθέτει την ενεργοποίηση βιοσυνθετικών ομάδων γονιδίων που ευθύνονται για τη σύνθεση των εμπλεκόμενων ενζύμων. Κάποια από τα ένζυμα αυτά παράγουν τα απαραίτητα μονομερή, κάποια άλλα τα συγκεντρώνουν σε «αλυσίδες συναρμολόγησης» (Schwarzer, 2003) και τέλος μία τρίτη κατηγορία ενζύμων καθιστά το τελικό προϊόν βιοενεργό τροποποιώντας το, μέσω οξειδωτικών και γλυκοζυλιωτικών αντιδράσεων (Walsh και συνεργάτες, 2003). Με την ενσωμάτωση σε μία ομάδα όλων των υπεύθυνων γονιδίων για την παραγωγή των παραπάνω ενζύμων, επιτυγχάνεται η συντονισμένη ενζυμική λειτουργία αλλά κι η αποφυγή λαθών στην παραγωγή των μονομερών δομικών συστατικών.

Οι διαδικασίες που οδηγούν στην ποικιλομορφία της δομής των μη ριβοσωμικών πεπτιδίων, των πολυκετιδίων και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, περιλαμβάνουν την έκκριση της παραπάνω ενδιάμεσης γραμμικής αλυσίδας ως τελικό προϊόν, την τροποποίηση των αρχικών τμημάτων της αλυσίδας κατά τη διάρκεια των συμπυκνώσεων, τις αντιδράσεις κυκλοποίησης ή/και άλλων δομικών αλλαγών μετά το στάδιο της συμπύκνωσης. Στα μη ριβοσωμικά πεπτίδια, η

επιμήκυνση της αλυσίδας με επιμέρους τοποειδική κυκλοποίηση, μέσω αφυδάτωσης και οξείδωσης κυστεΐνυλο-, σερυλο- και θρεονυλο- ομάδων που βρίσκονται στο πλάι της σχηματιζόμενης αλυσίδας, οδηγεί στον σχηματισμό ποικίλων θειαζολίων και οξαζολίων. Αντίστοιχα, κατά την επιμήκυνση της πολυκετιδικής αλυσίδας, οι αρχικά σχηματιζόμενοι κετο-ακυλο-θειοεστέρες μέσω συμπυκνώσεων τύπου Claisen, είτε εκκρίνονται ως παράγωγα μεθυλενίου, είτε συσσωρεύονται ως κετο-, υδροξυ- ή ολεφινικά ενδιάμεσα προϊόντα (Rawlings, 2001). Η διαδικασία σχηματισμού των πεπτιδίων και πολυκετιδίων χωρίς την απελευθέρωση ενδιάμεσων ενώσεων, γίνεται με την αποδέσμευση της αλυσίδας από το ενζυμικό κέντρο με υδρόλυση. Στην αντίθετη περίπτωση το ενδιάμεσο προϊόν απελευθερώνεται μέσω ενδομοριακής τοποειδικής κυκλοποίησης μίας νουκλεόφιλης ρίζας -OH ή -NH οδηγώντας στη σύνθεση μακρολακτόνων ή μακρολακτάμων (Kohli και Walsh, 2003).

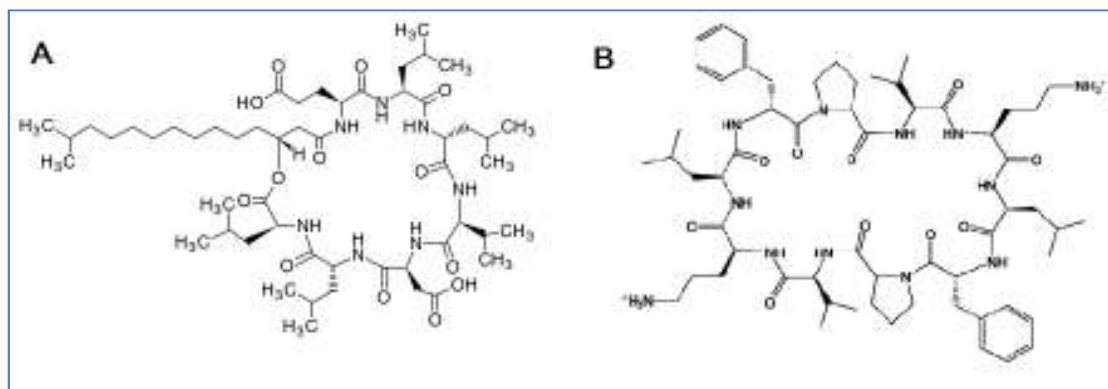
α) Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες [Non Ribosomal Peptide Synthases (NRPS)]

Οι μη ριβοσωμικές συνθετάσες (NRPS) αποτελούν μεγάλα σύμπλοκα ενζύμων που καταλύουν τη σύνθεση πεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση. Στον μηχανισμό παραγωγής τους δε συμμετέχουν τα ριβοσώματα, με αποτέλεσμα, οι δομικοί λίθοι από τους οποίους αποτελούνται, να περιλαμβάνουν πολύ περισσότερα από τα 20 αμινοξέα ριβοσωμικής προέλευσης.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να σχηματίζονται πολλά και διαφορετικά υποστρώματα (Marahiel και συνεργάτες, 1997), υπεύθυνα για τη σύνθεση πεπτιδίων από ασυνήθιστα αμινοξέα και διαφορετικές ενώσεις από εκείνες που συνθέτουν τα ριβοσωμικά πεπτίδια. Ως παραδείγματα θα μπορούσαν να αναφερθούν τα αντιβιοτικά σουρφακτίνη και γραμισιδίνη, που περιέχουν αλυσίδες λιπαρών οξέων και μη πρωτεϊνικών αμινοξέων αντίστοιχα (Εικ. 1.5.). Γονίδια για τη σύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων έχουν ανιχνευθεί κυρίως στο γονιδίωμα ακτινομυκήτων και βάκιλων αλλά και νηματοειδών μυκήτων (Faulkner, 2002).

i) Μηχανισμός δημιουργίας πεπτιδικής αλυσίδας από τις (NRPS)

Οι μη ριβοσωμικές συνθετάσες (NRPS) αποτελούνται από σύμπλοκα ενζυμικών ενοτήτων, καθένα από τα οποία περιέχει όλες τις απαιτούμενες καταλυτικές μονάδες για την ενσωμάτωση ενός μονομερούς στην αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα (Marahiel, 1997, von Döhren και συνεργάτες, 1997, Schwarzer και Marahiel, 2001, Mootz, 2002).



Εικόνα 1.5. (Α) Δομή του πεπτιδίου σουρφακτίνη και (Β) γραμισιδίνη.

Οι καταλυτικές μονάδες των παραπάνω ενοτήτων είναι ενζυμικές περιοχές – τομείς που καταλύουν την ενεργοποίηση του υποστρώματος, τη δημιουργία ενδιάμεσων προϊόντων με τη σύσταση ομοιοπολικών δεσμών και τέλος τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού (Stachelhaus και Marahiel, 1995). Οι ενζυμικές περιοχές με την ίδια ιδιότητα παρουσιάζουν υψηλά συντηρημένα μοτίβα αλληλουχιών τα οποία επιτρέπουν τον εντοπισμό τους σε επίπεδο πρωτεΐνης (Schwarzer και συνεργάτες, 2003). Έχει παρατηρηθεί ότι η αποκοπή τους από την πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν επηρεάζει την καταλυτική τους δράση, γεγονός που διευκολύνει την παρέμβαση στον μηχανισμό λειτουργίας τους.

Τα ενζυμικά σύμπλοκα επιμήκυνσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας περιέχουν:

- την αδενυλική (Α) πρωτεϊνική περιοχή που αναγνωρίζει το υπόστρωμα και το ενεργοποιεί με τη μορφή αμινοακυλο-αδενυλίου,
- την πρωτεϊνική περιοχή - μεταφορέα πεπτιδίων (PCP) (Peptidyl Carrier Protein) και
- την πρωτεϊνική περιοχή συμπίκνωσης (C) όπου καταλύεται ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μέσω συμπίκνωσης.

Εκτός από τις βασικές αυτές κατηγορίες των πρωτεϊνικών περιοχών, κάποια πρόσθετα ένζυμα τροποποιούν περαιτέρω το τελικό πεπτιδικό προϊόν.

Η αδενυλική περιοχή A (~ 550 αμινοξέα) είναι υπεύθυνη για την επιλογή των αμινοξέων κι επομένως τον πρωτογενή σκελετό του πεπτιδίου. Η λειτουργία της είναι παρόμοια με εκείνη της t-RNA στην πρωτεϊνσύνθεση, αλλά η δομή της παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνη της λουσιφεράσης που έχει απομονωθεί από την πυγολαμπίδα *Photinus pyralis*.

Η δομική περιοχή (PCP) (~80-100 αμινοξέα) λειτουργεί σαν βραχίονας μεταφέροντας το ενεργοποιημένο αμινοξύ στο (C) ενζυμικό κέντρο συμπύκνωσης όπου θα ενωθεί με την υπόλοιπη αλυσίδα. Η (PCP) μαζί με την (ACP) περιοχή των PKS, ανήκουν σε μία ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνικών μεταφορέων (Carrier Proteins) όμοιας δομής, αν και οι αλληλουχίες τους δε φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερες ομοιότητες.

Η ενζυμική περιοχή συμπύκνωσης (C) (~450 αμινοξέα) είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού καταλύοντας τη σύνδεση μίας νουκλεόφιλης αμινομάδας ενός ενζυμικού σύμπλοκου με την ακύλ-ομάδα του γειτονικού του (Stachelhaus και συνεργάτες, 1998, Bergendahl και συνεργάτες, 2002) επιδεικνύοντας μεγάλη επιλεκτικότητα για την επιλογή του σωστού νουκλεόφιλου.

Το τελευταίο ενζυμικό σύμπλοκο των NRPS περιέχει το ένζυμο θειοεστεράση (TE) (~250 αμινοξέα) που συμμετέχει στην αποδέσμευση του παραγόμενου πεπτιδίου. Η διαδικασία γίνεται σε 2 στάδια με τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου προϊόντος το οποίο ανάλογα με τη φύση του μορίου που θα αντιδράσει (νουκλεόφιλη ομάδα ή νερό), οδηγεί στην παραγωγή ενός μακροκυκλικού προϊόντος όπως η σουρφακτίνη (Tseng και συνεργάτες, 2002), ή ενός ευθύγραμμου πεπτιδίου όπως η πυοκελίνη (Patel και Walsh, 2001). Από τους δύο τρόπους αποδέσμευσης, ο σχηματισμός του μακροκυκλικού πεπτιδίου είναι ο συνηθέστερος γιατί αυτού του είδους η δομή είναι ανθεκτική σε πρωτεολυτική διάσπαση. Η ευρεία βιολογική δράση των μη ριβοσωμικών πεπτιδίων συνδέεται με το βαθμό διαφοροποίησης της θειοεστεράσης (TE) για να μπορεί να καταλύει πολλούς διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων αλλά και να πληροί τις προϋποθέσεις για τον ολιγομερισμό πεπτιδικών ομάδων. Ο υψηλός βαθμός εξειδίκευσης της (TE) συνδέεται και με το ποσοστό (10-15 %) ταυτοποίησης μεταξύ των διαφορετικών (TE) αλληλουχιών.

Εκτός από τις παραπάνω βασικές ενζυμικές περιοχές, επιπρόσθετα ένζυμα συμμετέχουν στη σύνθεση των μη ριβοσωμικών πεπτιδίων (Walsh και συνεργάτες, 2001). Κάποια από αυτά αποτελούν αναπόσπαστα τμήματα των NRPS και είναι *cis*-δραστικά, ενώ κάποια άλλα δρουν ως ανεξάρτητα ένζυμα με την *trans*-ενεργοποίηση του τελικού προϊόντος.

ii) Φυλογένεση των NRPS

Από φυλογενετικές μελέτες της περιοχής αδενυλίωσης (A) παρατηρήθηκε ότι η περιοχή αυτή παρουσιάζει μία υψηλά συντηρημένη αλληλουχία 10 αμινοξέων. Η αλληλουχία αυτή απαντάται ακόμα και σε ένζυμα αδενυλίωσης που δεν ανήκουν στις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες όπως η ακετύλ-CoA συνθάση και η λουσιφεράση (Stachelhaus και συνεργάτες, 1999, Gulick, 2009). Ανάμεσα στις A πρωτεϊνικές περιοχές των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθασών διακρίνονται 7 οικογένειες που συνθέτουν διαφορετικές κατηγορίες πεπτιδίων (Πίν. 1.1.).

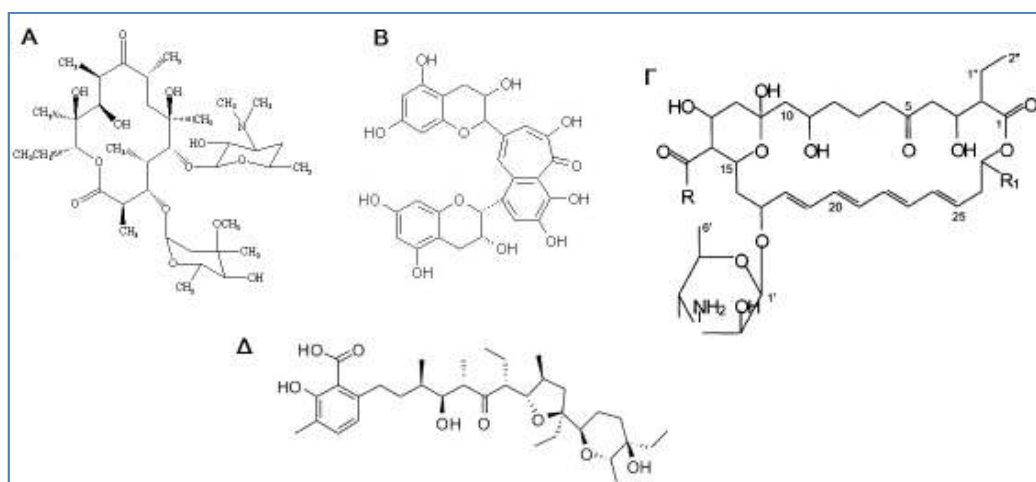
Πίνακας 1.1. Οι διαφορετικές οικογένειες των αδενυλικών περιοχών (A) και η αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων που συνθέτουν.

Πεπτίδια που συνθέτονται από τις διαφορετικές οικογένειες (A)	Στέλεχος από το οποίο αρχικά απομονώθηκαν οι αδενυλικές περιοχές (A)	Δράση παραγόμενων πεπτιδίων
κυκλικό λιποπεπτίδιο σουρφακτίνη (SrfA-C)	ενδοσπόρια στελεχών <i>Bacillus subtilis</i>	ισχυρή επιφανειοδραστική ουσία με αντιμικροβιακή και αιμολυτική δράση (Peyroux και συνεργάτες, 1999)
Μυξοβιρεσίνη (TA) μέρος υβριδικού σύμπλοκου NRPS/PKS	<i>Myxococcus Xanthus</i>	Αντιβιοτικό (Simunovic και συνεργάτες, 2003)
Σαφραμυκίνη (Sfm)	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Αντιβιοτικό (Li και συνεργάτες, 2008)
Ταλισομυκίνη (TLM) γλυκοπεπτίδιο	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Tao και συνεργάτες, 2007)
Σιδηροφόρα	<i>Halomonas halotolerans</i>	δέσμευση σιδήρου ιογενείς παράγοντες παθογόνων μικροοργανισμών (Barry και Challis, 2009)

Τουμπουλκίνη (TubE) υβριδικά ενζυμικά συστήματα NRPS/PKS	<i>Angiococcus disciformis</i>	ισχυρή αντικαρκινική δράση, διασπούν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (Sandmann και συνεργάτες, 2004)
Μυκοσουμπτιλίνη Λιποπεπτίδιο ενζυμικά σύμπλοκα NRPS/PKS/FAS	<i>Bacillus subtilis</i>	Αντιβιοτικό ισχυρή αντιμυκητιακή δράση (Duitman και συνεργάτες, 1999)

β) Πολυκετιδικές συνθετάσες [Polyketide Synthases (PKS)]

Όμοια με τις (NRPS), οι πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS) αποτελούν μεγάλα σύμπλοκα ενζύμων που καταλύουν τη σύνθεση των πολυκετιδίων τα οποία αντιπροσωπεύουν μία εξαιρετικά ανομοιογενή ομάδα φυσικών προϊόντων με δομικό σκελετό που μπορεί να αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους ενώσεων όπως πολυφαινόλες, μακρολίδες, πολυένια και πολυαιθέρες (Εικ. 1.6.). Θεωρούνται σημαντική πηγή ανίχνευσης νέων ουσιών με θεραπευτική δράση αφού ήδη πολλά πολυκετίδια χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά, ανοσοκατασταλτικά, αντιπαρασιτικά και αντικαρκινικά φάρμακα (Marinelli, 2009). Μονομερή παράγωγα οξικού και προπιονικού οξέως αποτελούν τη βάση για τη δημιουργία των εξαιρετικά πολύπλοκων δομών τους, οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν ή να ανασχεδιαστούν για την παραγωγή νέων φαρμάκων (Weissman και Leadlay, 2005, Wilkinson και Micklefield, 2007).



Εικόνα 1.6. Δομές διαφορετικών τύπων πολυκετιδίων: (Α) Μακρολίδα, (Β) Πολυφαινόλη, (Γ) Πολυένιο, (Δ) Πολυαιθέρας.

i) Μηχανισμός δημιουργίας αλυσίδας μονομερών από τις (PKS)

Ο μηχανισμός της βιοσύνθεσης των πολυκετιδίων παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνον των λιπαρών οξέων τόσο στις χημικές αντιδράσεις της επιμήκυνσης της αλυσίδας όσο και στη φύση των μονομερών που χρησιμοποιούνται (Smith και Tsai, 2007). Τα πολυκετίδια προκύπτουν από επαναλαμβανόμενες συμπυκνώσεις τύπου Claisen καρβοξύλ-θειοεστέρων που καταλύονται από τις πολυκετιδικές συνθετάσες και οδηγούν στον σχηματισμό γραμμικών αλυσίδων ποικίλου μεγέθους. Τα ενζυμικά σύμπλοκα είναι οργανωμένα σπονδυλωτά, σε στοιχεία δραστηριοτήτων (modules) καθένα από τα οποία συμμετέχει στην επιμήκυνση της αλυσίδας αναγνωρίζοντας, ενεργοποιώντας και ενσωματώνοντας καθορισμένα υποστρώματα. Τα στοιχεία δραστηριοτήτων αποτελούνται από διαφορετικούς τομείς – πρωτεϊνικές περιοχές (domains), καθεμία από τις οποίες έχει συγκεκριμένη λειτουργία. Η μεγάλη ποικιλία στη δομή των πολυκετιδίων οφείλεται στην ιδιότητα των εξειδικευμένων αυτών περιοχών να μεταθέτονται και ν' ανασυνδυάζονται μεταξύ τους. Σε κάθε επιμέρους ενζυμική ενότητα μίας πολυκετιδικής συνθάσης, γίνεται η επιλογή του κατάλληλου, ενεργοποιημένου ακυλο-CoA μονομερούς (συνήθως μαλονύλ- ή μεθυλμαλονύλ-CoA) από μία ακυλο-τρανσφεράση (AT). Στη συνέχεια μία πρωτεΐνη-μεταφορέας (ACP) μεταφέρει το ενεργοποιημένο μονομερές στο ενζυμικό κέντρο μίας β-κετοακυλσυνθάσης (KS) όπου αποκαρβοξυλιώνεται ώστε να ενωθεί μέσω συμπύκνωσης με την προϋπάρχουσα αλυσίδα. Όταν το στάδιο της επιμήκυνσης ολοκληρωθεί, το παραγόμενο προϊόν μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω τροποποιήσεις αναγωγών και αφυδάτωσης από μία κετο-αναγωγή (KR), αφυδρατάση (DH) και ενοϋλ-αναγωγή (ER) ώστε να μετατραπεί σε ένα πλήρως κορεσμένο σκελετό ακυλίου. Αντίθετα με τα λιπαρά οξέα, κατά τον σχηματισμό πολυκετιδίων τα παραπάνω βήματα αναγωγών και αφυδάτωσης δεν ολοκληρώνονται πάντα ή μπορεί να παραλειφθούν πριν να ξεκινήσει ο επόμενος κύκλος επιμήκυνσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικίλων και πολύπλοκων λειτουργικών μοτίβων. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων συμπύκνωσης/αναγωγής, το παραγόμενο προϊόν μπορεί να υποστεί επιπρόσθετες μετατροπές από μία θειοεστεράση (TE) που αποδεσμεύει το γραμμικό προϊόν με υδρόλυση ή κυκλοποίηση τροποποιώντας το σε κυκλική μακρολακτόνη (Salomon και συνεργάτες, 2003).

Σύμφωνα με την αρχιτεκτονική της δομής τους και τον τρόπο δράσης τους, οι πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS) ταξινομούνται σε 3 διαφορετικές κατηγορίες

(Hopwood, 1997). Οι PKS τύπου I είναι μεγάλα πολυλειτουργικά ένζυμα που εμπεριέχουν ομοιοπολικά συγχωνευμένα και γραμμικά διατεταγμένα καταλυτικά κέντρα, σε αντίθεση με τον τύπο II που περιλαμβάνει μονολειτουργικά ένζυμα, των οποίων τα επιμέρους τμήματα είναι διαχωρισμένα. Η τρίτη κατηγορία των PKS αφορά σε πολυλειτουργικά ένζυμα παρόμοια με συνθάσες χαλκόνης τα οποία απαντώνται κυρίως στα φυτά (Yu και συνεργάτες, 2012).

Ανάλογα με το αν κάθε β-κετοακυλσυνθάση (KS) καταλύει έναν ή περισσότερους κύκλους επιμήκυνσης τα ενζυμικά σύμπλοκα μπορούν να διαχωριστούν σε επαναλαμβανόμενα και μη. Οι επαναλαμβανόμενες PKS τύπου I, όπως η συνθάση του υπολιπιδαιμικού παράγοντα λοβαστατίνη (Campbell και Vederas, 2010), απαντώνται κυρίως σε μύκητες, ενώ στα βακτήρια έχουν σπάνια παρατηρηθεί και εμπλέκονται στον σχηματισμό μικρών αρωματικών ενώσεων ή πολυενίων. Οι επαναλαμβανόμενες PKS τύπου II ανιχνεύονται συνηθέστερα σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως σε ακτινομύκητες αν και σε πρόσφατες μελέτες ανιχνεύθηκαν και σε αρνητικά κατά Gram στελέχη του είδους *Stigmatella aurantiaca* και *Photorhabdus luminescens* (Sandmann και συνεργάτες, 2007, Brachmann και συνεργάτες, 2007, Hertweck, 2009).

Οι μη επαναλαμβανόμενες PKS όπως η συνθάση του αντιβιοτικού ερυθρομυκίνη, συγκαταλέγονται στον τύπο I και απαντώνται κυρίως στα βακτήρια (Rawlings, 2001) -αν και έχουν ανιχνευθεί και σε δινομαστιγωτά πρωτόζωα (Monroe και συνεργάτες, 2008). Χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας είναι ότι το σύνολο των απαραίτητων ενζυμικών περιοχών (KS), (AT) και (ACP) καθώς και των προαιρετικών για την επεξεργασία του β-κετο παράγωγου, αποτελούν μία ενότητα, η οποία καταλύει την επιμήκυνση ενός μόνο κύκλου. Έτσι, ο βαθμός επεξεργασίας του β-κετο παράγωγου καθορίζεται από τον αριθμό των επιμέρους συμπλόκων και την παρουσία των προαιρετικών πρωτεϊνικών περιοχών (KR), (DH) και (ER) (Fischbach και Walsh, 2006). Η παραπάνω αντιστοιχία ένα προς ένα των επιμέρους αυτών συμπλόκων, η οποία υπόκειται στην αρχή της συγγραμμικότητας, χρησιμεύει στον στοχευόμενο προγραμματισμό της βιοσύνθεσης του πολυκετιδίου μέσω γενετικών χειρισμών (Cane και συνεργάτες, 1998) και επιτρέπει την πρόβλεψη της δομής του μεταβολίτη με βάση τη δομή του ενζύμου ή και το αντίστροφο. Έχουν παρατηρηθεί εξαιρέσεις στην οργάνωση αυτού του τύπου όταν ένα ή περισσότερα ενζυμικά σύμπλοκα χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία φορές, παραλείπονται ή παρουσιάζουν

δομικά χαρακτηριστικά που δεν ταιριάζουν με την προκύπτουσα δομή του μεταβολίτη. Η τελευταία περίπτωση χαρακτηρίζει μία διαφορετική κατηγορία από τον σύνηθε τύπο *cis*-AT PKS, αυτή των *trans*-AT PKS στις οποίες οι ενζυμικές περιοχές (AT) λειτουργούν αυτόνομα και δεν αποτελούν μέρος των συμπλόκων (Cheng και συνεργάτες, 2003). Τα συστήματα *trans*-AT είναι τα λιγότερο μελετημένα και περιέχουν ασυνήθιστα ενζυμικά πρότυπα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανακάλυψη ενώσεων με μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως το αντιβιοτικό μουπιροκίνη (El-Sayed και συνεργάτες, 2003) και το αντικαρκινικό φάρμακο βρυοστατίνη A (Hildebrand και συνεργάτες, 2004).

iii) Πολυκετιδικές συνθάσες με ακύλ-τρανσφεράσες τύπου *trans* [*trans*- acyltransferase polyketide synthases (*trans*-AT PKS)]

Ο διαχωρισμός των PKS τύπου I σε *cis* και *trans* δεν εξαρτάται μόνο από διαφορές στη δομή αλλά και από την εξελικτική τους πορεία. Τα συστήματα *cis* προέρχονται κυρίως από τον διπλασιασμό των υπεύθυνων γονιδίων για τη σύνθεση των επιμέρους ενζυμικών συμπλόκων (κατακόρυφη μεταφορά γονιδίων) και κατόπιν τη διαφοροποίηση στη σύσταση και τον αριθμό των τομέων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα παραπάνω σύμπλοκα (Jenke-Kodama και συνεργάτες, 2006). Αντίθετα, τα υπεύθυνα γονίδια για τη σύνθεση των συστημάτων *trans* προέρχονται από την ένωση πολλαπλών τμημάτων γονιδίων μέσω του μηχανισμού της οριζόντιας μεταφοράς (HGT) που παρατηρείται στα βακτήρια (Nguyen και συνεργάτες, 2008). Οι αυτόνομες πρωτεΐνες (AT) των συστημάτων *trans*, παρουσιάζουν πολύ μικρή εξελικτική απόκλιση μεταξύ τους και βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από (AT) διαφορετικής προέλευσης όπως φαίνεται από τη φυλογενετική ανάλυση πολλών διαφορετικών περιοχών (AT) (Εικ. 1.7.). Οι *trans*-AT είναι εξειδικευμένες να καταλύουν τη συμπύκνωση μονομερών μόνο τύπου μαλονύλ-CoA, αντίθετα με τις ενσωματωμένες στα ενζυμικά σύμπλοκα *cis*-AT που παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξελικτική πορεία κι έχουν την ικανότητα να καταλύουν περισσότερους τύπους μονομερών (Ridley και συνεργάτες, 2008).

Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των πρωτεϊνικών περιοχών που περιέχει η κάθε ενότητα (παρουσία διαφορετικού αριθμού προαιρετικών περιοχών και σειρά με την οποία εκτελούν την κατάλυση), δημιουργούν μεγάλη ποικιλία και στον τύπο των ενοτήτων που προκύπτουν. Συγκεκριμένα, στα συστήματα *cis*-AT έχουν παρατηρηθεί μόνο 8

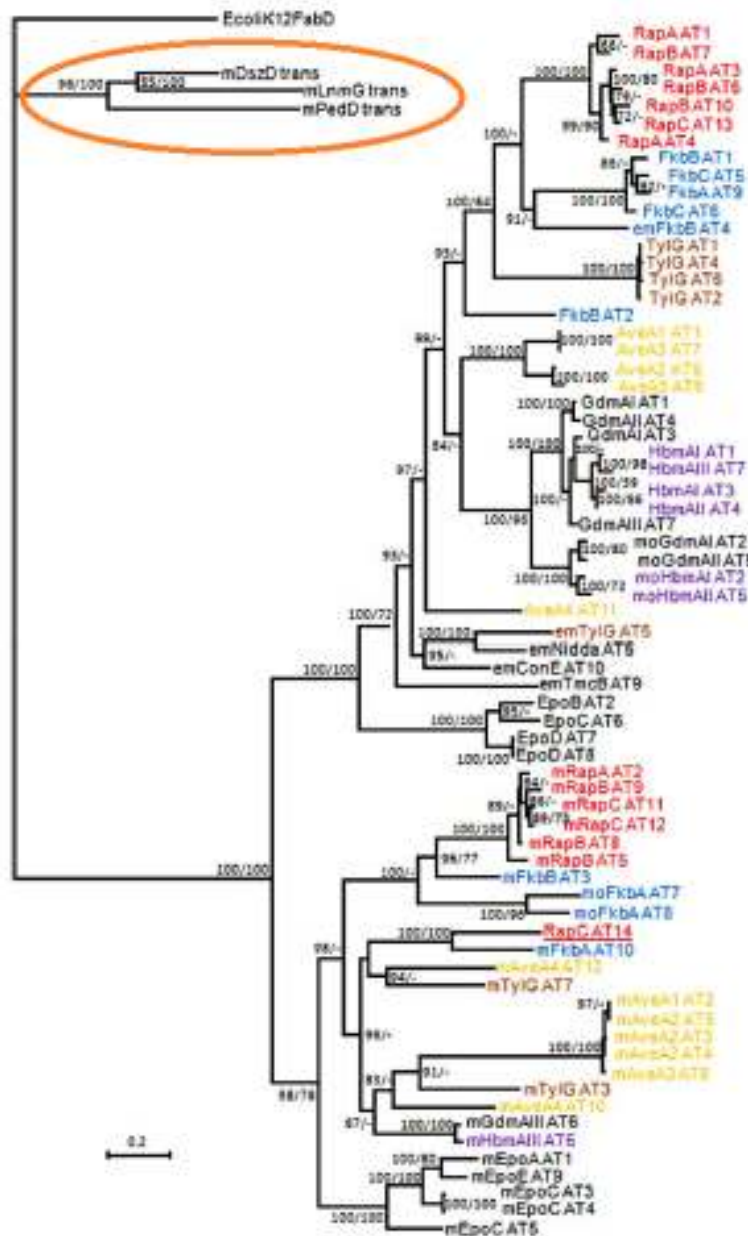
διαφορετικοί συνδυασμοί πρωτεϊνικές περιοχές για κάθε ενότητα, ενώ για τα *trans*, αναφέρονται περισσότερα από 50 διαφορετικά μοτίβα. Η μεγάλη ποικιλία των *trans*-AT οφείλεται στην ασυνήθιστη διάταξη και την παρουσία νέων ή επαναλαμβανόμενων πρωτεϊνικών περιοχών, τη διάσπαση των ενοτήτων καθώς και τη μη αντιστοιχία των δομών των ενοτήτων αυτών με την τελική δομή του παραγόμενου πολυκετιδίου λόγω της έλλειψης ή της παρουσίας περιττών φαινομενικά καταλυτικών κέντρων (Piel, 2010).

Οι *trans*-AT PKSs έχουν ανιχνευθεί σε βακτήρια με ιδιαίτερο μεταβολισμό όπως παθογόνα ή αναερόβια στελέχη καθώς και βακτήρια που έχουν απομονωθεί από ασυνήθιστους οικολογικούς θώκους όπως συμβιωτικά βακτήρια σε ασπόνδυλα ή φύκη (Nguyen και συνεργάτες, 2008, Moldenhauer και συνεργάτες, 2010). Σύμφωνα με την ανάλυση γονιδιωμάτων, προερχόμενων από αναερόβια, μη παθογόνα στελέχη του γένους *Clostridium* που περιείχαν γονίδια για τη σύνθεση *trans*-AT PKS συνθάσων, φαίνεται πως η εξέλιξη σε επίπεδο είδους του γένους *Clostridium* δε σχετίζεται με την παρουσία των συστημάτων *trans* PKS.

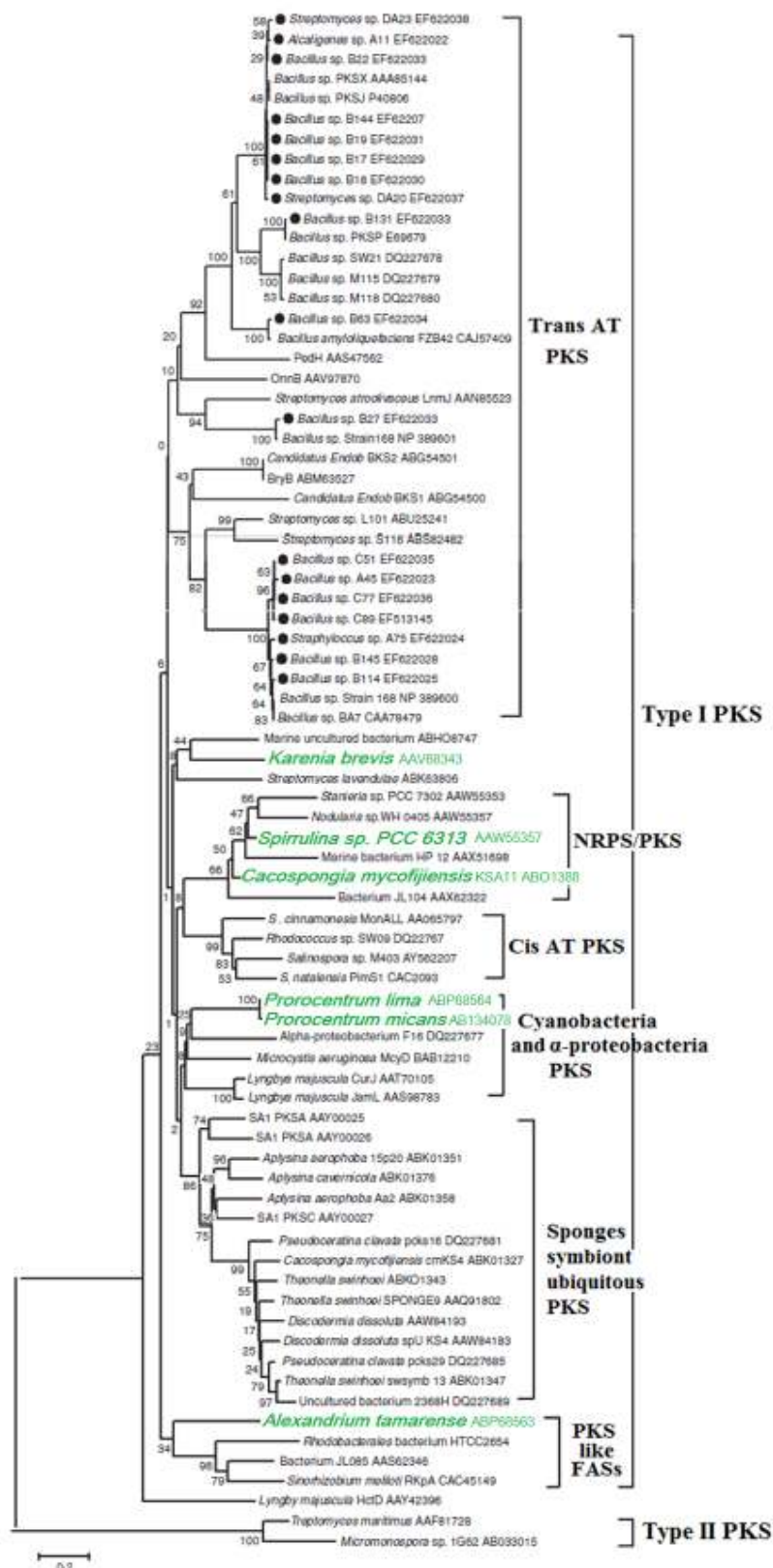
Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι πλευρικά από τα γονίδια των (PKS), βρίσκονταν αλληλουχίες παρεμβολής καθώς και γονίδια μεταθετάσης και ιντεγκράσης (Behnken και Hertweck, 2012). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να συσχετιστεί με την υπόθεση ότι τα γονίδια των *trans*-AT PKS προέρχονται από διαφορετικές πηγές που συναρμολογήθηκαν δημιουργώντας ένα ενιαίο σύνολο μέσα από εκτεταμένο ανασυνδυασμό και πολλαπλά γεγονότα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Nguyen και συνεργάτες, 2008).

iv) Φυλογένεση των βακτηριακών (PKS)

Στις βακτηριακές μη επαναλαμβανόμενες πολυκετιδικές συνθετάσες τύπου I οι πρωτεΐνες (KS) παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους. Η δομή τους μπορεί να αποτελείται από διαφορετικό αριθμό ενοτήτων, που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των πολυκετιδικών σκελετών από ενεργοποιημένα μονομερή ακυλ- και μαλονυλ-CoA. Οι κετοακυλ-συνθάσες (KS), που ευθύνονται για τη συμπύκνωση της ομάδας επέκτασης με την αναπτυσσόμενη πολυκετιδική αλυσίδα, εντοπίζονται σε όλα τα επιμέρους ενζυμικά σύμπλοκα των PKS και γι' αυτό είναι οι πιο συντηρημένες σε σχέση με τις υπόλοιπες ενζυμικές περιοχές (Moffitt και Neilan,



Εικόνα 1.7. Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων των ενζυμικών περιοχών (AT) πολυκετιδίων με αντιβιοτική δράση, με τη μέθοδο της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony, MP) (Ridley και συνεργάτες, 2008). Η αξιολόγηση της αξιοπιστίας της ανάλυσης έγινε συνδυαστικά με τη χρήση των μεθόδων της ανάλυσης κατά Bayes (Bayesian) / των τιμών bootstrap. Το μονομερές ακυλο-CoA για καθεμία αλληλουχία, αναφέρεται μπροστά από τον κωδικό (m=μαλονύλ, em=αιθυλμαλονύλ, mo=μεθοξυμαλονύλ και χωρίς κωδικό=μεθυλμαλονύλ). Με κύκλο επισημαίνονται οι απομακρυσμένες αλληλουχίες *trans*-AT σε σχέση με τις υπόλοιπες *cis*. Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση, οι *cis*-AT με μονομερή μεθυλμαλονύλ- (me) ομαδοποιούνται ξεχωριστά από εκείνες με μονομερή μαλονύλ- (m). Το διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετικά πολυκετίδια και συγκεκριμένα: ραπαμυκίνη (κόκκινο), τυλοσίνη (καφέ), ασκομυκίνη (μπλε), χερμπιμυκίνη (μωβ), αβερμεκτίνη (κίτρινο). Με μαύρο χρώμα αναγράφονται τα αντιβιοτικά: γελδαναμυκίνη, νатаμυκίνη, καναμυκίνη, εποθιλόνη, ταυτομυκετίνη, πεδερίνη, δισοραζόλη και λειναμυκίνη.



Εικ. 1.8. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο της Γειτνίασης (Neighbor Joining) αλληλουχιών αμινοξέων της περιοχής (KS). Οι υπό εξέταση αλληλουχίες (μαύρη τελεία μπροστά από τον κωδικό) ομαδοποιήθηκαν μαζί με τις αλληλουχίες αναφοράς των δομών *trans*-AT (Zhang και συνεργάτες, 2008). Με πράσινο χρώμα αναγράφονται οι αλληλουχίες που προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς (φύκη και σπόγγο).

2003, Ginolhac και συνεργάτες, 2004, Kim και Fuerst, 2006, Fieseler και συνεργάτες, 2007).

Γι' αυτόν τον λόγο, οι (KS) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της ποικιλότητας των γονιδίων (PKS), τα οποία παρουσιάζουν ανομοιογενή κατανομή στα βακτήρια καθώς ανιχνεύονται μόνο σε ορισμένα γένη και μεμονωμένα στελέχη. Με τη βοήθεια φυλογενετικών αναλύσεων οι (KS) μπορούν να καταταχθούν σε ξεχωριστές ομάδες ανάλογα με τη φύση των παραγόμενων μεταβολιτών (Jenke-Kodama και συνεργάτες, 2006) ή με τη δομή τους (Zhang και συνεργάτες, 2008) (Εικ. 1.8.). Χαρακτηριστικά παραδείγματα διαφοροποιημένης δομής των (KS) παρουσιάζουν οι κετοσυνθάσες των συστημάτων *trans*-AT PKS (Piel και συνεργάτες, 2004) και οι (KS) των υβριδικών συστημάτων PKS/NRPS που είναι κατάλληλα διαμορφωμένες ώστε να συνδέονται με το πεπτιδικό υπόστρωμα των NRPS (Shen και συνεργάτες, 2001).

γ) Συνθετάσες λιπαρών οξέων [Fatty Acid Synthases (FAS)]

Η σύνθεση λιπαρών οξέων που ενσωματώνονται στη φωσφολιπιδική μεμβράνη των βακτηρίων περιλαμβάνει με 3 διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Ο συνηθέστερος μηχανισμός της σύνθεσής τους πραγματοποιείται από μεμονωμένα ένζυμα, τις συνθετάσες λιπαρών οξέων (FAS II), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *fab* και οδηγεί στον σχηματισμό συγκεκριμένων προϊόντων (Magnuson και συνεργάτες, 1993). Εναλλακτικά, η σύνθεση των λιπαρών οξέων από τις συνθετάσες FAS τύπου I, χαρακτηριστική των ευκαρυωτικών κυττάρων (Schweizer και Hofmann, 2004), στα βακτήρια απαντάται συνήθως στην κατηγορία *Corynebacterineae* της τάξης των *Actinomycetales*. Οι FAS I αποτελούν μεγάλα πολυλειτουργικά σύμπλοκα τα οποία καταλύουν την επιμήκυνση της αλυσίδας από μονομερή ακυλ-CoA, για την παραγωγή των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Ο τρίτος μηχανισμός σύνθεσης πραγματοποιείται σε συνδυασμό με εκείνον των FAS II και ανιχνεύθηκε σε στελέχη της τάξης των γ - πρωτεοβακτηρίων (Nichols, 2003). Πρόκειται για ένα υβριδικό ενζυμικό σύμπλοκο επαναλαμβανόμενης δομής FAS/PKS το οποίο ευθύνεται για την παραγωγή ω -3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) όπως το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξαενικό οξύ (DHA). Τα υπεύθυνα γονίδια για την παραγωγή τους, *rfaA-E*, συνθέτουν ένζυμα με πολλαπλές ενζυμικές περιοχές που μπορούν να ανασυνδυάζονται μεταξύ τους οδηγώντας στην παραγωγή μεγάλης

ποικιλίας, μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων (Tanaka και συνεργάτες, 1999). Η λειτουργία των FAS τύπου I /PKS είναι ανάλογη με εκείνη που παρατηρείται στις PKS και περιλαμβάνει τη συμπύκνωση του μονομερούς στην προϋπάρχουσα αλυσίδα από την κετοακυλ-συνθάση (KS), την αναγωγή της καρβονυλικής ομάδας σε υδροξυλική από την κετοακυλ- αναγωγή (KR), την αφυδρογόνωση του ενδιάμεσου προϊόντος από την αφυδρογονάση/ισομεράση (DH/I) και την αναγωγή του διπλού δεσμού στο τελικό στάδιο επιμήκυνσης της αλυσίδας από την ενοϋλ- αναγωγή (ER) (Metz και συνεργάτες, 2001).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, η σύνθεση νέων πολυαμινικών μεταβολιτών με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (ζεαμίνες) ενάντια σε παθογόνα πολυανθεκτικά βακτήρια, από στέλεχος του είδους *Serratia plymouthis*, προέρχεται από τη συνένωση υβριδικών ενζυμικών συμπλόκων NRPS/PKS και FAS/PKS. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της βιοσύνθεσης λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών για την παραγωγή βιοενεργών ουσιών, παρατηρείται για πρώτη φορά και φαίνεται να οδηγεί στον σχηματισμό πρώιμων μορίων, τα οποία αποκτούν την αντιμικροβιακή τους δράση με την απομάκρυνση του πεπτιδικού τμήματος (Masschelein και συνεργάτες, 2013).

1.6. Μέθοδοι ανάκτησης και μελέτης μικροοργανισμών από υδροθερμικά πεδία

Η απομόνωση και καλλιέργεια μικροοργανισμών από υδροθερμικά οικοσυστήματα σε μεγάλα βάθη προϋποθέτει την αντιμετώπιση των τεχνικών δυσκολιών για την ανάκτηση των δειγμάτων και κατόπιν την προσπάθεια απομόνωσης των μικροοργανισμών σε συνθήκες εργαστηρίου που διαφέρουν από τις ακραίες υδροθερμικές συνθήκες *in situ*.

1.6.1. Ανάκτηση μικροοργανισμών από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας

Η συλλογή δειγμάτων από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας επανδρωμένα ή τηλεκατευθυνόμενα υποβρύχια οχήματα (Human Occupied Vehicles, HOVs ή Remote Operated Vehicles, ROVs). Αν κι η δειγματοληψία με τα οχήματα αυτά έχει εξαιρετικά υψηλό κόστος, η χρήση τους επιτρέπει την παρατήρηση μοναδικών οικοσυστημάτων χωρίς να προκαλούνται

σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Οι συσκευές για τη δειγματοληψία και τη μεταφορά των δειγμάτων στην επιφάνεια, περιλαμβάνουν πυρηνολήπτες βαρύτητας για τη συλλογή ιζήματος κι αντλίες αναρρόφησης, ή δοχεία με συρόμενο κάλυμμα για τη μεταφορά πετρωμάτων. Η ανάκτηση των μικροοργανισμών επηρεάζεται από πολυάριθμους παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η πίεση γι' αυτό και κατά τη μεταφορά δειγμάτων στην επιφάνεια από μεγάλα βάθη (>2000 m), ορισμένοι δειγματολήπτες έχουν ισόβαρα κι ισοθερμικά τοιχώματα διατηρώντας αμετάβλητες τις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας από το σημείο δειγματοληψίας, προκειμένου έτσι ν' αυξηθεί η πιθανότητα απομόνωσης βαρόφιλων μικροοργανισμών. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλοί αυτόχθονες μικροοργανισμοί της βαθιάς θάλασσας είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στην υπεριώδη ακτινοβολία, γι' αυτό και η μεταφορά των δειγμάτων γίνεται διατηρώντας τα στο σκοτάδι.

Κατά τη μεταφορά τους στο πλοίο, τα δείγματα απομακρύνονται από το δοχείο μεταφοράς, τα πετρώματα διαιρούνται χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα σμίλη και λαβίδα και στη συνέχεια η εξωτερική τους επιφάνεια τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και διατηρούνται στους 4 °C έως τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

1.6.2. Κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι απομόνωσης και καλλιέργειας μικροοργανισμών προερχόμενων από υδροθερμικά πεδία

Οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση προκαρυωτικών μικροοργανισμών βασίζονται στη μέθοδο της καλλιέργειας σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και σε διαφορετικές συνθήκες επώασης. Από τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, οι μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί σε καθαρή καλλιέργεια, τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, είναι μεσόφιλα, θερμόφιλα και υπερθερμόφιλα βακτήρια και αρχαία (Miroshnichenko και συνεργάτες, 2002 και 2003, Takai και συνεργάτες, 2002, Sako και συνεργάτες, 2003, Nakagawa και συνεργάτες, 2004, Reysenbach και συνεργάτες, 2006).

Σε κάποια από τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται γίνεται προσπάθεια προσομοίωσης των φυσικοχημικών συνθηκών που επικρατούν στα υδροθερμικά οικοσυστήματα, όπως στην περίπτωση της απομόνωσης του ε-πρωτεοβακτηρίου *Lebetimonas acidiphila* σε θρεπτικό με πολύ χαμηλή τιμή pH (pH

5.2) (Takai και συνεργάτες, 2005). Για την απομόνωση των αναερόβιων θερμοφίλων μικροοργανισμών γίνονται καλλιέργειες εμπλουτισμού σε σωλήνες τύπου Hungate όγκου 15-30 ml ή σε γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 100-250 ml, τα οποία σφραγίζονται με ειδικά λαστιχένια πώματα που εμποδίζουν την κυκλοφορία αέρα, σύμφωνα με τη μέθοδο των Balch και Wolfe (1976).

Μεσόφιλοι και θερμοφιλοι μικροοργανισμοί μεγαλώνουν σε θρεπτικά που περιέχουν αυξημένη ποσότητα NaCl και χρησιμοποιούν σα βάση συνθετικό θαλασσίνο νερό το οποίο περιέχει διάλυμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η επιλογή των δοτών και αποδεκτών ηλεκτρονίων και η πηγή αζώτου και άνθρακα που προστίθενται στο διάλυμα του παραπάνω συνθετικού θαλασσινού νερού, οδηγούν στον εμπλουτισμό μικροοργανισμών συγκεκριμένης φυσιολογίας (Nakagawa και Takai, 2006).

Η προσπάθεια προσομοίωσης των ακραίων συνθηκών που επικρατούν στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας είχε σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά το ποσοστό των ακραιόφιλων απομονωθέντων μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια (Alain και Querellou, 2009). Ωστόσο, η εφαρμογή μοριακών μεθόδων εκτίμησης της μικροβιακής ποικιλότητας στα συγκεκριμένα οικοσυστήματα, ανέδειξε ένα πολύ μεγάλο φάσμα μικροβιακών πληθυσμών που παραμένουν ακαλλιέργητοι (Takai και Fujiwara, 2002). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την έλλειψη εξειδίκευσης για την ανάκτηση των ακραιόφιλων μικροοργανισμών, τον περιορισμένο αριθμό εκλεκτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας για ορισμένες ομάδες και κυρίως τη δυσκολία αναπαραγωγής των ακραίων αυτών συνθηκών στο εργαστήριο (Jørgensen και Boetius, 2007).

1.6.3. Φαινοτυπικές μέθοδοι διάκρισης στελεχών μεταξύ τους

Οι φαινοτυπικές τεχνικές διάκρισης μεταξύ των βακτηριακών στελεχών βασίζονται στα ξεχωριστά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού ή των χημικών συστατικών τους. Η χρήση των τεχνικών αυτών μπορεί να αποφέρει άμεσα λειτουργικές πληροφορίες για την επιβίωση, την αύξηση αλλά και την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι περιλαμβάνουν ακόμα, την αύξηση σε διαφορετικές πηγές άνθρακα, την ανάλυση της ενζυμικής δραστηριότητας, την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων καθώς και τη μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας. Η διερεύνηση της μορφολογίας ενός μικροοργανισμού με οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρέχει

πληροφορίες για το σχήμα του κυττάρου, τη δομή των μαστιγίων και την παρουσία αδιάλυτων κλασμάτων, ενώ μακροσκοπικά, σε τριβλίο Petri, μπορούν να παρατηρηθούν το χρώμα, οι διαστάσεις και το σχήμα των αποικιών. Συμπληρωματικά καταγράφονται οι συνθήκες επώασης όπως θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση αλάτων και η μικροβιακή ανάπτυξη παρουσία/απουσία O₂ (Donelli και συνεργάτες, 2013).

Η φυσιολογία των βακτηριακών στελεχών μελετάται με τη χρήση μαθηματικών προτύπων, τα περισσότερα από τα οποία βασίζονται στο πρότυπο του Monod (Monod, 1949, Bull, 2010). Το μοντέλο αυτό μέσω μίας εξίσωσης υπερβολής εκφράζει τη σχέση μεταξύ του ρυθμού αύξησης ενός μικροοργανισμού σε κλειστή καλλιέργεια και τη συγκέντρωση των συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος. Αν και η εξίσωση υπερβολής που προκύπτει είναι φαινομενικά απλή, κατορθώνει να εκφράσει την πολύπλοκη ρυθμιστική φυσιολογία των βακτηριακών στελεχών. Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο κατά τη φάση της εκθετικής αύξησης, εξασφαλίζεται ο διπλασιασμός κάθε συστατικού του κυττάρου ακριβώς με τον ίδιο ρυθμό. Το εκθετικό στάδιο ανάπτυξης, όπως αποκαλύφθηκε, έχει αξιοσημείωτες συνέπειες αφού η μάζα των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών καθώς και ολόκληρου του κυττάρου είναι συνάρτηση μόνο του ρυθμού διπλασιασμού και δεν εξαρτάται από την αναλυτική σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης (Scott και Hwa, 2011). Σε προηγούμενη μελέτη συγκρίθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης υπερθερμόφιλων αρχαίων μικροοργανισμών του γένους *Methanocaldococcus* που απομονώθηκαν από δύο διαφορετικά υδροθερμικά πεδία σε μεγάλο βάθος προκειμένου να ερευνηθούν οι οριακές συγκεντρώσεις ανάπτυξης των παραπάνω στελεχών σε συνάρτηση με τις διαφορετικές συνθήκες που χαρακτηρίζουν τα δύο οικοσυστήματα (Ver Eeche και συνεργάτες, 2012).

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις τεχνικές που βασίζονται στον φαινότυπο χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση κυρίως σε επίπεδο είδους, γένους ή οικογένειας ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλή διακριτική ικανότητα σε επίπεδο στελεχούς και γι' αυτό συνδυάζονται με τις γονοτυπικές μεθόδους (Emerson και συνεργάτες, 2008).

1.6.4. Μοριακές μέθοδοι διάκρισης των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών μεταξύ τους

Η διάκριση μεταξύ βακτηριακών στελεχών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μοριακών μεθόδων οι οποίες διακρίνονται σε τεχνικές βασισμένες στην αλληλούχιση και σε μεθόδους που αφορούν στον σχηματισμό αποτυπωμάτων (προτύπων) DNA. Σε αντίθεση με τις φαινοτυπικές, οι γονοτυπικές μέθοδοι δεν εξαρτώνται από τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών και τις συνθήκες καλλιέργειας.

1.6.4.1. Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στη δημιουργία αποτυπωμάτων DNA

Οι τεχνικές που αφορούν στη δημιουργία προτύπων από διαχωρισμένα ανά μέγεθος θραύσματα βακτηριακού DNA, βασίζονται σε πολυμορφισμούς που προκύπτουν από πολλούς και διαφορετικούς εξελικτικούς μηχανισμούς. Τα πρότυπα αυτά είναι μοναδικά για τον κάθε μικροοργανισμό και κατά συνέπεια, πανομοιότυπα πρότυπα υποδηλώνουν πως τα βακτήρια από τα οποία προέρχονται έχουν υψηλό βαθμό συγγένειας κυρίως σε επίπεδο είδους ή στελέχους (Emerson και συνεργάτες, 2008).

i) Ενίσχυση τμημάτων DNA που βρίσκονται ανάμεσα σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες [Repetitive element (rep-PCR)]

Η μέθοδος (rep)-PCR βασίζεται στην ενίσχυση τμημάτων DNA, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία διαχωρίζουν διάσπαρτες κι επαναλαμβανόμενες, μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες των προκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Οι παραπάνω αλληλουχίες έχουν μήκος έως και αρκετές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων (bp), ενώ ορισμένες από αυτές όπως οι επαναλαμβανόμενες παλίνδρομες εξωγονιδιακές αλληλουχίες REP, οι εντεροβακτηριακές επαναλαμβανόμενες διαγενετικές αλληλουχίες ERIC και οι αλληλουχίες BOX είναι υψηλά συντηρημένες κι απαντώνται ευρέως σε πολλά διαφορετικά βακτηριακά γένη. Η ενίσχυση των στοιχείων rep-PCR με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παράγει πρότυπα από ξεκάθαρα διαχωρισμένες ζώνες όπως αυτές αποτυπώνονται με

ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πρότυπα αυτά είναι μοναδικά για κάθε βακτηριακό στέλεχος με αποτέλεσμα αυτή η μέθοδος να καθιστά δυνατή τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών γονιδιωμάτων (Louws και συνεργάτες, 1998).

Οι REP και ERIC αλληλουχίες (38 και 162 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα) χαρακτηρίζονται από την ικανότητα σχηματισμού σταθερών δομικών βρόγχων μεταγραφμένου RNA. Αν και δεν είναι γνωστή η λειτουργία αυτών των υψηλά συντηρημένων αλληλουχιών που βρίσκονται διάσπαρτες στο εσωτερικό μη μεταφράσιμων περιοχών των βακτηριακών οπερονίων, έχει υποτεθεί πως ρυθμίζουν τη λήξη της μεταγραφής, τη σταθερότητα του mRNA και τη χρωμοσωμική οργάνωση υπό *in vivo* συνθήκες (Versalovic και συνεργάτες, 1991).

Αντίθετα με τις REP και ERIC, οι αλληλουχίες BOX δεν είναι τυχαία διασπαρμένες στο βακτηριακό γονιδίωμα αλλά εστιάζονται πολύ κοντά σε γονίδια, ενώ οι σταθερές δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν, σε ορισμένες περιπτώσεις μεταφράζονται. Ενδέχεται να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης δεκτικότητας/μολυσματικότητας του βακτηριακού κυττάρου και περιλαμβάνουν τρία υποείδη: box-A (57 bp), box-B (43 bp) και box-C (50 bp). Από αυτές τις 3 υποκατηγορίες, η box-A είναι η περισσότερο συντηρημένη αφού απαντήθηκε στα περισσότερα βακτηριακά γονιδιώματα και χρησιμοποιείται ευρέως σε ταξινομικές μελέτες που σχετίζονται με περιβαλλοντικά, κλινικά κ.ά. δείγματα (Van Belkum και συνεργάτες, 1998). Η χρήση σημασμένων με φθορίζοντα μόρια εκκινητών επιτρέπει την υψηλή ποιότητα ανάλυσης των ζωνών που παράγονται με αυτή τη μέθοδο και άρα την καλύτερη διάκριση των στελεχών μεταξύ τους (Brusetti και συνεργάτες, 2008).

Οι μέθοδοι REP- και BOX-PCR έχουν εφαρμοστεί σε μελέτες διάκρισης μεταξύ απομονωθέντων στελεχών από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, αλκαλικές λίμνες και ίζημα από την Ανταρκτική. Συγκεκριμένα, η μέθοδος rep-PCR χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη για τη διάκριση συμβιωτικών βακτηρίων σε πολύχαιτους που συλλέχθηκαν από 2 διαφορετικά υδροθερμικά πεδία. Τα βακτήρια αυτά είχαν ταξινομηθεί σε 2 μόνο ομάδες, εμφανίζοντας πολύ μικρό διαφοροποίησης μεταξύ τους με βάση την αλληλουχία του γονιδίου τους 16S rDNA. Η διάκριση των στελεχών της καθεμίας από τις 2 παραπάνω ομάδες με τη μέθοδο rep-PCR οδήγησε στην ανίχνευση μεγάλου ποσοστού ποικιλότητας σε επίπεδο στελέχους σε καθένα από τα 2 διαφορετικά οικοσυστήματα (Di Meo και συνεργάτες, 2000).

Η μέθοδος BOX-PCR χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση μεταξύ χημιολιθοαυτότροφων θειο-οξειδωτικών στελεχών του γένους *Thioalkalivibrio* που απομονώθηκαν από αλκαλικές λίμνες στην Ασία και την Αφρική, με στόχο τη συσχέτιση των γονότυπων που προέκυψαν και της διαφορετικής γεωγραφικής τους κατανομής (Foti και συνεργάτες, 2006). Σε άλλη μελέτη, τα απομονωθέντα στελέχη από δείγματα ιζήματος στην Ανταρκτική, αφού αρχικά διαχωρίστηκαν σε ομάδες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχούσε σε ένα διαφορετικό είδος, με τη μέθοδο ARDRA, στη συνέχεια τα στελέχη της κάθε ομάδας διακρίθηκαν μεταξύ τους με τη μέθοδο BOX-PCR για να μελετηθεί η ποικιλιότητα σε επίπεδο στελέχους, ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα (Antibus και συνεργάτες, 2012).

ii) Ανάλυση περιορισμού του ενισχυμένου 16S ριβοσωμικού DNA [Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)]

Η τεχνική ARDRA χρησιμοποιείται για τη συστηματική κατάταξη των βακτηριακών στελεχών σε επίπεδο είδους. Βασίζεται στη σήμανση του ολιγονουκλεοτιδίου της θυμίνης (dUTP) με φθορίζουσα χρωστική και μετέπειτα ενσωμάτωσή του στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, από την οποία προκύπτουν φθορίζοντα προϊόντα. Ακολουθεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και διαχωρισμός των προϊόντων σε γέλη αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο δύσκολος διαχωρισμός των προτύπων μετά την ηλεκτροφόρηση (Smit και συνεργάτες, 1997).

Η τεχνική ARDRA έχει εφαρμοστεί σε μελέτη για την αξιολόγηση θερμόφιλων αρχαίων και βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από διαφορετικά υδροθερμικά πεδία στον Ατλαντικό Ωκεανό. Τα στελέχη της μεγαλύτερης από τις ομάδες που σχηματίστηκαν διακρίθηκαν περαιτέρω με RAPD από την οποία προέκυψαν επιπρόσθετοι διαφορετικοί γονότυποι, ενώ στη συνέχεια οι γονότυποι που προέκυψαν συνολικά ταυτοποιήθηκαν με την αλληλούχιση του γονιδίου τους 16S rDNA (Wery και συνεργάτες, 2002).

iii) Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους ενισχυμένων τελικών θραυσμάτων [Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)]

Η μέθοδος T-RFLP περιλαμβάνει την ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση εκκινητών σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική. Βασίζεται στην πέψη των προϊόντων της αντίδρασης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και την ακόλουθη ανίχνευση των ακραίων τμημάτων περιορισμού που έχουν σημανθεί με τη φθορίζουσα χρωστική σε αυτόματο σύστημα αλληλούχισης DNA. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει παρέχει πληροφορίες για την ποικιλομορφία του πληθυσμού καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μία ταξινομική ομάδα (Thies, 2007). Η μέθοδος T-RFLP εφαρμόστηκε σε μελέτη της ποικιλότητας απομονωθέντων λιθοχημιοαυτότροφων βακτηρίων από υδροθερμικό πεδίο στο υποθαλάσσιο όρος Loihi, Hawaii. Η διάκριση των στελεχών έγινε σε συνδυασμό με μικροσκοπικές μεθόδους και PCR πραγματικού χρόνου για την αξιολόγηση του οικολογικού ρόλου των γονότυπων που απαντήθηκαν σε μεγάλο ποσοστό (Jesser και συνεργάτες, 2015).

iv) Αυτοματοποιημένη ανάλυση του ριβοσωμικού εσωγονιδιακού διαχωριστή [Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)]

Η μέθοδος ARISA χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση στελεχών και βασίζεται στην ενίσχυση του εσωγονιδιακού διαχωριστή (ISR) που βρίσκεται ανάμεσα στη μικρή (16S) και μεγάλη (23S) υπομονάδα του γονιδίου rDNA. Η παραπάνω περιοχή ποικίλει σε μέγεθος και σε αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Το μήκος της εξαρτάται από το στέλεχος ή το είδος του μικροοργανισμού και κυμαίνεται από 50 -1500 ζεύγη βάσεων (bp). Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιούνται σημασμένοι εκκινητές με φθορίζουσα χρωστική για να μπορούν να ανιχνευθούν τα προϊόντα σε αυτοποιημένο σύστημα τριχοειδούς αλληλούχισης (Rastogi και Sani, 2011).

Σε προηγούμενη μελέτη αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των μεθόδων ARISA και T-RFLP για τη διάκριση στελεχών του γένους *Pseudomonas* που απομονώθηκαν από 5 διαφορετικά θαλάσσια οικοσυστήματα στην Αδριατική και το Ιόνιο. Σύμφωνα

με τα αποτελέσματα, η μέθοδος ARISA που αφορά στις ετερογενείς δομές του οπερόνιου rRNA, εμφάνισε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε επίπεδο είδους από τη μέθοδο T-RFLP, που βασίζεται στην υψηλά συντηρημένη περιοχή του γονιδίου 16S rDNA (Danovaro και συνεργάτες, 2006).

v) Ανάλυση πολυμορφισμού ενισχυμένου μήκους θραυσμάτων [Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)]

Η μέθοδος AFLP χρησιμοποιείται για τη διάκριση βακτηρίων σε επίπεδο στελέχους και βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση θραυσμάτων DNA, προερχόμενων από την πέψη ολόκληρου του χρωμοσωμικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στα θραύσματα DNA που παράγονται από την πέψη, προσθέτονται μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, στις οποίες προσδένονται εκκινητές για την ενίσχυση των θραυσμάτων με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση κι οδηγούν στη δημιουργία ζωνών μήκους 60-500 ζευγών βάσεων (bp). Το μέγεθος των ζωνών υποδηλώνει τις αποστάσεις μεταξύ των περιοριστικών θέσεων κι αντιπροσωπεύει το μέγεθος των διαφορετικών αλληλουχιών στις οποίες δεσμεύονται οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Blears και συνεργάτες, 1998). Η AFLP, όπως και οι *rep*-PCR, αποτελούν γρήγορες και οικονομικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της γονοτυπικής, φυλογενετικής και ταξινομικής ποικιλότητας κυρίως μεγάλων συλλογών βακτηριακών στελεχών (Rademaker και συνεργάτες, 2000).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε στελέχη που απομονώθηκαν από υδροθερμικό πεδίο σε βάθος 2.634 m στον Ειρηνικό Ωκεανό και ανήκαν στο γένος *Rhodothermus*. Το χαμηλό ποσοστό ομοιότητας των 16S rRNA αλληλουχιών τους και η μεγάλη διαφοροποίησή τους από άλλα στελέχη του ίδιου γένους, όπως προέκυψε από τη διάκρισή τους με τη μέθοδο AFLP, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για αντιπρόσωπους ενός νέου είδους (*Rhodothermus profundus*) (Marteinsson και συνεργάτες, 2010).

vi) Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA [Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)]

Στη μέθοδο RAPD, χρησιμοποιούνται εκκινητές μικρού μήκους (10bp), οι οποίοι υβριδοποιούνται σε τυχαία σημεία του γονιδιώματος, και με την αλυσιδωτή

αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενισχύουν πολυάριθμα τμήματα DNA, δημιουργώντας μοναδικά πρότυπα ζωνών για καθένα από τα βακτηριακά στελέχη. Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου αποτελούν οι επιμολύνσεις και η επαναληψιμότητα, γι' αυτό η RAPD εφαρμόζεται κυρίως στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος και στη διάκριση των βακτηρίων σε επίπεδο είδους (ένα μοναδικό και επαναλαμβανόμενο πρότυπο ζωνών RAPD θεωρείται πως ανήκει σε στέλεχος του ίδιου είδους) (Renders και συνεργάτες, 1996).

Η μέθοδος RAPD σε συνδυασμό με την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA έχει εφαρμοστεί σε μελέτη της ποικιλότητας θερμόφιλων αρχαίων προκαρυωτικών οργανισμών που απομονώθηκαν από υδροθερμικό πεδίο στον Ειρηνικό Ωκεανό σε βάθος 2.330 m. Αρχικά, η διάκριση των απομονωθέντων στελεχών με RAPD οδήγησε στη δημιουργία ομάδων, καθεμία από τις οποίες περιλάμβανε στελέχη του ίδιου είδους. Στη συνέχεια αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε ομάδα ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την ανάλυση της αλληλουχίας 16S rRNA (Lepage και συνεργάτες, 2004).

1.6.4.2. Μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στην αλληλούχιση γονιδίων ή τμημάτων αυτών

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην αλληλούχιση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA το οποίο συνήθως συνδέεται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Συγκεκριμένα, μία άγνωστη αλληλουχία προκειμένου να ταυτοποιηθεί, συγκρίνεται με γνωστές αλληλουχίες, αποθηκευμένες σε βάσεις δεδομένων και το ποσοστό ομοιότητας ή αντιστοιχίας μεταξύ της άγνωστης και των γνωστών αλληλουχιών αποτελεί την ένδειξη για τη μεταξύ τους συγγενική σχέση. Από τη σύγκριση πολλαπλών αλληλουχιών μεταξύ τους, στη συνέχεια μπορεί να δημιουργηθεί ένα φυλογενετικό δέντρο με τη βοήθεια αλγόριθμων. Γενικότερα, οι μέθοδοι αλληλούχισης είναι περισσότερο αποτελεσματικές για τη δημιουργία φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ βακτηριακών στελεχών κυρίως σε επίπεδο γένους, αντίθετα με τις μεθόδους που χρησιμοποιούν αποτυπώματα DNA και είναι περισσότερο κατάλληλες για τη διάκριση σε επίπεδο στελέχους (Vandamme και συνεργάτες, 1996).

i) Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA

Οι συντηρημένες περιοχές του γονιδίου 16S rDNA επιτρέπουν τον σχεδιασμό υψηλά συντηρημένων εκκινητών για την ενίσχυσή του σχεδόν σε όλα τα είδη βακτηρίων (Greisen και συνεργάτες, 1994). Το προϊόν ενίσχυσης της PCR που προκύπτει συγκρίνεται σε μία βάση δεδομένων, αποδίδονται ποσοστά ομοιότητας με αλληλουχίες καταγεγραμμένων ειδών προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση (> 97 % σε επίπεδο είδους και > 95 % σε επίπεδο γένους) (Schloss και Handelsman, 2005). Η διάκριση μεταξύ των ειδών βασίζεται στις μεταβλητές περιοχές του γονιδίου και γι' αυτό όσο πιο μεγάλο είναι το μέγεθος των αλληλουχιών (τουλάχιστον 200 bp) τόσο πιο ακριβής θεωρείται η ταυτοποίηση. Αν και η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς.

Συγκεκριμένα, κάποια είδη που ανήκουν στο ίδιο γένος (*Bacillus anthracis*, *B. cereus*, και *B. thuringiensis*) ή και σε διαφορετικά (*Escherichia coli* και *Shigella flexneri*) παρουσιάζουν τις ίδιες αλληλουχίες 16S rRNA, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η διαφοροποίησή τους με τη χρήση της παραπάνω τεχνικής. Σε τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας διαφορετικών γονιδίων από το 16S rDNA, όπως το γονίδιο *rpo B* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης και βρίσκεται ως μοναδικό αντίγραφο στο βακτηριακό γονιδίωμα (Petti, 2007).

Άλλος περιοριστικός παράγοντας αφορά στην έλλειψη αλληλουχιών αναφοράς από τις βάσεις δεδομένων. Πριν την ευρεία χρήση της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA, η ταξινόμηση των βακτηρίων γινόταν με κλασσικές συμβατικές μεθόδους κι έχει παρατηρηθεί πως από τα ήδη ταξινομημένα στελέχη κάποια δεν έχουν ακόμα αλληλουχηθεί. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η αλληλούχιση ενός τέτοιου στελέχους να μην παρουσιάσει υψηλά ποσοστά ομοιότητας με τις υπάρχουσες αλληλουχίες αναφοράς και να δημιουργηθεί η λανθασμένη εντύπωση πως πρόκειται για νέο είδος ή γένος. Για παράδειγμα, η αλληλούχιση 36 στελεχών του γένους *Roseomonas*, το οποίο καθορίστηκε το 1993 από τον Rihs και συνεργάτες, έδωσε ποσοστό ομοιότητας <93 % με τις αλληλουχίες αναφοράς των βάσεων δεδομένων. Χρειάστηκε να γίνει ανάλυση των λιπαρών τους οξέων ώστε να δοθούν οι σωστές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των εν λόγω μικροοργανισμών και οδήγησε στο συμπέρασμα πως σε τέτοιες περιπτώσεις χρειάζεται να συνδυάζονται περισσότερες

της μίας μεθόδου για τον σωστό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των στελεχών (Han και συνεργάτες, 2003).

Τέλος, η βακτηριακή προέλευση του ενζύμου Taq πολυμεράση καθώς και η πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος καθιστούν δύσκολη την πλήρη εξάλειψη βακτηριακού DNA από τον μάρτυρα κατά την εφαρμογή της εξαιρετικά ευαίσθητης τεχνικής της PCR. Η χρήση υψηλά συντηρημένων βακτηριακών εκκινητών του γονιδίου 16S rDNA επιδεινώνει το πρόβλημα και συχνά ο μάρτυρας εμφανίζει μία αχνή μπάντα της οποίας όμως η αλληλούχιση δεν αποφέρει αξιοσημείωτα αποτελέσματα (Han, 2006).

1.7. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Αν και είναι πολύ μεγάλο το επιστημονικό ενδιαφέρον γύρω από τη Μικροβιακή Οικολογία των υδροθερμικών οικοσυστημάτων βαθιάς θάλασσας, η κατανομή και η μικροβιακή ποικιλότητα παραμένουν σχεδόν άγνωστες. Στη Μεσόγειο, που αποτελεί τη μεγαλύτερη και βαθύτερη θάλασσα στη Γη, έχουν γίνει μελέτες που αφορούν στη μικροβιακή ποικιλότητα από την ομάδα του Ινστιτούτου Craig Venter (2010) με σκοπό τη διερεύνηση της λειτουργίας των οικοσυστημάτων και την ανακάλυψη νέων γονιδίων με οικολογική, εξελικτική και βιοτεχνολογική σημασία. Έχουν επίσης μελετηθεί εκτενώς τα οικοσυστήματα των υδροθερμικών πεδίων σε μικρό βάθος κοντά στις νήσους Vulcano (Rusch και συνεργάτες, 2005) και Panarea (Manini και συνεργάτες, 2008) καθώς και στη Μήλο (Giovannelli και συνεργάτες, 2013).

Στο υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο έχει μελετηθεί με μεταγονιδιωματική ανάλυση της υπερμεταβλητής περιοχής V5-V6 του γονιδίου 16S rDNA, η ποικιλότητα των βακτηριακών και των αρχαίων προκαρυωτικών πληθυσμών που καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια των καμινάδων και των «μικροβιακών ταπήτων» του ιζήματος στον πυθμένα (Kiliyas και συνεργάτες, 2013). Συγκεκριμένα, ελήφθησαν 11.566 αλληλουχίες βακτηρίων και αρχαίων προκαρυωτικών μικροοργανισμών συνολικά, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 2.757 λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) (γέννη). Οι μονάδες αυτές ανήκαν σε 26 διαφορετικά φύλα, από τα οποία τα 4 αποτελούσαν υποψήφιες διαιρέσεις (≤ 80 % ομοιότητα με αλληλουχίες 16S rRNA από τις βάσεις δεδομένων) και 71 οικογένειες αρχαίων

προκαρυωτικών μικροοργανισμών και βακτηρίων. Επομένως, ένα μεγάλο ποσοστό από τις παραπάνω αλληλουχίες αντιστοιχούσε σε μη ταυτοποιημένες ομάδες. Οι αρχαίοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί του είδους *Nitrosopumilus marinus* αποτελούσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό (3-16 %) από όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν ενώ τα πρωτεοβακτήρια αποτελούσαν το κυρίαρχο φύλο των βακτηριακών πληθυσμών. Πολλές από τις λειτουργικές ταξινομικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν, είχαν ανακτηθεί προηγουμένως από δείγματα ιζήματος και υδροθερμικών καμινάδων από παρόμοια οικοσυστήματα. Για παράδειγμα, η πιο άφθονη αλληλουχία (13 %) της λειτουργικής ταξινομικής ομάδας που ανιχνεύθηκε στο δείγμα της καμινάδας «Σαμπάνια» ήταν συγγενική με την αλληλουχία ακαλλιέργητου βακτηριακού κλώνου που απομονώθηκε από σουλφιδική καμινάδα στο νότιο τμήμα της τάφρου Mariana. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών που προέρχονταν από διαφορετικά δείγματα, με εξαίρεση τους πληθυσμούς που απομονώθηκαν από τις καμινάδες «Πολιτεία» και «Κερί του Ποιητή», οι οποίοι παρουσίασαν 25 % ομοιότητα μεταξύ τους.

Με την παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της ποικιλότητας των βακτηριακών στελεχών με αντιμικροβιακή δράση και μάλιστα μελέτη τέτοιου τύπου αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία για τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας. Συγκεκριμένα, από το ίζημα και την εξωτερική επιφάνεια της καμινάδας «Πολιτεία» συλλέχθηκαν πρώτη φορά δείγματα για την ανάκτηση μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια το 2010 για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης με τη χρήση τηλεχειριζόμενου οχήματος ROV (Remote Operating Vehicle), του οποίου η κατεύθυνση και οι κινήσεις συντονίζονταν από εξειδικευμένους τεχνικούς, που βρίσκονταν στο ωκεανογραφικό πλοίο E/V *Nautilus*. Η προσπάθεια συλλογής οργανισμών με ιδιαίτερα φυσιολογικά χαρακτηριστικά γίνεται προκειμένου να ανακαλυφθούν χημικοί φαινότυποι με σημαντικές βιοδραστικές ιδιότητες.

Οι στόχοι της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής συνοψίζονται στα παρακάτω:

1. Στην ανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού των προκαρυωτικών μικροοργανισμών σε καθαρές καλλιέργειες με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους, τη διάκριση των στελεχών μεταξύ τους και την ταυτοποίησή τους.
2. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των απομονωθέντων στελεχών με φαινοτυπικές (βιοέλεγχος) και γονοτυπικές (ανίχνευση υπεύθυνων γονιδίων) μεθόδους.

3. Στην ανίχνευση/ταυτοποίηση ή απομόνωση βιοενεργών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας που παράγονται από τους απομονωμένους μικροοργανισμούς.

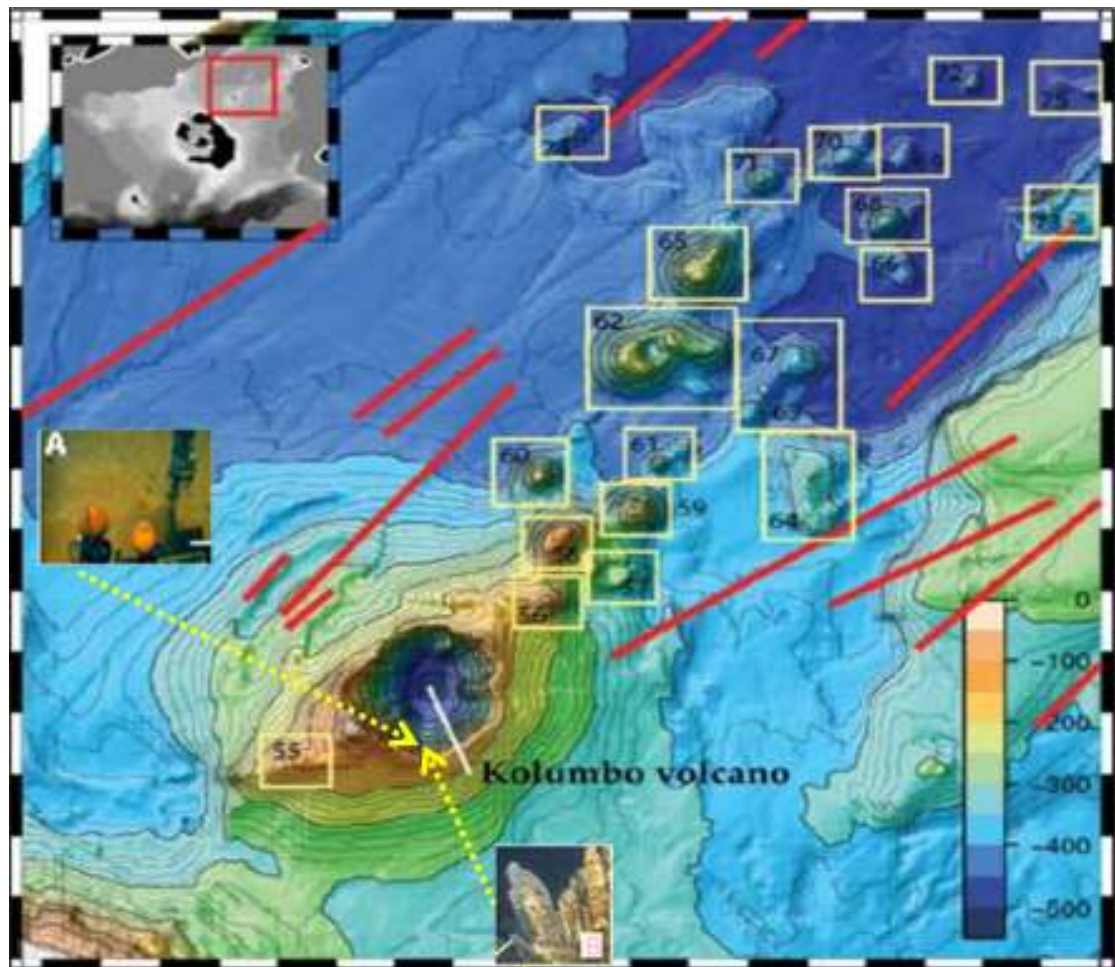
Για τους σκοπούς αυτούς αποφασίστηκε να ακολουθηθούν οι μέθοδοι που περιλαμβάνουν την απομόνωση μεσόφιλων βακτηρίων και τη διάκρισή τους σε επίπεδο στελέχους, τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης ενάντια σε παθογόνους και μη μικροοργανισμούς, την ανίχνευση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πολυκετιδίων και πεπτιδίων μη ριβοσωμικής προέλευσης, τα οποία αποτελούν δύο από τις μεγαλύτερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων και την απομόνωση αντιμικροβιακών ουσιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δειγματοληψία

2.1.1. Θέση δειγματοληψίας της μελέτης

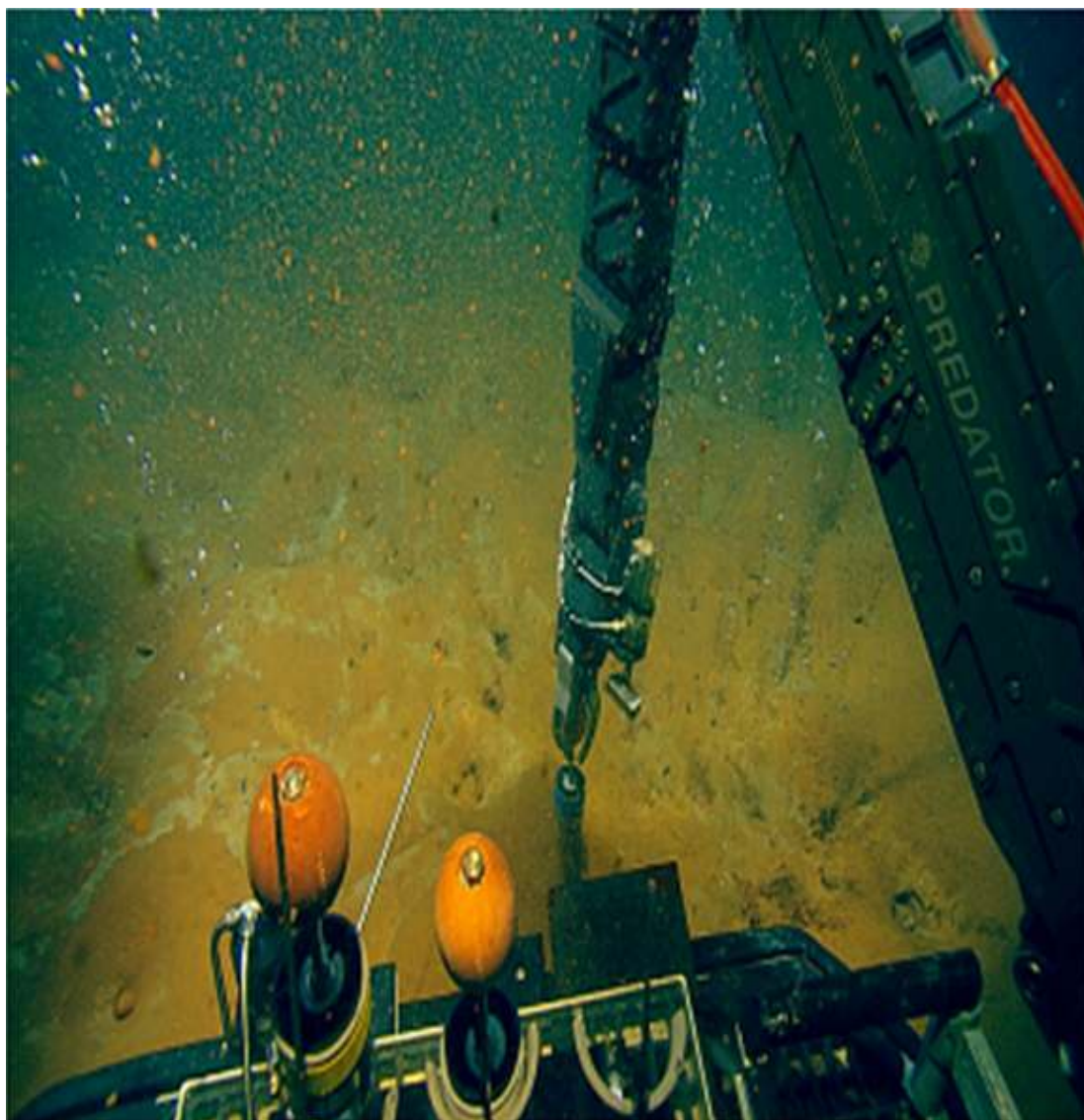
Η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν με τη χρήση τηλεχειριζόμενου οχήματος ROV (Remote Operating Vehicle), συνδεδεμένου με το ωκεανογραφικό πλοίο E/V *Nautilus* την 1^η Αυγούστου του 2010 στο υδροθερμικό πεδίο που βρίσκεται στο βόρειο μέρος του κρατήρα του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο (500 m βάθος). Τα δείγματα ήταν ιζήματος (36:31.5698 N και 25:29.1432 E, θέση A) και καμινάδας (36:31.5413 N και 25:28.5181 E, θέση B) (Εικ. 2.1.).



Εικόνα 2.1. Βαθυμετρικός χάρτης του κρατήρα του ηφαιστείου Κολούμπο, διακρίνονται οι θέσεις δειγματοληψίας ιζήματος (A) και καμινάδας (B), καθώς και άλλων υποθαλάσσιων κώνων που υπάγονται στο ηφαιστειακό ρήγμα του Κολούμπο, βορειανατολικά του ηφαιστείου της Σαντορίνης (Carey και συνεργάτες, 2011).

2.1.2. Μεθοδολογία δειγματοληψίας

Στο ίζημα, η δειγματοληψία έγινε με ειδικό πυρηνολήπτη κυλινδρικού σχήματος, μήκους 30 cm και διαμέτρου 8 cm (Εικ.2.2.). Ο πυρηνολήπτης αυτός είχε προηγουμένως εκπλυθεί με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό και είχε αποστειρωθεί με διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) και στη συνέχεια είχε εκτεθεί σε ακτινοβολία UV στο εργαστήριο (O/N). Από τον πυρηνολήπτη, συλλέχθηκε δείγμα με αποστειρωμένο γυάλινο κύλινδρο μήκους 35 cm και διαμέτρου 1,5 cm και μέρος του τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου Falcon όγκου 50 ml στους οποίους προστέθηκε αποστειρωμένο διάλυμα θαλασσινού νερού παρουσία αναγωγικού παράγοντα 0,05 % (w/v) Na_2S .



Εικόνα 2.2. Συλλογή ιζήματος με πυρηνολήπτη.

Σε δύο διαφορετικά σημεία μίας καμινάδας (Εικ. 2.3.) συλλέχθηκαν δείγματα με τον βραχίονα τηλεχειριζόμενου οχήματος ROV (Remote Operating Vehicle). Τα δείγματα της καμινάδας τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευασία που σφράγιζε με συρόμενο κάλυμμα κι ήταν στερεωμένο στη βάση του ROV. Μετά την επιστροφή τους στο πλοίο, τα δείγματα από την καμινάδα συλλέχθηκαν προσεχτικά με αποστειρωμένο νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία όγκου 100 ml στα οποία προστέθηκε αποστειρωμένο διάλυμα θαλασσινού νερού παρουσία αναγωγικού παράγοντα 0,05% (w/v) Na_2S .



Εικόνα 2.3. Συλλογή δείγματος καμινάδας με τον βραχίονα του ROV.

Σε κάθε είδος δείγματος έγινε μελέτη 3 υποδειγμάτων του αρχικού δείγματος ως ανεξάρτητα δείγματα για λόγους στατιστικής ανάλυσης. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους +4 °C έως τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

2.2. Μικροοργανισμοί και καλλιέργειες

2.2.1. Απομόνωση των μικροοργανισμών από τα δείγματα ιζήματος και καμινάδας

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια απομόνωσης ετερότροφων και μεσόφιλων βακτηρίων από τα δείγματα. Με στόχο την απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια όσο το δυνατό περισσότερων αερόβιων μεσόφιλων ετερότροφων μικροοργανισμών, η δειγματοληψία έγινε σε πολύ μικρό βάθος στο ίζημα (30 cm βάθος) και στην εξωτερική επιφάνεια της καμινάδας και όπου οι μικροοργανισμοί έρχονται σε επαφή με το οξυγονωμένο ωκεάνιο νερό με θερμοκρασία 17 °C. Ποσότητα 10 g κάθε δείγματος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου Universal και προστέθηκαν 10 ml διαλύματος Ringer (§ 2.3.4). Ακολούθησε ανακίνηση σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διαδοχικές αραιώσεις μέχρι αραιώσης ίσης με 10^{-7} και εμβολιασμός με τη μέθοδο της επίστρωσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα Marine Agar (§ 2.3.3), Tryptone Glycerol Agar (§ 2.3.1) και Tryptone Glucose Agar (§ 2.3.2). Σε κάθε τριβλίο χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο ποσότητα 200 μ l κι έγινε επώαση για 7 ημέρες σε ελεγχόμενη θερμοκρασία ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Επιστρώθηκαν 3 τρυβλία από κάθε αραιώση, με κάθε θρεπτικό υπόστρωμα.

2.2.2. Διατήρηση μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι απομονώθηκαν με τη βοήθεια κρίκου εμβολιασμού, ανακαλλιιεργήθηκαν και διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v) (§ 2.3.5.), σε θερμοκρασία -20 °C.

2.2.3. Μικροβιακοί δείκτες

α) Προκαρυωτικοί δείκτες

Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να ελεγχθεί η ενεργότητα των απομονωθέντων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν 13 παθογόνοι και μη βακτηριακοί δείκτες που προέρχονται από τη γερμανική συλλογή μικροοργανισμών DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (Πίνακας 2.1.).

Πίνακας 2.1. Προκαρυωτικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα του βιοελέγχου, το θρεπτικό υπόστρωμα και η θερμοκρασία στην οποία αναπτύχθηκαν.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ
<i>Acinetobacter radioresistens</i> DSMZ 6976	Τρυπτόνη από Σόγια (TSA) (§ 2.3.9.)	28 °C
<i>Burkholderia xenovorans</i> DSMZ 17367	Τρυπτόνη από Σόγια (TSA) (§ 2.3.9.)	28 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSMZ 50090	Θρεπτικό Άγαρ (NA) (§ 2.3.6.)	30 °C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> DSMZ 9189	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Haemophilus influenzae</i> DSMZ 24049	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 1117	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Escherichia coli</i> DSMZ 1103	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 10	Θρεπτικό Άγαρ (NA) (§ 2.3.6.)	30 °C
<i>Micrococcus luteus</i> DSMZ 1790	Θρεπτικό Άγαρ (NA) (§ 2.3.6.)	30 °C
<i>Kocuria rhizophila</i> DSMZ 348	Θρεπτικό Άγαρ (NA) (§ 2.3.6.)	30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> DSMZ 1104	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 2570	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C
<i>Streptococcus pneumoniae</i> DSMZ 24048	Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) (§ 2.3.10.)	37 °C

β) Ευκαρυωτικοί δείκτες

Στην παρούσα εργασία, εκτός από τους προκαρυωτικούς χρησιμοποιήθηκαν και 5 παθογόνοι και μη ευκαρυωτικοί δείκτες που προέρχονται από τη γερμανική συλλογή

μικροοργανισμών DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Ευκαρυωτικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα του βιοελέγχου, το θρεπτικό υπόστρωμα και η θερμοκρασία στην οποία αναπτύχθηκαν.

ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ
<i>Aspergillus nidulans</i> DSMZ 820	Δεξτρόζη Πατάτας (PDA) (§ 2.3.7.)	26 °C
<i>Aspergillus niger</i> DSMZ 1957	Δεξτρόζη Πατάτας (PDA) (§ 2.3.7.)	30 °C
<i>Rhizoctonia solani</i> DSMZ 843	Δεξτρόζη Πατάτας (PDA) (§ 2.3.7.)	26 °C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSMZ 70449	Εκχύλισμα για ζύμες (YM) (§ 2.3.8.)	25 °C
<i>Candida albicans</i> DSMZ 1386	Εκχύλισμα για ζύμες (YM) (§ 2.3.8.)	25 °C

2.2.4. Καλλιέργεια των μικροοργανισμών

α) Εκτίμηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ($\mu_{\max}$) και του χρόνου διπλασιασμού της καλλιέργειας (t_d)

Η μελέτη της μικροβιακής αύξησης έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπα που στοχεύουν στην πρόβλεψη του ρυθμού ανάπτυξης ενός μικροβιακού πληθυσμού όπως αναφέρεται στο Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001). Οι τιμές για τον συντελεστή $\mu_{\max}$ μπορούν να ληφθούν από πειράματα κλειστών συστημάτων καλλιέργειας με το μέγεθος του πληθυσμού να εξετάζεται σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των 42 ταυτοποιημένων στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar (§ 2.3.3) κι ακολούθησε εμβολιασμός του κάθε στελέχους σε 100 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος (§ 2.3.11) κι επώαση στους 25 °C, υπό ανάδευση στις 180 στροφές/min. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης της καλλιέργειας έγινε με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm, χρησιμοποιώντας κυψελίδες χωρητικότητας 2,0 ml και 1,0 ml δείγματος από την κάθε

καλλιέργεια. Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν καμπύλες κλειστού κύκλου αύξησης των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων των καλλιιεργειών στα 600 nm. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας προσδιορίστηκαν από την κλίση της καμπύλης αύξησης όταν ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση.

β) Καλλιέργεια του επιλεγμένου βακτηριακού στελέχους και εκχύλιση

Η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από το βακτηριακό στέλεχος S222 (*Pseudomonas psychrotolerans*) έγινε σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (§ 2.3.11.) συνολικού όγκου 10 l (σε 10 κωνικές φιάλες όγκου 2 l με 1 l θρεπτικό υπόστρωμα στη κάθε μία) στους 25 °C για 7 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα. Μετά το πέρας της περιόδου επώασης, η υγρή καλλιέργεια εκχυλίστηκε με EtOAc και ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων σε διαχωριστική χοάνη, οπότε και συλλέχθηκε η οργανική στοιβάδα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν υπό κενό, οπότε και παρελήφθη το αρχικό υπόλειμμα υποκίτρινου χρώματος και ελαιώδους υφής, βάρους 0,5 g.

2.2.5. Ανίχνευση παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη

Με τη μέθοδο της διάχυσης που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, μπορεί να διαπιστωθεί η ενεργότητα περισσότερων από ένα διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, οι καλλιέργειες των οποίων επιστρώνονται σε στερεό υπόστρωμα.

Η ικανότητα καθενός από τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη να αναστέλλουν την αύξηση 18 παθογόνων και μη μικροβιακών δεικτών εκτιμήθηκε με την εφαρμογή *in vitro* δοκιμής που περιέγραψαν οι Muscholl-Silberhorn και συνεργάτες (2008) τροποποιημένης ως ακολούθως:

Εμβόλια των βακτηριακών στελεχών όγκου 30 μl από διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v) τοποθετήθηκαν σε τριβλία διαμέτρου 9 cm (εμβολιασμός 4 διαφορετικών στελεχών ανά τριβλίο), που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar 2216

(Difco) (§ 2.3.3.). Ακολούθησε επώαση για 96 h στους 25 °C. Στη συνέχεια, το κάθε τριβλίο επιστρώθηκε με τον μικροοργανισμό δείκτη σε κατάλληλο για τον καθένα θρεπτικό υπόστρωμα με προσθήκη άγαρ 0,7 % (soft agar). Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα για τον κάθε δείκτη αποστειρώθηκε σε κωνικές (60 ml σε κάθε κωνική) και στη συνέχεια η κάθε μία κωνική εμβολιάστηκε με 120 μl διαλύματος αλάτων Ringer (§ 2.3.4.) που περιείχε καλλιέργεια του δείκτη από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Στην περίπτωση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* ως εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε τμήμα μυκηλίου από καλλιέργεια του μύκητα 5 ημερών. Το τμήμα μυκηλίου τοποθετήθηκε στο κέντρο του τριβλίου, ανάμεσα σε 2 αποικίες βακτηρίων.

Έγινε επώαση για 24 h για όλους τους δείκτες εκτός από τον μύκητα *Rhizoctonia solani* (επώαση 5 ημερών) και κατόπιν καταγράφηκε ο ανταγωνισμός μεταξύ των δύο μικροοργανισμών ως ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του δείκτη. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η διάμετρος σε εκατοστά, με ακτίνα που ξεκινάει από το κέντρο της αποικίας και τελειώνει στο σημείο που σταματάει η ανάπτυξη του οργανισμού δείκτη.

2.2.6. Απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από την εκχύλιση του στελέχους S222

2.2.6.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker DRX 400. Τα 2D-NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl_3 . Οι ^1H NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του CHCl_3 στα 7,24 ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Waters 600 με διπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI Waters 410. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς

HPLC ήταν στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 8 mm (Kromasil 100 C18, 5 μ m).

Η συμπύκνωση των υπολειμμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 38 °C.

2.2.6.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60A flash (35-70 μ m) της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου αντίστροφης φάσης τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid sample preparation της εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0,2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H₂SO₄ σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH₂Cl₂ και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Ο διαλύτης MeCN ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Η λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο της εταιρείας Aldrich-Sigma Chemical Company.

Το H₂O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα

2.3.1. Θρεπτικό υπόστρωμα γλυκερόλης-αργινίνης (Glycerol - Arginine Agar, m-GAA) (Kontro και συνεργάτες, 2005) τροποποιημένο ως ακολούθως (g l⁻¹): γλυκερόλη 12,5, τρυπτόνη 5,0, K₂HPO₄ 1,0, NaCl 1,0, MgSO₄ 7H₂O 0,5, άγαρ 15,0 και 1 ml από τα διαλύματα Fe₂(SO₄)₃ 1,0 M, CuSO₄ 0,1 M, ZnSO₄ 0,1 M, MnSO₄ 0,1 M. Ρύθμιση pH πριν την αποστείρωση στο 7,8.

2.3.2. Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα τρυπτόνης, εκχυλίσματος ζύμης και γλυκόζης (Modified Tryptone -Yeast extract - Glucose Agar, TYGA) (Kontro και συνεργάτες, 2005). Περιέχει (g l⁻¹): γλυκόζη 1,0, τρυπτόνη 5,0, K₂HPO₄ 1,0, NaCl 1,0, MgSO₄ 7H₂O 0,5, άγαρ 15,0 και 1 ml από τα διαλύματα Fe₂(SO₄)₃ 1,0 M, CuSO₄ 0,1 M, ZnSO₄ 0,1 M, MnSO₄ 0,1 M. Ρύθμιση pH πριν την αποστείρωση στο 7,8.

2.3.3. Θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar 2216 (Difco). Περιέχει (g l⁻¹): εκχύλισμα ζύμης 1, τρυπτόνη 5, NaCl 19,45, άγαρ 15,0, κιτρικό σίδηρο 0,1, MgCl₂ 8,8, Na₂SO₄ 3,24, CaCl₂ 1,8, KCl 0,55, NaHCO₃ 0,16, KBr 0,08, SrCl₂ 0,034, H₃BO₃ 0,022, Na₂SiO₃ 0,004, NaF 0,0024, NH₄NO₃ 0,0016, Na₂HPO₄ 0,008, pH 7.6 ± 0,2.

2.3.4. Διάλυμα αλάτων Ringer, (Wellington και συνεργάτες, 1990). Περιέχει (g l⁻¹): NaCl 2,15, KCl 0,15, CaCl₂ 0,075, K₂HPO₄ 0,5.

2.6.5. Διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v) για συντήρηση μικροοργανισμών (Wellington και Williams, 1978).

2.3.6. Θρεπτικό Άγαρ (NA), για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων (Atlas, 1993). Περιέχει (g l⁻¹): πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, NaCl 5,0 - άγαρ 15,0, pH 7,4 ± 0,2.

2.3.7. Θρεπτικό υπόστρωμα Δεξτρόζης Πατάτας (PDA) για ανάπτυξη μυκήτων. Περιέχει (g l⁻¹ εγχύματος πατάτας): γλυκόζη 20,0, άγαρ 15,0. Το εκχύλισμα πατάτας παρασκευάστηκε μετά τον βρασμό 200 g από καθαρισμένες και κομμένες πατάτες σε 1000 ml νερό για μία ώρα και το πέρασμα από λεπτό ηθμό.

2.3.8. Θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος Ζύμης (YM) για ανάπτυξη ζυμών. Περιέχει (g l⁻¹): εκχύλισμα ζύμης 3,0, εκχύλισμα βύνης 3,0, πεπτόνη από σόγια 5,0, γλυκόζη 10,0, άγαρ 15,0.

2.3.9. Θρεπτικό υπόστρωμα Τρυπτόνης από Σόγια (TSA) για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων (Atlas, 1993). Περιέχει (g l⁻¹): τρυπτόνη 15,0, πεπτόνη σόγιας 5,0, NaCl 5,0, άγαρ 15,0, pH 7,3 ± 0,2.

2.3.10. Θρεπτικό υπόστρωμα Iso SensiTest Agar (Oxoid CM047) για παθογόνους μικροοργανισμούς. Περιέχει (g l⁻¹): υδρολυμένη καζεΐνη 11,0, πεπτόνη 3,0, γλυκόζη 2,0, άμυλο 1,0, NaCl 3,0, Na₂HPO₄ 2,0, CH₃COONa 1,0, C₃H₉O₆PMg 0,2, C₁₂H₂₂CaO₁₄ 0,1, CoSO₄ 0,001, CuSO₄ 0,001, ZnSO₄ 0,001, FeSO₄ 0,001, MnCl₂ 0,002, C₁₁H₈O₂ 0,001, βιταμίνη B12, C₃H₇NO₂S 0,02, C₁₁H₁₂N₂O₂ 0,02, βιταμίνη B6 0,003, βιταμίνη B5 0,003, βιταμίνη B3 0,003, βιταμίνη B7 0,0003, θειαμίνη 0,00004, αδενίνη 0,01, γουανίνη 0,01, ξανθίνη 0,01, ουρακίλη 0,01, άγαρ 15,0, pH 7,4 ± 0,2.

2.3.11. Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα για ετερότροφους θαλάσσιους μικροοργανισμούς (habitat water media) (Muscholl-Silberhorn και συνεργάτες, 2008). Περιέχει (g l⁻¹): εκχύλισμα ζύμης 1,0, τρυπτόνη 5,0, αποστειρωμένο και μετά από διύθηση με ηθμό θαλασσινό νερό, pH 7,4 ± 0,2.

2.3.12. Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Luria Bertani Broth για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών. Περιέχει (g l⁻¹): εκχύλισμα ζύμης 5,0, τρυπτόνη 10,0, NaCl 5,0, pH 7,0.

2.4. Μοριακές μέθοδοι

2.4.1. Απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Haught και συνεργατών (1994). Το DNA των μικροοργανισμών απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια. Μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολισμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500 μl διαλύματος Ringer και φυγοκεντρήθηκαν σε 13000×g για 10 λεπτά.

Στο ίζημα έγινε προσθήκη διαλύματος λύσης (25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3 % σακχαρόζη, 10 mg ml⁻¹ λυσοζύμη) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα SDS 10 % και το μίγμα επώαστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά

λεπτό, στους 15 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες και έγινε προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου 5 M και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο. Μετά από παραμονή 30 λεπτών, οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση με ισοπροπανόλη για 30 λεπτά στους 21 °C και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C. Στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης 70 % και μετά από φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C, το ίζημα ξηράθηκε και αναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4.2.1. Αντίδραση BOX-PCR

Οι BOX αλληλουχίες είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο βακτηριακό γονιδίωμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη BOX PCR αντίδραση στοχεύουν στις επαναλήψεις αυτές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίηση σημαντικών περιβαλλοντικών βακτηριακών ειδών σε επίπεδο στελέχους (Rademaker και συνεργάτες, 2004). Χρησιμοποιώντας τον εκκινητή BOX A1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACC-3' (Rademaker και De Bruijn, 1998) έγινε επιλεκτική ενίσχυση των περιοχών που βρίσκονται μεταξύ των στοιχείων BOX. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και ο διαχωρισμός τους έδωσε την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα (bar code), μοναδικού για κάθε στέλεχος. Όλοι οι μικροοργανισμοί που έδωσαν το ίδιο πρότυπο θεωρήθηκαν ως το ίδιο στέλεχος.

Η σύσταση του μείγματος που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση ήταν η εξής: 2,25 µl BOXA1R, 1,875 µl MgCl₂ (Hy Test Ltd), 2,5 µl Buffer (Hy Test Ltd), 1,25 µl dNTPs (4 mM), 1,25 µl dMSO, 0,25 µl Taq DNA πολυμεράση (Hy Test Ltd), 2 µl DNA και 13,625 µl H₂O.

Η αντίδραση PCR ξεκίνησε με επώαση των αντιδραστηρίων στους 95 °C για 10 min, ακολούθησαν 30 κύκλοι των 30 sec στους 94 °C, 1 min στους 52 °C και 6,5 min στους 65 °C. Η αντίδραση τερματίστηκε με ένα επιπλέον βήμα αποτελούμενο από επώαση 16 min στους 65 °C. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν

σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % το οποίο περιείχε 20 μl βρωμιούχου αιθιδίου για 5 h στα 55 V και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η αντίδραση PCR επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε απομονωμένο στέλεχος.

2.4.2.2. Στατιστική ανάλυση και ομαδοποίηση των προτύπων που προκύπτουν από την αντίδραση BOX-PCR

Η ομαδοποίηση (cluster analysis) των διαφορετικών προτύπων βακτηριακού DNA όπως προκύπτουν από αντιδράσεις BOX-PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού. Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία μίας μήτρας συσσωρευτικής ομαδοποίησης δεδομένων για την παραγωγή ενός δένδρογράμματος το οποίο απεικονίζει τις αποστάσεις (που εκφράζονται σε συγγένεια ή μη) μεταξύ των διαφορετικών προτύπων. Η ομαδοποίηση γίνεται με τη χρήση αλγορίθμων και είναι γνωστή ως UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Η συσχέτιση των δειγμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια συντελεστών που συγκρίνουν τα χαρακτηριστικά των προτύπων, ενώ οι μετρήσεις γίνονται με πυκνομετρικές καμπύλες περιγραφόμενες ως σειρές πυκνομετρικών τιμών. Στις μετρήσεις περιλαμβάνονται ο αριθμός και η θέση των κορυφών των πυκνομετρικών καμπύλων, η αναλογία των διαφορετικών σημείων στα οποία απαντώνται οι κορυφές καθώς και το εμβαδόν της επιφάνειας που περικλείεται από τις καμπύλες αυτές (Rademaker και De Bruijn, 1997).

Ένα από τα υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη συσχέτιση προτύπων που προέρχονται από αντιδράσεις BOX-PCR είναι το GelCompar (Vauterin και Vauterin, 1992) με το οποίο είναι εφικτή η κανονικοποίηση γενετικών αποτυπωμάτων DNA προερχόμενων από ηλεκτροφορήσεις διαφορετικών πηκτωμάτων αγαρόζης ίδιου μεγέθους (Schneider και De Bruijn, 1996). Στα δένδρογράμματα που παράγονται με το πρόγραμμα GelCompar, η μέτρηση των αποστάσεων μεταξύ των προτύπων υπολογίζεται γραμμικά (Ευκλείδειος απόσταση), ενώ για τη συσχέτιση των τιμών χρησιμοποιείται ο συντελεστής ομοιότητας Pearson. Ο συντελεστής αυτός περιλαμβάνει τόσο τον συντελεστή Jaccard (εκφράζει την αντιστοιχία μεταξύ των ζωνών) όσο και τις διαφορές των σχετικών τιμών εμβαδού της επιφάνειας που περικλείεται κάτω από κάθε ζώνη, ενώ δεν εξαρτάται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των ζωνών και δεν επηρεάζεται από κηλίδες στον φόντο

(θορύβους), με αποτέλεσμα να θεωρείται ιδανικός για αναλύσεις προτύπων που παράγονται από αντιδράσεις BOX-PCR (Rademaker και De Bruijn, 1997).

Στην παρούσα εργασία τα πρότυπα των απομονωμένων στελεχών, ομαδοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος GelCompar, εφαρμόζοντας τη μέθοδο UPGMA και χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson. Ως κριτήριο για την ομαδοποίηση των προτύπων BOX θεωρήθηκε το μικρότερο ποσοστό ομοιότητας που παρατηρήθηκε από τη σύγκριση 3 προτύπων του ίδιου στελέχους, όπως προέκυψαν από 3 διαφορετικές αντιδράσεις BOX-PCR που έγιναν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου (cut off value ≥ 65 %).

Στα διαφορετικά πρότυπα BOX-PCR που προέκυψαν σε συνδυασμό με το εύρος της αντιμικροβιακής τους δράσης (σε εκατοστά) ενάντια σε καθέναν από τους μικροβιακούς δείκτες, έγινε ομαδοποίηση με χρήση του αλγόριθμου Ward, προκειμένου να ομαδοποιηθούν τα δεδομένα με τον καλύτερο τρόπο και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια πληροφορίας (Saracli και συνεργάτες, 2013). Με βάση το δένδrogram που προέκυψε, έγινε περαιτέρω ομαδοποίηση των δεδομένων με μεθόδους πολυμεταβλητής στατιστικής όπως η πολυδιάστατη κλιμακοποίηση (Multidimensional Scaling) και ανάλυση κύριων συνιστωσών Principal Components Analysis).

2.4.3. Ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των πολυενεργών στελεχών

Γενωμικό DNA από τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του τμήματος 8 – 1510 (αρίθμηση κατά *E. coli*) του 16S rDNA γονιδίου με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων pA (Edwards και συνεργάτες, 1989) και R1492 (Heuer και συνεργάτες, 1997). Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων ήταν οι ακόλουθες: pA 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', ποσοστό GC 50%, $T_m = 51,8$ °C και R1492 5' -TACGGYTACCTTGTTACGACT-3', ποσοστό GC 43,2 %, $T_m = 51,1 - 53$ °C.

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μ l ήταν η εξής : 50 ng γενωμικού DNA, 1x Reaction Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 20 pmoles pA, 20 pmoles R1492, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4% (v/v) DMSO, 1,25 Unit Taq DNA πολυμεράση (Biotools England), νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 50 μ l.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: ένα αρχικό στάδιο 3 λεπτών στους 95 °C, στη συνέχεια ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 56 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 1,5 λεπτό στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 λεπτά. Τελικά, τα προϊόντα του PCR με αναμενόμενο μέγεθος 1484 βάσεις, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, τα προϊόντα καθαρίστηκαν από το πήκτωμα με Nucleospin Extract PCR kit, (Macherey-Nagel, Germany) και αλληλουχήθηκαν με τη χρήση του εκκινητή και του πακέτου BigDye terminator 3.1, ενώ αναλύθηκαν σε αυτόματο αλληλουχητή ABI 3700 (Applied Biosystems).

2.4.4. Ανίχνευση του υπεύθυνου γονιδίου για τη σύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων

Η ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων για τη σύνθεση μη ριβοσωμικών πεπτιδίων από μη ριβοσωμικές συνθετάσες (NRPS), έγινε με την ενίσχυση της περισσότερο συντηρημένης περιοχής του γονιδίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών (Πίν. 2.3.) προκειμένου να ενισχυθεί η αδενυλική δομική περιοχή (A) των NRPS, σύμφωνα με τους Zhang και συνεργάτες, 2009.

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μl ήταν η εξής: 5 μl Reaction Buffer 1x, 2 μl MgCl₂ 50 mM, 5 μl DMSO 100%, 1 μl dNTPs Mix 10 mM το καθένα, 2 μl από τον κάθε εκκινητή 100 mM, 0.25 μl Unit Taq DNA πολυμεράση (Biotools, Spain) και 50 – 100 ng γενωμικού DNA.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: ένα αρχικό στάδιο 5 λεπτών στους 94 °C, στη συνέχεια ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 55 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10

λεπτά. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Πίνακας 2.3. Ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών για την ανίχνευση της συντηρημένης περιοχής (A) του γονιδίου NRPS

Εκκινητές γονιδίου NRPS	Αλληλουχία
MTF	5'-GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC-3'
MTR	5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3'
NS1	5'-CAACCCCTATGCCTT TTGAA-3'
NS2	5'-TAAACAACCCATGCTCCACA-3'
NP1	5'-CCTAATTCAATACGAAAACCACG AADYTTNAYYTG-3'
NP2	5'-TGTATGTTATTTATACTTCT GGTTCTACTGGTMRNCCANARG G-3'

Τα προϊόντα με μέγεθος 1000 βάσεις, καθαρίστηκαν από το πήκτωμα με Nucleospin Extract PCR kit, (Macherey-Nagel, Germany) και κλωνοποιήθηκαν με το πλασμίδιο pTZ57R/T (πακέτο TOPO TA Cloning® Kit, Version R) (Fermentas, USA). Οι θετικές αποικίες ελέγχθηκαν για το αν περιέχουν το σωστό προϊόν (1000 bp) με αντίδραση PCR με τη χρήση του εκκινητή του πλασμιδίου M13/pUC F (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'). Οι θετικοί κλώνοι μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (§ 2.3.12), εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό Αμπικυλίνη 100 ng/ml, επώστηκαν στους 37 °C για 12 ώρες και ακολούθησε εξαγωγή πλασμιδίου σύμφωνα με το kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Η αλληλούχιση των κλώνων έγινε με τη χρήση του εκκινητή M13/pUC F και του πακέτου BigDye terminator 3.1, ενώ αναλύθηκαν σε αυτόματο αλληλουχητή ABI 3700 (Applied Biosystems).

2.4.5. Ανίχνευση του υπεύθυνου γονιδίου για τη σύνθεση πολυκετιδίων

Η ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων για τη σύνθεση πολυκετιδίων από πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS), έγινε με την ενίσχυση της περισσότερο

συντηρημένης περιοχής του γονιδίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών (Πίν. 2.4.) προκειμένου να ενισχυθεί η κετο-συνθετάση (KS) των PKS, σύμφωνα με τους Zhang και συνεργάτες, 2008.

Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 µl ήταν η εξής: 5 µl Reaction Buffer 1x, 2 µl MgCl₂ 50 mM, 5 µl DMSO 100%, 1 µl dNTPs Mix 10 mM το καθένα, 2 µl από τον κάθε εκκινητή 100 mM, 0.25 µl Unit Taq DNA πολυμεράση (Biotools, Spain) και 50 – 100 ng γενωμικού DNA.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: ένα αρχικό στάδιο 5 λεπτών στους 94 °C, στη συνέχεια ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 50 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Πίνακας 2.4. Ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών για την ανίχνευση της συντηρημένης περιοχής (KS) του γονιδίου PKS

Εκκινητές γονιδίου PKS	Αλληλουχία
GBf	5'- RTRGAYCCNCAGCAICG-3'
GBr	5'-VGTNCCNGTGCCRTG-3'
GCf	5'-GCSATGGAYCCSCARCARGSVT-3'
GCr	5'-GTSCCSGTSCCRTGSSCYTCSAC-3'
KSDPQQf	5'-MGNGARGCENNWNMNA TGGAYCCNCARCANMG -3'
KSHGTGr	5'- GGRTCNCCNARNSWNGT NCCNGTNCCRTG-3'

Τα προϊόντα με μέγεθος 700 βάσεις καθαρίστηκαν από το πήκτωμα με Nucleospin Extract PCR kit, (Macherey-Nagel, Germany) και κλωνοποιήθηκαν με το πλασμίδιο pTZ57R/T (πακέτο TOPO TA Cloning® Kit, Version R) (Fermentas, USA). Οι

θετικές αποικίες ελέγχθηκαν για το αν περιέχουν το σωστό προϊόν (700 bp) με αντίδραση PCR με τη χρήση του εκκινητή του πλασμιδίου M13/pUC F (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'). Οι θετικοί κλώνοι μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (§ 2.3.12), εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό Αμπικυλίνη 100 ng/ml, επώαστηκαν στους 37 °C για 12 ώρες και ακολούθησε εξαγωγή πλασμιδίου σύμφωνα με το kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Η αλληλούχιση των κλώνων έγινε με τη χρήση του εκκινητή M13/pUC F και του πακέτου BigDye terminator 3.1, ενώ αναλύθηκαν σε αυτόματο αλληλουχητή ABI 3700 (Applied Biosystems).

2.4.6. Σύγκριση των αλληλουχιών 16S rRNA, NRPS και PKS

Η φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA έγινε με τη σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με ήδη γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με το πρόγραμμα blastn (Standard Nucleotide Basic Local Alignment Tool). Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πολλαπλής ευθυγράμμισης MUSCLE του προγράμματος MEGA 6 (Tamura και συνεργάτες, 2013). Εφαρμόστηκε η μέθοδος της Γειτνίασης (Neighbor Joining) σύμφωνα με το μοντέλο 2 παραμέτρων Kimura. Η στατιστική υποστήριξη της τοπολογίας του φυλογενετικού δέντρου προσεγγίστηκε με τη μέθοδο bootstraps με 1000 επαναλήψεις. Οι αλληλουχίες 16S rRNA κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>) με τους κωδικούς HG 764607 – HG 764648.

Η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων PKS και NRPS έγινε με τη σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, που προέκυψαν από τη μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη χρήση του προγράμματος EXPACY (SIB Bioinformatics Resource Portal), με ήδη γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με το πρόγραμμα blastp (Standard Protein Basic Local Alignment Tool). Τα 2 φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν, κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πολλαπλής ευθυγράμμισης MUSCLE του προγράμματος MEGA 6 (Tamura και συνεργάτες, 2013). Εφαρμόστηκε η μέθοδος της Γειτνίασης (Neighbor Joining) σύμφωνα με το πρότυπο Poisson και η στατιστική υποστήριξη της τοπολογίας του φυλογενετικού δέντρου προσεγγίστηκε με

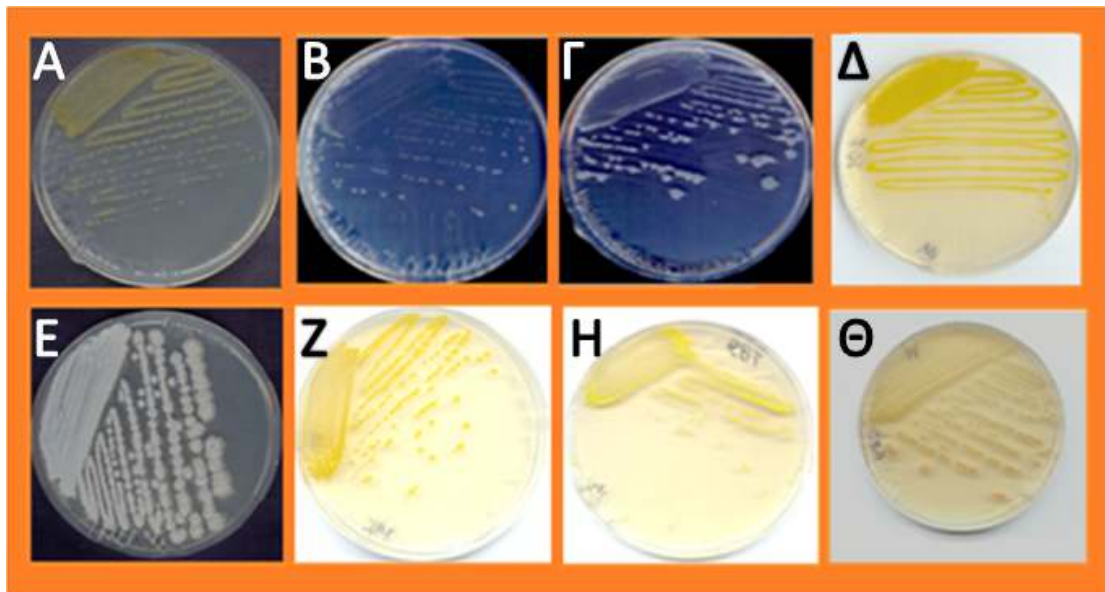
τη μέθοδο bootstraps με 1000 επαναλήψεις. Οι αλληλουχίες των γονιδίων PKS και NRPS κατατέθηκαν στην GenBank με τους κωδικούς KM186546 – KM186570.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

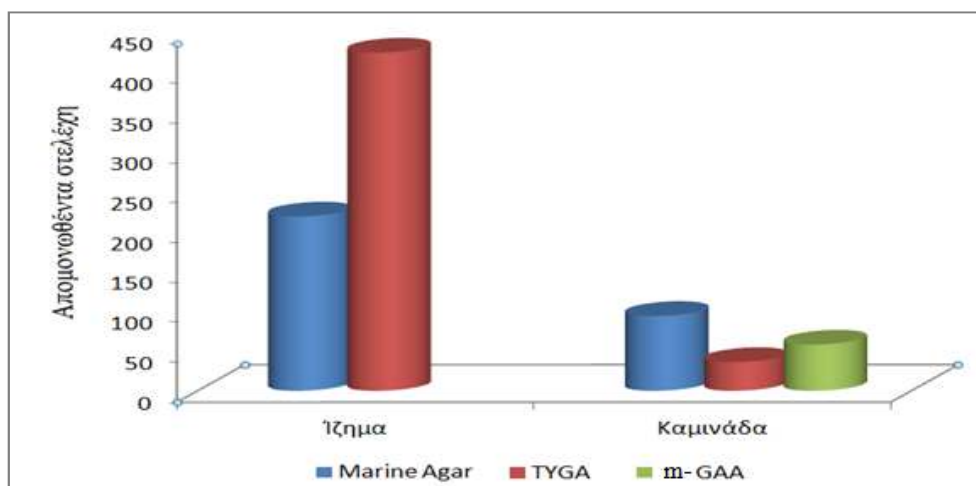
3.1. Μικροβιακή ποικιλότητα του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο

α) Μεσόφιλα βακτήρια του Κολούμπο

Από το υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο, συλλέχθηκαν δείγματα όπως περιγράφεται προηγουμένως (§ 2.2.1.1.), προκειμένου να γίνει προσπάθεια απομόνωσης μεσόφιλων μικροοργανισμών. Απομονώθηκαν συνολικά 832 αερόβια ετερότροφα βακτήρια εκ των οποίων 644 από το ίζημα και 188 από την καμινάδα (Εικ. 3.1.). Από τα 644 που ανακτήθηκαν από το ίζημα, το 34 % απομονώθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar (§ 2.3.3) και το 66 % σε θρεπτικό υπόστρωμα TYGA (§ 2.3.2). Από τα 188 στελέχη που ανακτήθηκαν από το δείγμα καμινάδας, το 50 % απομονώθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar, το 19 % σε θρεπτικό υπόστρωμα TYGA και 31 % από το τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα Glycerol-Arginine Agar (m-GAA) (§ 2.3.1) (Εικ. 3.2.).



Εικόνα 3.1. Μερικές από τις αποικίες βακτηριακών στελεχών, απομονωμένων από τα δείγματα ιζήματος (Α-Δ) και καμινάδας (Ε-Θ).

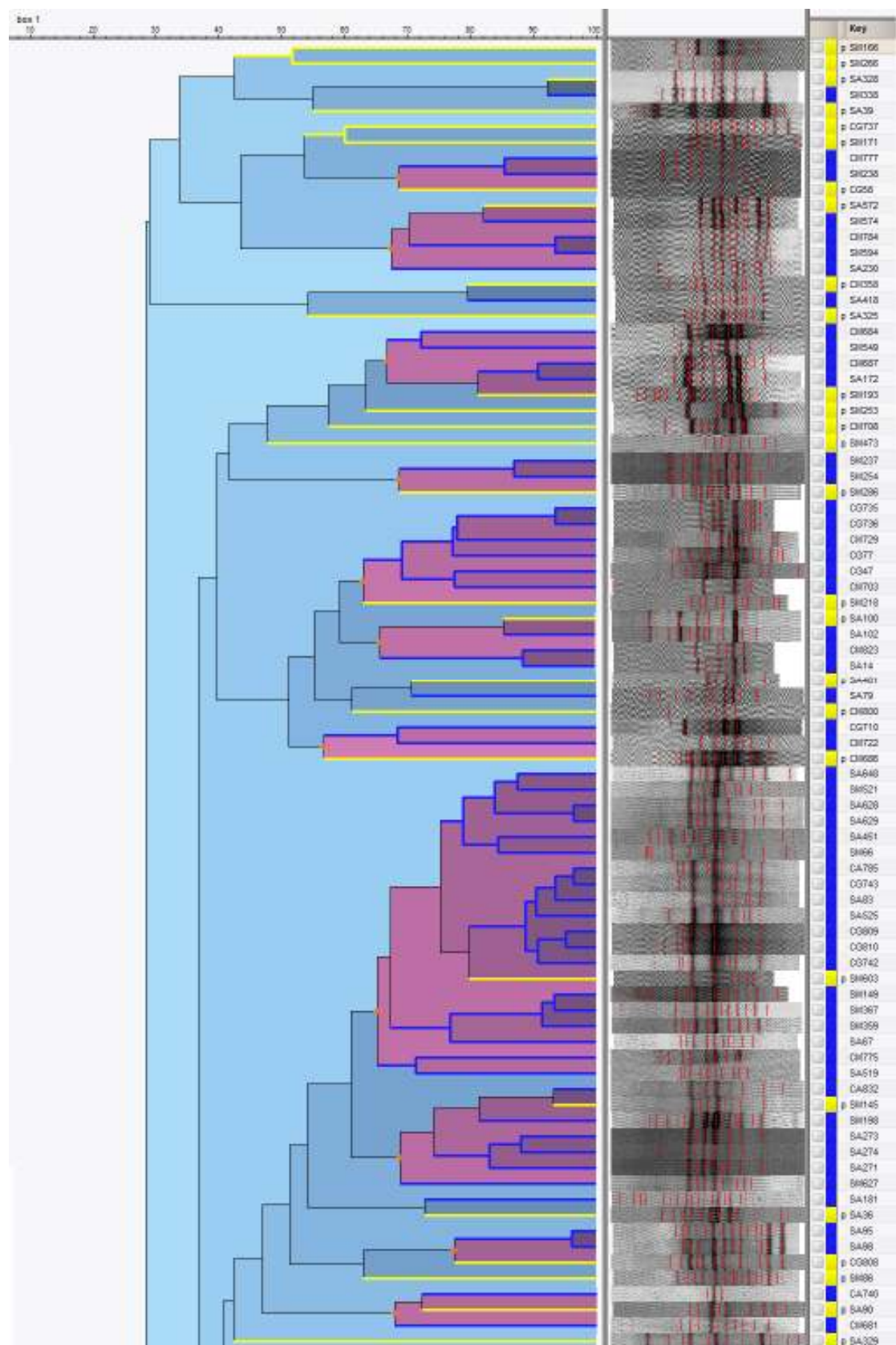


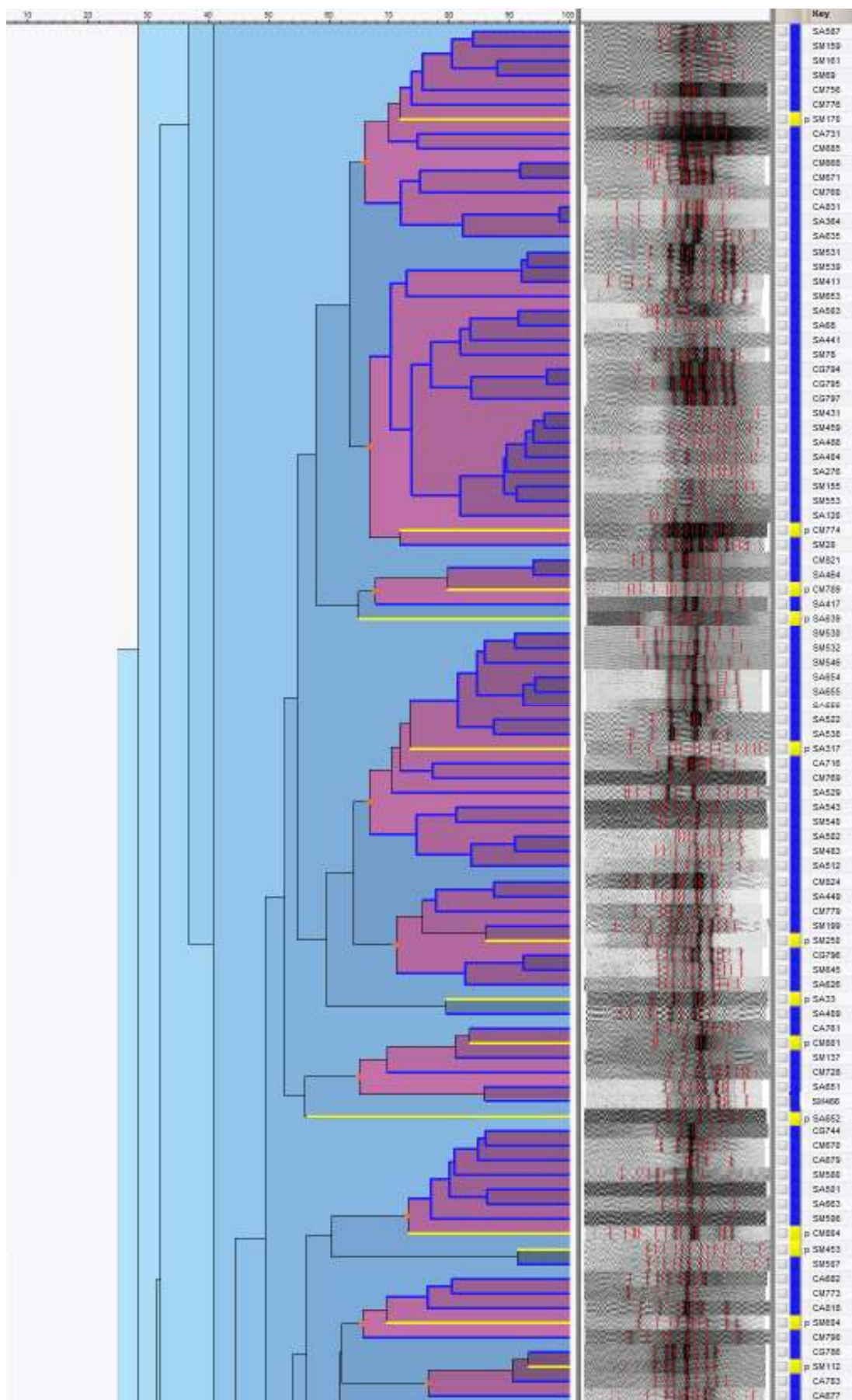
Εικόνα 3.2. Αριθμός απομονωθέντων στελεχών από ίζημα και καμινάδα με τη χρήση των 3 διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων Marine Agar, TYGA και τροποποιημένο GAA (m-GAA).

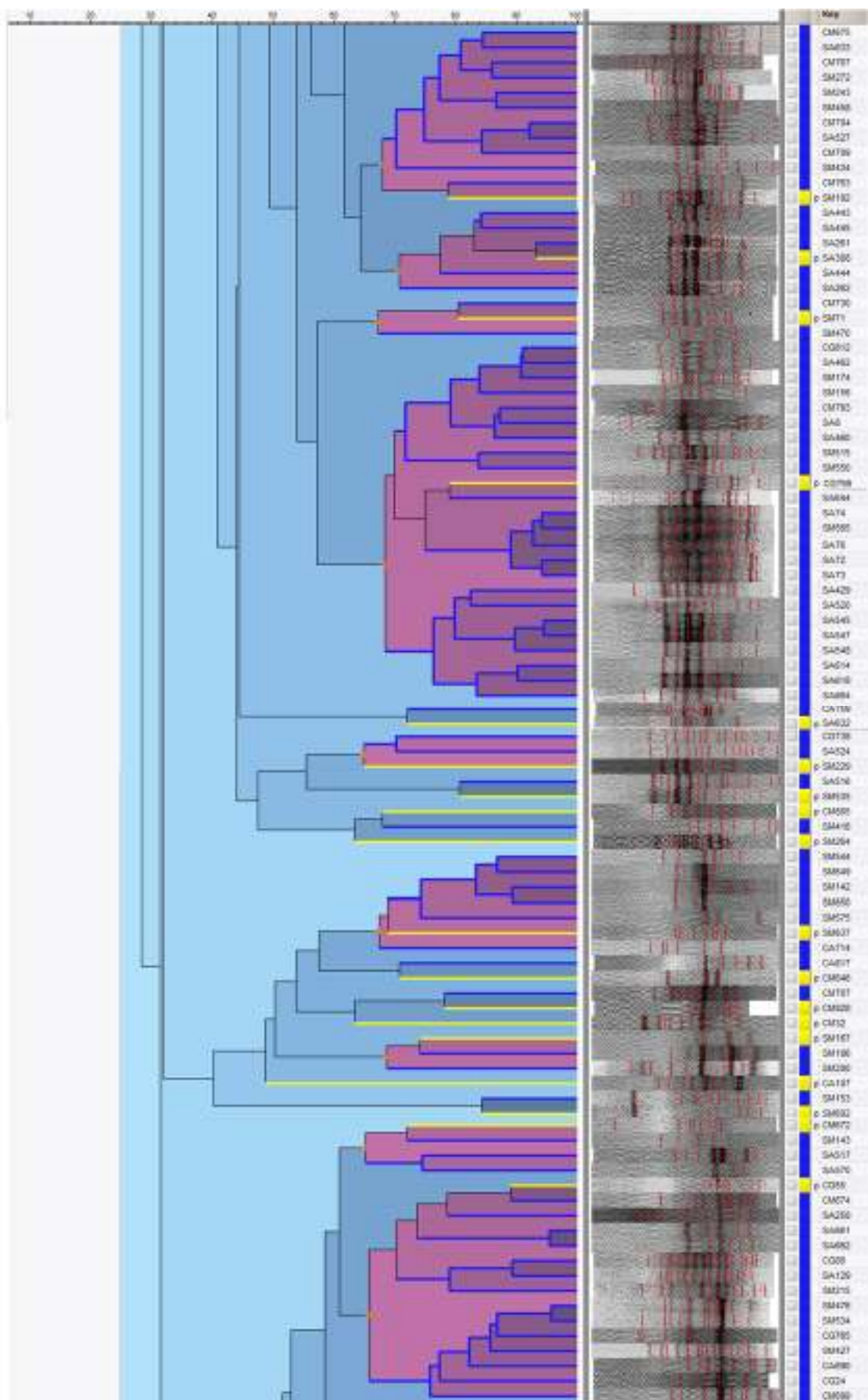
β) Διάκριση και ομαδοποίηση των απομονωθέντων στελεχών

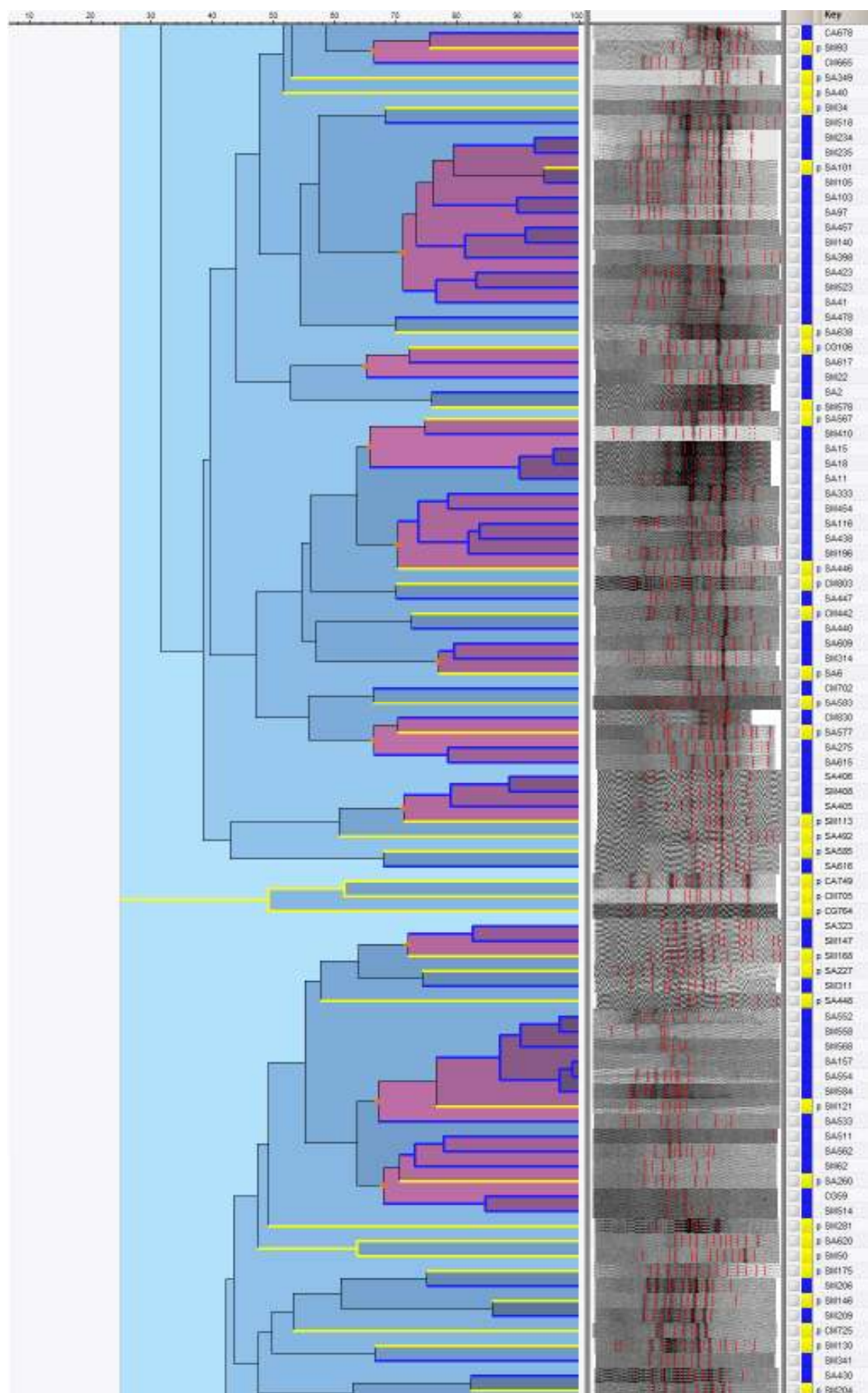
Οι απομονώσεις που προέκυψαν από όλα τα δείγματα, ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αντίδρασης BOX-PCR. Η μέθοδος αυτή απέδωσε σε διαχωριστική ικανότητα των απομονωθέντων στελεχών σε επίπεδο στελέχους. Τα πρότυπα που προέκυψαν είχαν από 3 έως 22 ζώνες με μέγεθος από 200 bp έως 10 kb. Από την ομαδοποίηση των 832 προτύπων BOX προέκυψαν 230 διαφορετικές αλληλουχίες BOX που αντιστοιχούν σε 230 διαφορετικά στελέχη (Εικ. 3.3.). Η πλειονότητα των διαφορετικών προτύπων απαντήθηκε κυρίως μία μόνο φορά (89 στελέχη), ενώ οι ομάδες που περιλάμβαναν ≥ 10 πρότυπα απαντήθηκαν 1 ή 2 φορές (Εικ. 3.4.).

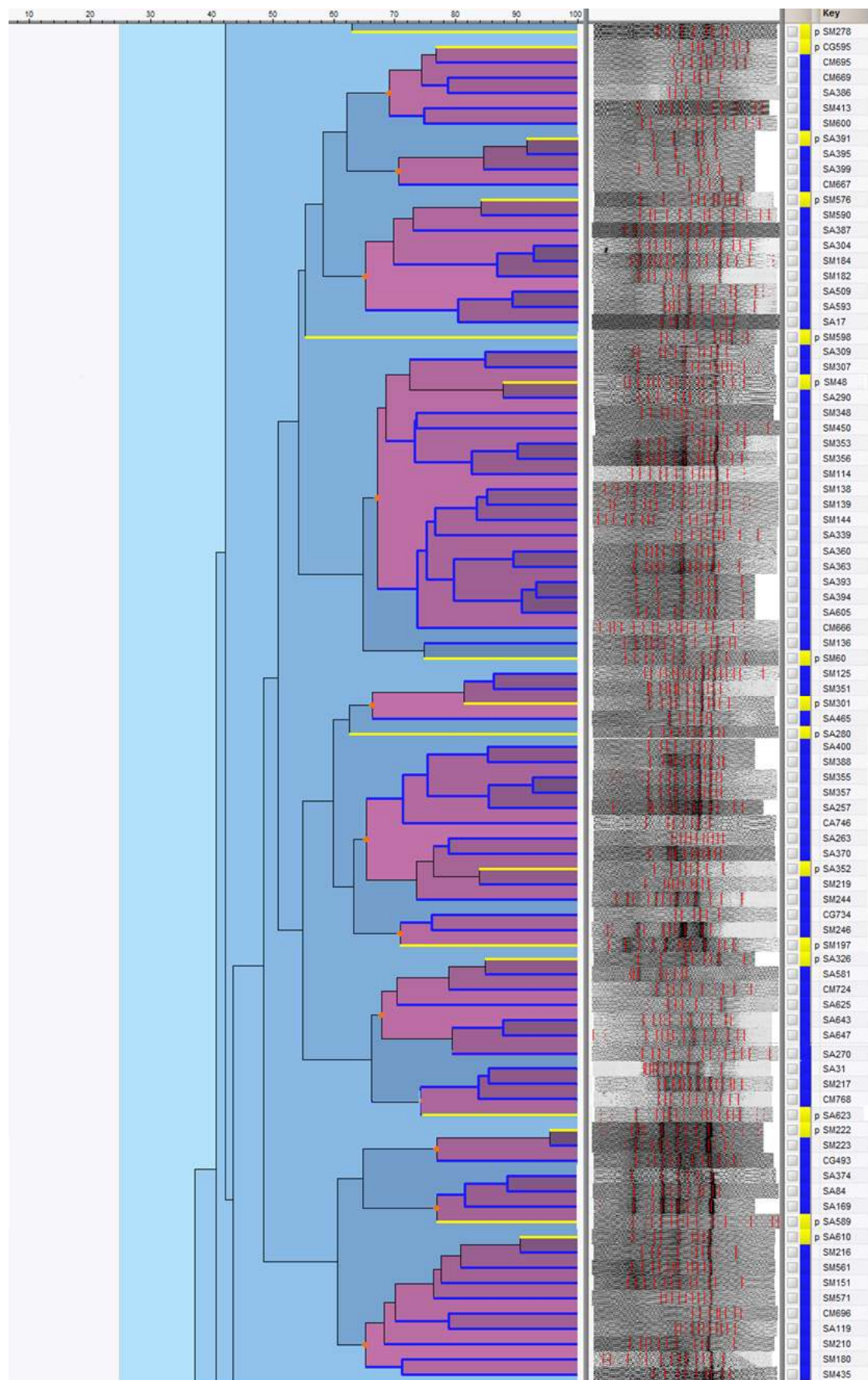
Οι μεγαλύτερες ομάδες περιλάμβαναν 20, 21, 24, 29 και 47 πρότυπα αντίστοιχα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε στελέχη απομονωμένα εξ' ολοκλήρου ή κυρίως από το δείγμα ιζήματος, ενώ κανένα από τα μεγαλύτερα clusters δεν περιείχε στελέχη που απομονώθηκαν από ένα μόνο είδος εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος. Εκτός από τα στελέχη που παρουσίασαν μοναδικά πρότυπα, πολλές ήταν οι ομάδες που περιείχαν μόνο 2 ίδια πρότυπα (59 ομάδες), ομάδες 3 προτύπων (20 ομάδες), 17 ομάδες από 4 πρότυπα το καθένα, 12 ομάδες από 5 στελέχη κ.ο.κ.

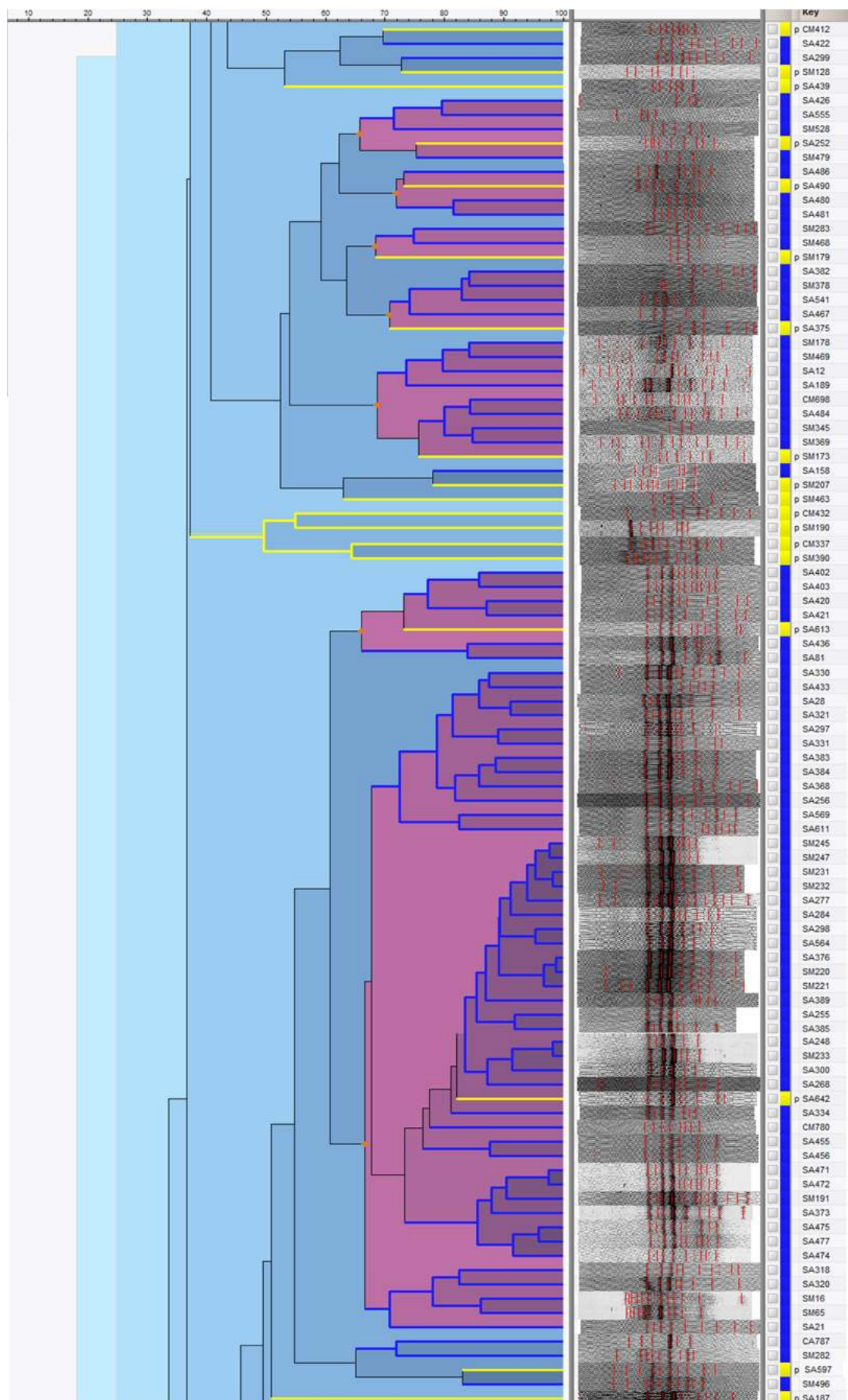


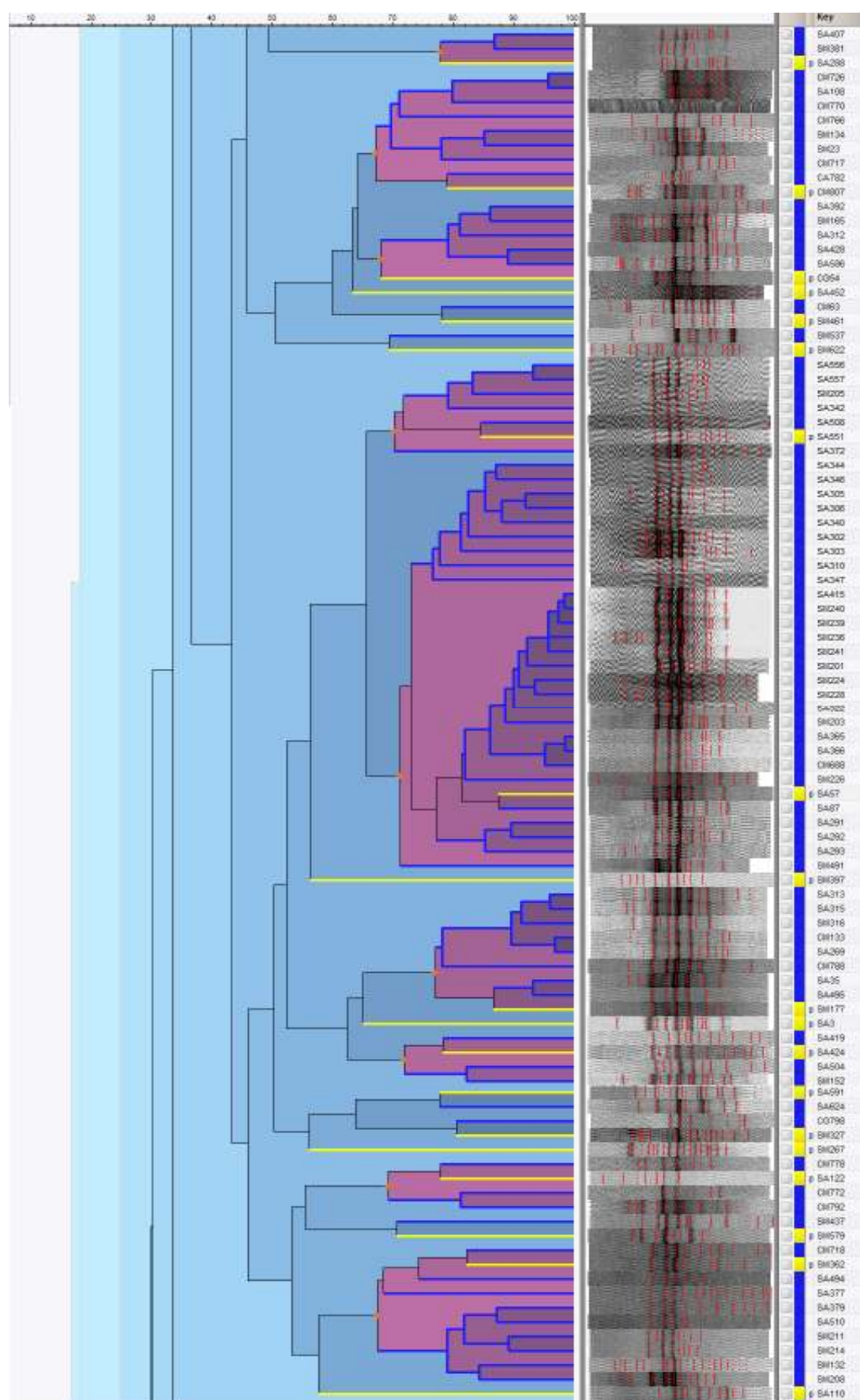


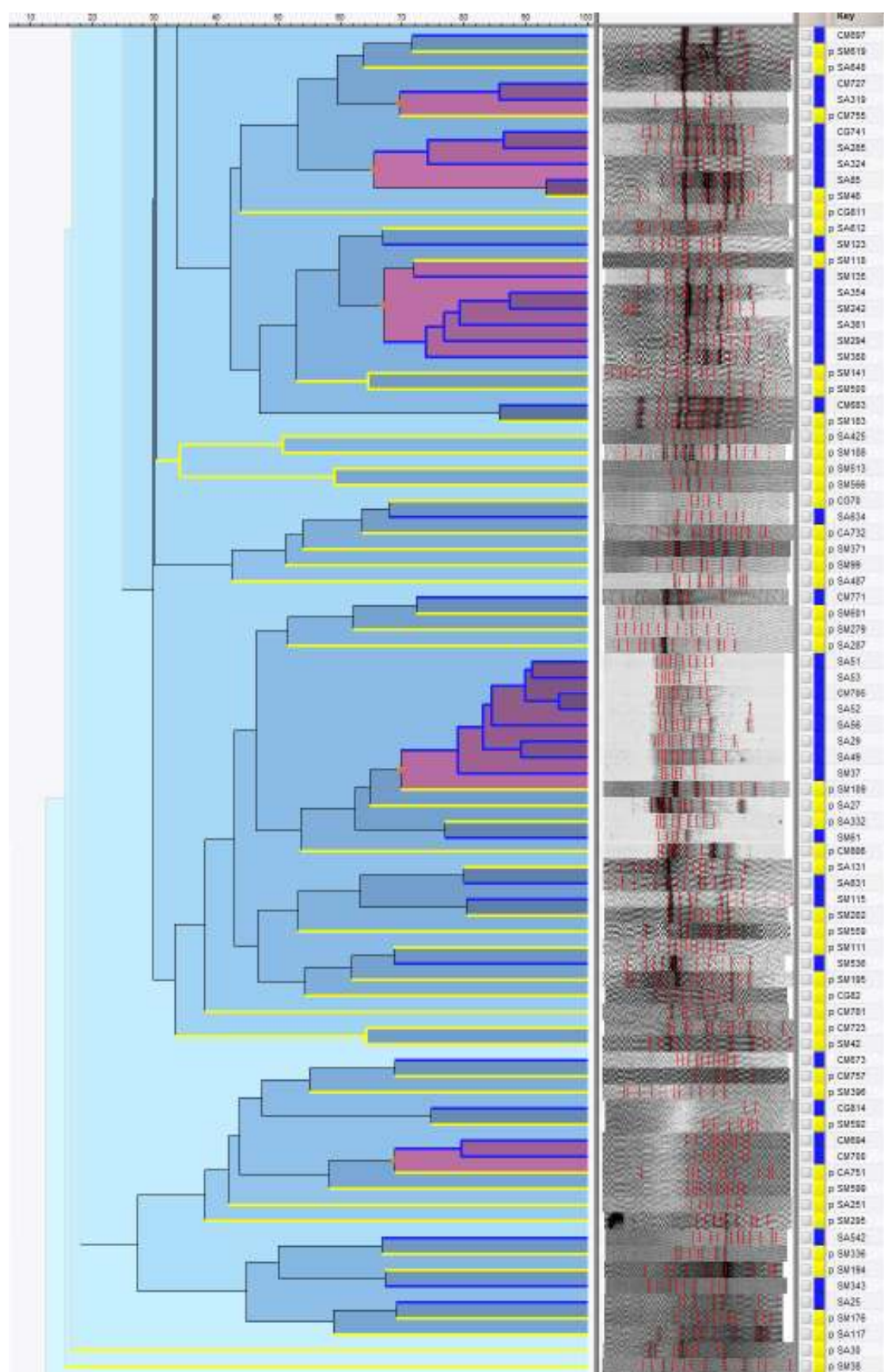


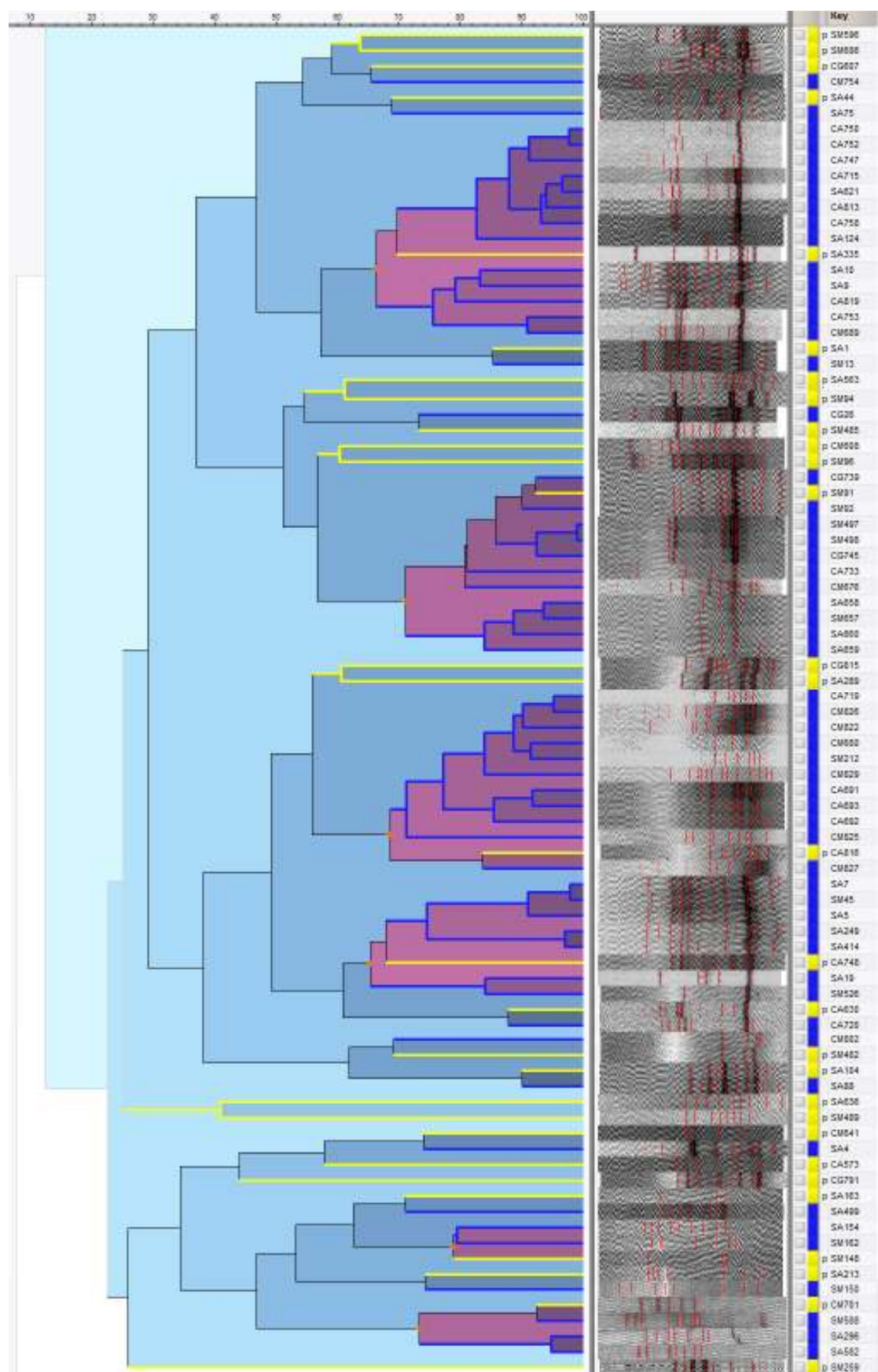


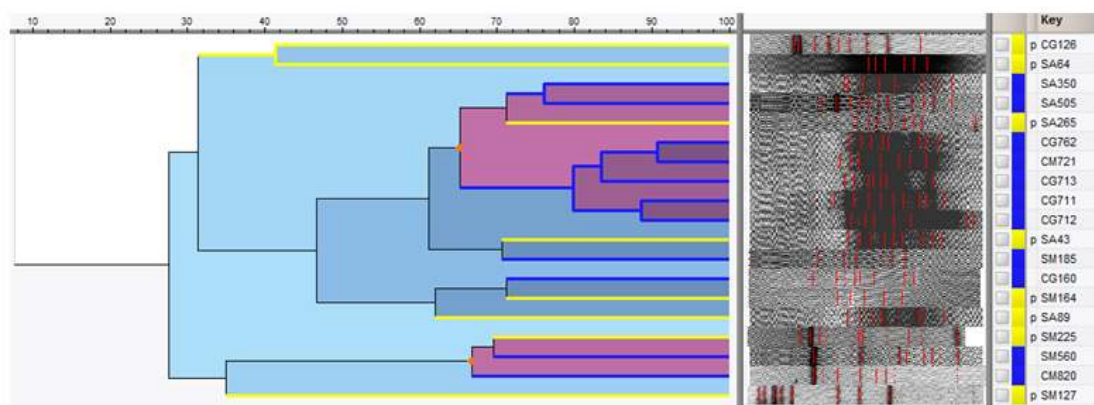




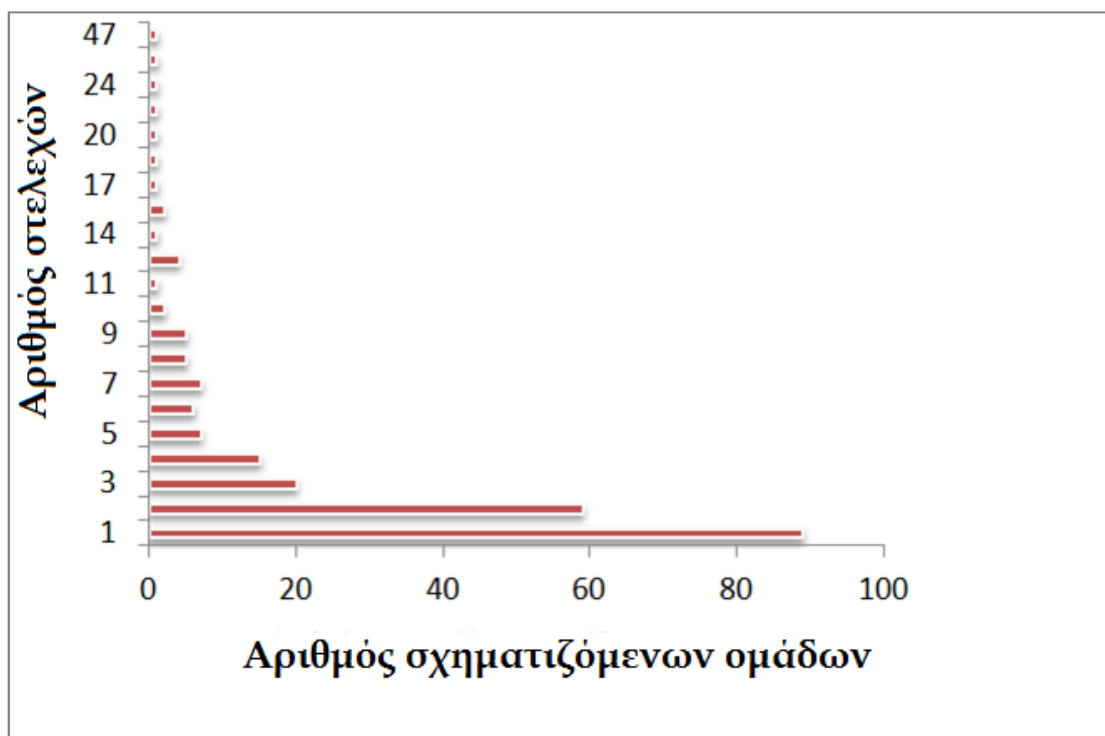








Εικόνα 3.3. Από αριστερά προς τα δεξιά: α) με μωβ χρώμα διακρίνονται όλες οι ομάδες αποτελούμενες από περισσότερα των 2 πρότυπα όπως προέκυψαν από την ομαδοποίηση των προτύπων BOX με τη μέθοδο UPGMA χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson και Cut Off Value 65 %. β) τα αντίστοιχα 832 πρότυπα αλληλουχίας BOX, προσαρμοσμένα στον ίδιο μοριακό μάρτυρα, με τονισμένες τις ενισχυμένες περιοχές DNA ανάμεσα στα στοιχεία BOX. γ) Με κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύονται τα 230 στελέχη που θεωρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα, με μπλε χρώμα τα υπόλοιπα που αποτελούν τα μέλη καθεμιάς από τις σχηματιζόμενες ομάδες. δ) Αναγράφονται οι κωδικοί των στελεχών.



Εικόνα 3.4. Διάγραμμα συσχέτισης των ομάδων που σχηματίστηκαν από την ανάλυση των αλληλουχιών BOX και του αριθμού προτύπων BOX που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα.

3.1.γ. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών βάσει της ανάλυσης αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου

Οι αλληλουχίες των πολυενεργών στελεχών συγκρίθηκαν με αλληλουχίες αναφοράς (16S rDNA reference sequences) που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank, με εξαίρεση τις αλληλουχίες από μη καλλιεργημένα δείγματα. Για την αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής R1492 (reverse). Κατά τη ευθυγράμμιση όλα τα στελέχη παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα με αλληλουχίες στελεχών κάποιες από τις οποίες είναι θαλάσσιας προέλευσης και αναγράφονται στον Πίνακα 3.1. Τα 42 στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν μοριακά βρέθηκαν να ανήκουν σε δύο φύλα και συγκεκριμένα στο φύλο Proteobacteria (γένη *Pseudomonas*, *Halomonas* και *Loktanella*) (αρνητικά κατά Gram) και στο φύλο Firmicutes γένος *Bacillus* (θετικά κατά Gram). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφάνισαν κοινά στοιχεία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά στα αερόβια και ετερότροφα στελέχη που έχουν απομονωθεί από υδροθερμικά πεδία τόσο ρηχής όσο και βαθιάς θάλασσας (Thornburg και συνεργάτες, 2010), (Mohandass και συνεργάτες, 2012).

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών των πολυενεργών στελεχών με τον αλγόριθμο BLAST.

Κωδικός στελέχους	Αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα %
S446	HG764632	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
S250	HG764623	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
S610	HG764641	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
C764	HG764647	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
C 47	HG764611	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
S601	HG764639	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
C705	HG764645	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
S 38	HG764610	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
S595	HG764638	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,9%
S463	HG764635	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	100%
C126	HG764618	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,9%
S104	HG764616	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,9%
S 36	HG764609	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,9%
S264	HG764625	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,9%
S252	HG764624	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%

(Συνέχεια του Πίνακα 3.1.)

S 71	HG764613	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
S 30	HG764608	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
S278	HG764626	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,8%
S163	HG764620	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	99,0%
S286	HG764627	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	98%
S301	HG764629	<i>Bacillus pumilus</i> NR_043242.1	98%
S572	HG764637	<i>Bacillus licheniformis</i> NR_074923.1	99,9%
S336	HG764630	<i>Bacillus licheniformis</i> NR_074923.1	99,8%
S122	HG764617	<i>Bacillus licheniformis</i> NR_074923.1	99,8%
C799	HG764648	<i>Bacillus megaterium</i> NR_074290.1	99,5%
C701	HG764644	<i>Bacillus safensis</i> NR_041794.1	100%
S141	HG764619	<i>Bacillus safensis</i> NR_041794.1	99,9%
S 99	HG764615	<i>Bacillus safensis</i> NR_041794.1	99,9%
S 396	HG764631	<i>Bacillus safensis</i> NR_041794.1	99,9%
S 93	HG764614	<i>Brevibacterium halotolerans</i> NR_042638.1	99,8%
C816	HG764643	<i>Bacillus subtilis</i> NR_075005.1	100%
C737	HG764646	<i>Bacillus subtilis</i> NR_075005.1	99,9%
S638	HG764642	<i>Bacillus subtilis</i> NR_075005.1	100%

(Συνέχεια του Πίνακα 3.1.)

S652	HG764607	<i>Bacillus subtilis</i> NR_075005.1	99,7%
S604	HG764640	<i>Bacillus halmapalus</i> NR_026144.1	99,5%
C54	HG764612	<i>Loktanella hongkongensis</i> NR_029121.1	99,3%
S453	HG764633	<i>Halomonas sulfidaeris</i> NR_027185.1	99,9%
S567	HG764636	<i>Pseudomonas moraviensis</i> NR_043314.1	99,7 %
S287	HG764628	<i>Pseudomonas moraviensis</i> NR_043314.1	97 %
S222	HG764622	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> NR_042191.1	99,8 %
S175	HG764621	<i>Pseudomonas moraviensis</i> NR_074599.1	99,5 %
S461	HG764634	<i>Pseudomonas moraviensis</i> NR_074599.1	99,6 %

Φύλο Proteobacteria

7 στελέχη ταξινομήθηκαν στο φύλο Proteobacteria και συγκεκριμένα 1 στέλεχος στην κλάση α -Proteobacteria και 6 στελέχη στην κλάση γ -Proteobacteria. Το στέλεχος που ανήκει στα α -Proteobacteria εμφάνισε υψηλή ομοιότητα 99,3% με το είδος *Loktanella hongkongensis*. Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Loktanella*, υπάγονται στον κλάδο *Roseobacter*, της κλάσης των α -πρωτεοβακτηρίων.

Το 1 από τα 6 στελέχη που ανήκουν στα γ -Proteobacteria, εμφάνισε 99,9% ομοιότητα με το είδος *Halomonas sulfidaeris* (οικογένεια Halomonadaceae, γένος *Halomonas*). Τα υπόλοιπα 5 στελέχη ανήκουν στην οικογένεια Pseudomonadaceae, γένος *Pseudomonas*. 1 από τα στελέχη αυτά εμφάνισε 99,8% ομοιότητα με το είδος *Pseudomonas psychrotolerans* και τα υπόλοιπα 4 εμφάνισαν ομοιότητα 97, 99,5, 99,6 και 99,7% με το είδος *Pseudomonas moraviensis*.

Φύλο Firmicutes

Από τα 42 στελέχη, τα 35 ανήκουν στο φύλο Firmicutes και συγκεκριμένα στην οικογένεια Bacillaceae, γένος *Bacillus*. Τα 35 αυτά στελέχη διαχωρίστηκαν φυλογενετικά σε 7 διακριτές ομάδες οι οποίες διέφεραν στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου τους. Η 1^η ομάδα αποτελείται από 21 στελέχη, τα οποία εμφάνισαν ομοιότητα από 98 έως 100 % με το είδος *Bacillus pumilus*. Η 2^η ομάδα περιλαμβάνει 4 στελέχη και παρουσίασε ομοιότητα 99,9 - 100 % με το είδος *Bacillus safensis*. Η 3^η ομάδα αποτελείται από 4 στελέχη τα οποία εμφάνισαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας 99,7-100% με το είδος *Bacillus subtilis*. Η 4^η ομάδα περιλαμβάνει 3 στελέχη τα οποία παρουσίασαν ομοιότητα 99,8 και 99,9% με στέλεχος του είδους *Bacillus licheniformis*. Η 5^η ομάδα αποτελείται από 1 στέλεχος το οποίο εμφάνισε ομοιότητα 99,5% με στέλεχος του είδους *Bacillus megaterium*, η 6^η ομάδα αποτελείται από 1 στέλεχος το οποίο εμφάνισε ομοιότητα 99,5% με το είδος *Bacillus halmapalus* και η 7^η περιλαμβάνει 1 στέλεχος με ομοιότητα 99,8% με το είδος *Brevibacterium halotolerans*.

3.1.δ. Τιμές ειδικού ρυθμού αύξησης ($\mu_{\max}$) και χρόνου διπλασιασμού (t_d) κλειστής καλλιέργειας των 42 επιλεγμένων στελεχών

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης κι ο χρόνος διπλασιασμού κλειστής καλλιέργειας υπολογίστηκαν για καθένα από τα ταυτοποιημένα στελέχη και οι τιμές του $\mu_{\max}$ ομαδοποιήθηκαν ανά είδος (Πίν. 3.2.)

Πίνακας 3.2. Τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης $\mu_{\max}$ των ταυτοποιημένων στελεχών καθώς και του χρόνου διπλασιασμού καλλιέργειας t_d κατά αύξοντα αριθμό μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους.

Είδος Στελέχους	Κωδικός Στελέχους	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	t_d (h)
<i>Bacillus pumilus</i>	S446	2,6	0,3
	S595	2,6	0,3
	S250	2,4	0,3
	S71	2,2	0,3
	S301	1,9	0,4

(Συνέχεια του Πίνακα 3.2.)

<i>Bacillus pumilus</i>	S252	1,9	0,4
	S278	1,8	0,4
	S601	1,4	0,5
	S610	1,2	0,6
	C764	1,1	0,6
	S163	1,1	0,6
	C705	1,1	0,7
	S286	1,0	0,7
	S30	1,0	0,7
	S463	1,0	0,7
	S104	1,0	0,7
	S38	0,9	0,7
	C126	0,9	0,8
	C47	0,9	0,8
	S36	0,9	0,8
	S264	0,7	1,0
<i>Bacillus licheniformis</i>	S572	1,3	0,5
	S336	1,2	0,6
	S122	0,8	0,9
<i>Bacillus safensis</i>	S99	2,4	0,3
	C701	1,4	0,5
	S141	1,0	0,7
	S396	0,8	0,9
<i>Bacillus subtilis</i>	C737	0,9	0,8
	C816	0,8	0,9
	S638	0,7	1,0
	S652	0,5	1,3

(Συνέχεια του Πίνακα 3.2.)

<i>Bacillus halmapalus</i>	S604	1,0	0,7
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	S93	1,0	0,7
<i>Bacillus megaterium</i>	C799	0,7	1,0
<i>Loktanella hongkongensis</i>	C54	0,8	0,9
<i>Halomonas sulphidaeris</i>	S453	0,7	0,9
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	S222	1,0	0,7
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	S287	1,1	0,7
	S461	0,9	0,8
	S567	0,4	1,9
	S175	0,3	2,0

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης $\mu_{\max}$ των στελεχών που ανήκουν στο γένος *Bacillus* είχε τιμές από $0,5 \text{ h}^{-1}$ (*B. subtilis*, στέλεχος S652) ως $2,6 \text{ h}^{-1}$ (*B. pumilus*, στελέχη S446 και S595) με χρόνους διπλασιασμού καλλιέργειας t_d 1,3 h και 0,3 h αντίστοιχα. Όσον αφορά στα πρωτεοβακτήρια, τόσο η μικρότερη όσο και η μεγαλύτερη τιμή του $\mu_{\max}$ και του χρόνου διπλασιασμού της καλλιέργειας παρατηρήθηκαν στα στελέχη S287 και S175 του είδους *Pseudomonas moraviensis* με t_d 0,7 h και 2,0 h αντίστοιχα.

3.1.ε. Παραγωγή βιοενεργών ενώσεων από τα 230 μοναδικά στελέχη

Από τα 230 μοναδικά στελέχη που εξετάστηκαν, τα 41 στελέχη δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη σε κανέναν από τους 18 μικροβιακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα υπόλοιπα 189 στελέχη (82 %) εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε τουλάχιστον έναν μικροβιακό δείκτη. Συγκεκριμένα, 34 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 1 μικροβιακού δείκτη, 33 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 2 μικροβιακών

δεικτών, 30 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 3 μικροβιακών δεικτών, 30 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 30 μικροβιακών δεικτών, 21 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 5 μικροβιακών δεικτών, 21 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 6 μικροβιακών δεικτών, 9 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 7 μικροβιακών δεικτών, 6 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 8 μικροβιακών δεικτών, 3 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 9 μικροβιακών δεικτών και 2 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 10 μικροβιακών δεικτών (Εικ. 3.5.).

Από τα 189 στελέχη με αντιμικροβιακή δράση, τα 24 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών, τα 3 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών και τα 26 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη νηματοειδών μυκήτων και ζυμών.

5 στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες και νηματοειδείς μύκητες ή/και ζύμες. 6 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών. 69 στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες και νηματοειδείς μύκητες ή/και ζύμες. 56 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών και νηματοειδών μυκήτων ή/και ζυμών.

Τα αποτελέσματα για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης των 230 μοναδικών στελεχών παραθέτονται στον Πίνακα 3.3. που ακολουθεί. Από τον παραπάνω Πίνακα φαίνεται ότι ανιχνεύθηκε αντιμικροβιακή δράση ενάντια και στους 18 μικροβιακούς δείκτες που εξετάστηκαν. Από τα 189 στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη των παραπάνω δεικτών, διαφορετικό ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης ανιχνεύθηκε ενάντια σε καθέναν ξεχωριστά από τους δείκτες (Εικ. 3.5.). Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην αντιμικροβιακή δράση ενάντια στους θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες, 19 % των στελεχών ανέστειλαν την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bacillus subtilis*, 33 % των στελεχών ανέστειλε την ανάπτυξη των ακτινοβακτηρίων *Micrococcus luteus* και *Kocuria rhizophila*, 36,5 % από τα 189 στελέχη εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον δείκτη *Staphylococcus aureus*, 25 % ενάντια στον δείκτη *Enterococcus faecalis* και 42 % στον δείκτη *Staphylococcus pneumoniae*.

Πίνακας 3.3. Βιοενεργότητα των απομονωθέντων στελεχών έναντι των 18 μικροβιακών δεικτών (η παύλα δηλώνει πως δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση).

Κωδικός απομονωθέντος στελεχούς	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΚΑΤΑ Gram							ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΘΕΤΙΚΟΙ ΚΑΤΑ Gram						ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ				
														ΝΗΜΑΤΟΕΙΔΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ			ΖΥΜΕΣ	
	<i>A. radioresistens</i>	<i>B. xenovorans</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>H. influenza</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. solanis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
S1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S30	3,8	—	—	2,2	2,8	—	—	—	2,8	4,8	—	2,4	—	—	—	2,6	4,8	—
S32	—	—	—	—	—	—	—	3,1	—	—	—	3,4	3,2	—	3,4	3,4	—	—
S33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	—	—	1,9	—	—	—	—	—
S34	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	—	1,7	—	—	—	—	2,7	—	—
S36	—	—	—	—	—	—	—	—	7,0	4,8	3,0	3,4	3,4	—	5,0	—	—	—
S38	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	4,6	2,0	2,1	2,0	2,6	4,0	2,0	—	2,0
S39	—	—	—	—	—	—	—	3,0	3,0	3,2	—	—	—	—	—	3,0	—	—
S40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	—	—	—
S43	2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5	—	—	—	—	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S46	1,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,5	1,8	—	—
C47	—	—	—	—	—	—	—	—	5,5	4,3	—	1,7	1,9	—	1,9	3,1	—	—
S48	—	—	—	—	2,0	—	—	—	—	—	—	2,2	2,0	—	2,7	—	—	2,5
S50	—	—	—	—	—	—	—	3,7	3,1	—	—	—	2,1	—	4,7	—	—	—
C54	3,2	2,8	3,2	—	—	3,2	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—	3,4	—	—
C55	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	1,8	—	2,0	—	—	1,6	—	2,2
C57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,9	—	1,7	—	—	—	—	—
C58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,9	—	—
S60	1,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	2,8	—	—
S64	2,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5	—	—	—	—	—	—	—
C70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	1,8	—	2,0	—	—	2,0
S71	2,8	2,6	2,8	2,8	3,0	—	—	—	6,0	—	2,6	2,8	—	—	—	3,4	—	—
S82	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	—	—	—	—	—	—	—
S86	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	—	2,0	2,0	—	—
S89	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	—	3,0	—	—
S90	1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,2	—	—	2,0
S91	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S93	3,7	—	3,7	—	—	—	—	—	4,9	4,3	—	3,7	3,9	—	6,5	—	—	—
S94	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	—	—	2,0	—	—
S99	2,3	—	—	—	—	—	—	3,6	4	—	2,2	—	—	—	2,4	2,2	—	—
S100	—	—	—	—	—	—	—	2,2	—	3,6	—	—	—	—	2,2	—	—	—
S101	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	2,2	—	—
S104	2,1	—	—	—	—	—	—	—	3,8	2,2	2,0	2,1	2,0	—	2,4	2,6	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

C106	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	—	—	3,2	—	—
S107	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,7	—	—	—	—	—	—	—
S109	—	—	—	—	—	—	—	1,7	1,8	3,0	—	—	—	—	—	—	—	—
S110	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	1,8	—	—	2,6	—	2,4
S111	4,6	—	—	—	—	—	—	—	4,6	3,6	—	—	—	—	—	3,0	—	—
S112	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,2	—	—	—	2,5	—	—	2,5
S113	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S118	—	—	—	—	—	—	—	—	2,3	—	—	—	1,9	—	—	1,7	—	—
S121	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	4,4	—	2,0
S122	—	—	—	—	—	—	—	2,5	4,4	7,0	—	2,7	2,5	—	5,0	3,0	—	—
C126	—	—	—	—	—	—	—	—	5,0	4,6	2,5	2,5	2,7	—	—	3,0	—	2,5
S127	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	—	—	—	3,0	—	—
S128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,6	—	4,0	3,0	—	—
S130	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	4,2	—	—
S131	—	—	—	—	—	—	—	4,0	4,0	—	2,4	—	—	—	2,5	—	—	—
S141	1,8	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	2,0	2,0	3,4	3,0	2,0	—
S145	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	—	2,0
S146	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	1,8	1,7	—	1,6	—	—	2,0	—	—
S148	1,8	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	1,9	—	1,8	—	—	2,4	—	—
S163	—	—	—	—	—	—	—	3,0	3,6	4,6	—	2,0	—	—	—	2,4	—	—
S164	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	4,4	—	—
S166	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S167	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,8	—	—
S168	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,2	—	—
S170	2,0	—	—	—	—	—	—	—	6,0	—	—	—	—	—	—	4,0	—	2,6
S171	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S173	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	3,2	—
S175	2,0	2,2	—	2,0	—	—	2,2	2,2	—	—	—	—	1,9	—	—	4,5	3,0	—
S176	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,7	2,7	2,5	—	—	—	3,3	2,5	—
S177	1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,5	—	—	—	—	—	3,6	—
S179	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	—	—	—	—	3,0	—
S183	2,8	—	—	—	—	—	—	—	3,0	—	—	—	—	—	—	3,0	3,6	—
S187	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S188	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S190	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S192	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	2,0	—	—	—	—	2,0	2,0	—
S193	—	—	—	—	—	—	—	—	4,4	3,4	—	—	2,5	—	—	—	4,6	—
S194	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	3,6	—	2,4	2,4	—	—	2,6	3,2	—
S195	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	—
S197	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S202	—	—	—	—	—	—	—	—	4,6	5,0	4,0	—	—	—	—	—	3,2	—
S204	—	—	—	—	—	—	—	4,0	—	—	—	—	1,8	—	—	2,0	2,4	—
S213	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—	2,0	—	—	—	2,0	—
S218	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,2	2,4	—	—	—	—	—	2,0	—
S222	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	—	—	2,5	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S225	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S227	2,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—	—	4,0	—	—	4,0
S229	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	4,8	—	2,6	2,6	—	—	—	—	—
S246	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	—	—	—	—	—
S250	3,5	—	—	3,4	—	—	—	—	5,0	—	—	3,4	3,6	—	—	3,2	—	—
S251	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S252	—	—	—	—	—	—	—	—	3,8	4,8	2,4	2,4	2,5	—	—	2,4	—	—
S253	5,0	—	—	3,5	—	—	—	—	—	4,0	—	3,4	3,4	—	—	4,8	—	—
S259	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S260	—	—	—	—	—	—	—	3,3	3,3	3,9	—	3,3	—	—	—	—	—	2,5
S264	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	2,5	3,0	3,2	3,0	—	—	2,4	—	—
S265	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	—	—
S266	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,4	—	—
S267	—	—	—	—	—	—	—	—	3,4	2,0	—	—	—	—	3,0	3,8	—	2,5
S278	—	—	—	2,8	—	—	2,8	2,7	—	—	2,8	—	2,8	3,0	4,2	3,0	4,8	—
S279	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—
S280	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S281	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S286	2,0	—	—	2,2	—	—	—	—	—	2,4	—	2,2	2,0	—	2,2	—	—	—
S287	2,9	—	—	—	—	—	—	2,9	2,7	2,7	2,9	—	3,0	—	—	3,1	—	—
S288	2,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	2,5	—	—	—	—	—
S289	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,3	—	3,1	—	—	—	2,1	—	—
S295	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S301	2,4	—	—	2,6	—	—	—	2,8	4,2	—	—	3,2	3,0	—	2,6	2,2	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S317	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,3	—	—	4,5	2,2	—	2,5
S325	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S328	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S326	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	—	—	—	—	—
S327	1,8	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	2,2	—	—	—	—	1,6	—	1,5
S329	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	3,5	2,0	1,9	—	—	—	—	—
S332	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8	—	—	—	—	2,4	—	—
S335	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	3,2	—	—
S336	2,6	—	2,4	2,4	—	—	—	3,6	4,0	—	4,0	3,5	3,5	—	3,0	3,6	—	—
S337	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	—	—
S352	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	—	—	—
S358	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	—	—	—
S362	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S371	—	—	—	—	—	—	—	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S375	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S390	—	—	—	—	—	—	—	—	3,4	—	3,0	—	—	—	—	2,4	—	—
S391	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S396	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,4	1,5	2,6	2,4	1,9	1,7
S397	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S401	—	—	—	—	—	2,0	—	—	3,4	—	2,6	—	2,8	—	3,0	—	—	—
S412	2,5	—	—	—	—	—	—	—	5,5	4,3	—	—	—	—	—	3,1	—	—
S424	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,8	3,6	—	—	—	—	—
S425	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S432	—	—	—	—	—	—	—	—	2,9	—	—	—	—	—	5,5	—	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S439	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S442	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,2	—	—	—	—	—	2,2	2,2	—
S445	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S446	2,8	—	2,2	—	—	—	—	—	—	6,8	3,4	3,6	3,0	—	—	2,4	—	3,0
S448	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S452	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,2
S453	—	—	—	—	—	—	—	—	5,8	5,2	—	4,0	3,8	—	—	2,1	—	—
S461	2,6	—	1,8	—	—	—	—	—	2,2	2,6	5,6	3,0	3,2	—	—	—	—	3,0
S463	2,5	—	—	—	—	—	—	—	5,6	4,0	5,0	—	4,0	—	—	3,0	—	—
S473	2,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,6	—	—	—	—	2,6	—	—
S482	—	—	—	—	—	—	—	—	5,0	5,0	—	—	—	—	—	4,0	2,0	—
S485	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,6	3,0	—
S487	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	4,1	—	—	—	—	—	—	—	—
S489	2,0	—	—	—	—	—	—	—	5,5	—	—	3,8	3,0	—	—	3,4	—	—
S490	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	3,0	—	—	3,8	—	—
S492	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S496	2,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	—	—	—	—	3,2	—	—
S500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,0	—	—	3,8	—	—
S513	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	2,2	2,0	—	—	—	—	4,0	1,2	—
S529	—	—	2,4	—	—	—	—	—	—	—	—	4,8	4,6	—	3,2	2,8	—	3,0
S535	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,9	—	—
S551	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	3,1	—	—	—	—	3,5	—	—	3,0
S559	4,5	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5
S563	—	—	—	—	—	—	—	—	3,0	4,6	—	—	3,0	—	3,2	—	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S566	—	—	—	—	—	—	—	3,0	—	—	—	2,8	—	—	—	—	—	—
S567	3,0	—	4,4	5,0	—	—	2,8	4,4	2,4	3,6	3,2	—	3,0	—	—	—	—	—
S572	—	—	—	—	—	—	—	7,2	9,2	7,6	—	5,5	4,5	—	4,0	3,6	—	—
S573	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,9	—	—
S576	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	—	—	—	—	—	—	—	—
S577	—	—	—	—	—	—	—	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S578	—	—	—	—	—	—	—	4,2	2,8	—	—	—	2,4	—	—	3,5	—	—
S579	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—	—	—	—	—	—
S583	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5
S585	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S589	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—	1,8	—	—	—	2,4	—	—	—
S591	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S592	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	—	—	—	—	—	—	—
S595	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,9	3,5	—	3,5	3,9	3,3	—	3,5
S596	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	2,6	2,8	—	—	—	3,2	—	—	3,0
S597	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S598	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S599	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,9	—	—	—	—	—	3,2	3,3	—
S601	3,2	—	—	3,4	—	—	—	—	4,4	—	4,2	—	4,0	—	—	4,4	—	—
S602	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,3	—	—
S603	—	—	—	—	—	—	—	—	3,4	—	5,5	—	—	—	5,0	—	—	—
S604	—	—	—	—	—	—	—	—	2,6	2,4	2,6	—	2,4	—	—	2,6	—	3,0
S605	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S606	1,8	—	—	—	—	—	—	—	2,4	—	—	—	—	—	2,6	4,0	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

S607	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,1	2,3	—	1,7	—	—	—
S608	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,2	—	—	—	—	—	—	—
S610	3,0	—	—	2,5	—	—	1,9	—	—	—	—	—	—	1,7	4,0	—	—	5,0
S612	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S613	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,2	—	—	—	—	3,2	—	—
S619	—	—	—	—	—	—	—	4,8	—	—	—	—	5,0	—	—	4,4	—	—
S620	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,0	—	2,8	—	3,0	2,4	—	—
S622	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S623	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5	2,7	—	—	—	2,5	2,2	—	—
S632	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S636	—	—	—	—	—	—	—	—	3,4	1,8	—	—	2,2	—	—	2,2	—	3,4
S637	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S638	—	—	—	—	—	—	—	—	4,2	3,6	5,6	3,6	3,2	—	—	2,2	—	3,4
S639	—	—	—	—	—	—	—	2,1	—	—	2,5	—	—	—	—	—	—	—
S640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,2	—	2,8	3,0	—	—	2,6	—	—
S641	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,1	—	—	—
S642	—	—	—	—	—	—	—	—	3,2	3,0	—	—	2,8	—	—	—	—	—
S646	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,7	—	—	—	—	2,3	—	—
S652	4,6	—	4,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,0	—	—	4,4	—	5,5
C672	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C686	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C701	1,6	—	—	—	—	—	2,4	4,0	5,2	—	—	—	—	—	4,4	—	—	4,2
C705	—	—	—	—	—	—	1,9	—	2,1	—	—	—	2,3	—	4,5	2,4	—	4,0
C708	—	—	—	—	—	—	—	—	4,0	—	3,4	—	—	—	—	—	—	—

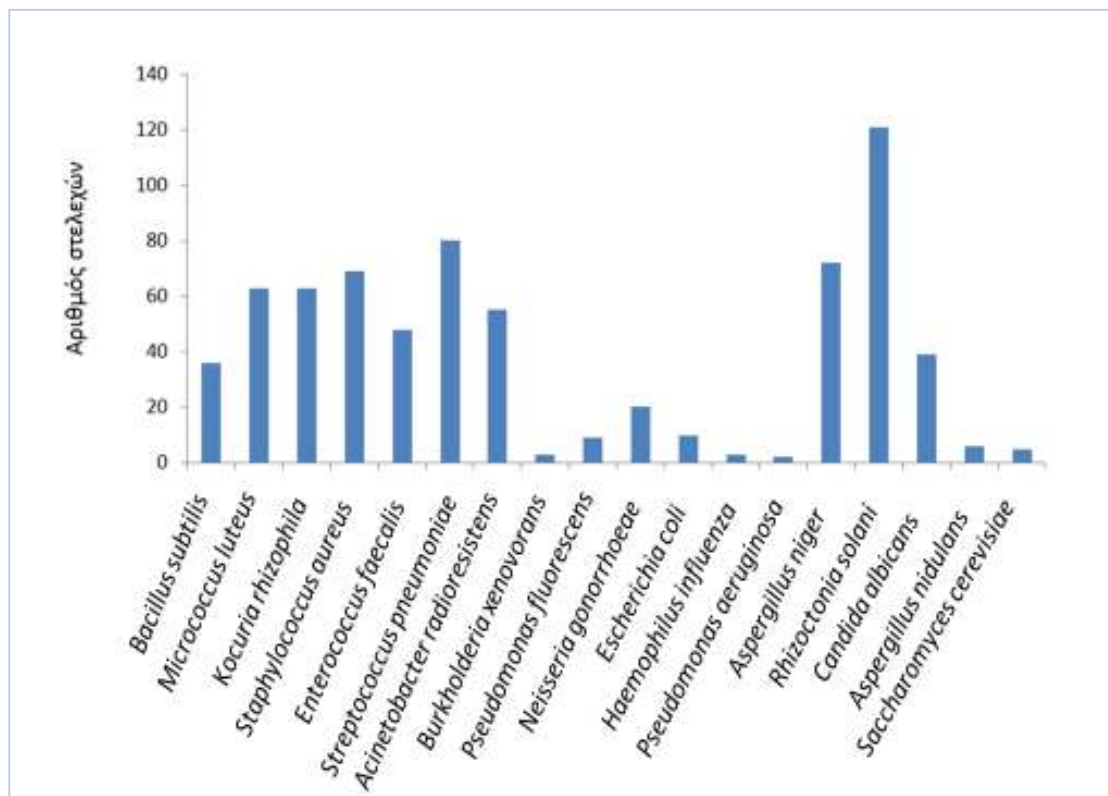
(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

C723	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,7	—	—	—
C725	—	—	—	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C732	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,4	1,8	—	—
C737	—	—	—	3,8	—	—	3,8	—	—	—	3,7	—	—	5,5	8,5	4,9	—	4,1
C738	—	—	—	2,4	—	—	—	—	5,8	4,2	—	—	3,0	—	2,8	—	—	—
C749	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,2	—	—	—	—	—
C751	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C755	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C757	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C764	—	—	—	2,6	—	—	3,0	3,2	2,8	—	—	2,6	2,2	—	—	3,1	—	—
C774	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—	—
C781	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C789	—	—	—	2,2	—	—	—	—	—	—	2,8	—	—	—	—	4,0	—	—
C791	—	—	—	—	—	—	—	—	7,3	—	—	—	1,9	—	—	—	—	—
C798	—	—	—	—	—	—	3,8	—	—	—	—	—	2,0	—	2,6	2,4	—	2,2
C799	—	—	—	2,6	—	—	—	—	5,0	4,2	—	4,0	3,8	—	—	—	—	—
C800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,4	—	—	—	—	4,0	—	—
C801	—	—	—	—	—	—	—	3,0	3,5	2,5	2,5	—	2,7	—	—	2,1	—	—
C803	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,7	—	—	2,3	—	—	2,1	—	—
C804	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,8	—	—
C805	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,7	—	—
C806	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C811	—	—	—	2,2	—	—	—	—	3,1	3,7	3,7	—	3,5	—	—	—	—	—
C815	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	—	—	2,0	—	—

(Συνέχεια του Πίνακα 3.3.)

C816	1,9	—	—	2,5	—	—	2,7	3,7	—	4,5	—	3,7	3,5	—	4,5	4,0	—	3,5
C827	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5	—	—	—	2,1	—	—	3,9	—	3,1
C828	—	—	—	—	—	—	—	—	1,9	2,9	—	2,5	—	—	—	—	—	—

Όσον αφορά στην αντιμικροβιακή δράση ενάντια στους αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες, 30 % ανέστειλε την ανάπτυξη του δείκτη *Acinetobacter radioresistens*, 1,6 % του δείκτη *Burkholderia xenovorans*, 5 % του δείκτη *Pseudomonas fluorescens*, 11 % του δείκτη *Neisseria gonorrhoeae*, 5,3 % του δείκτη *Escherichia coli*, 1,6 % του *Haemophilus influenza* και 1,1 % του δείκτη *Pseudomonas aeruginosa*.



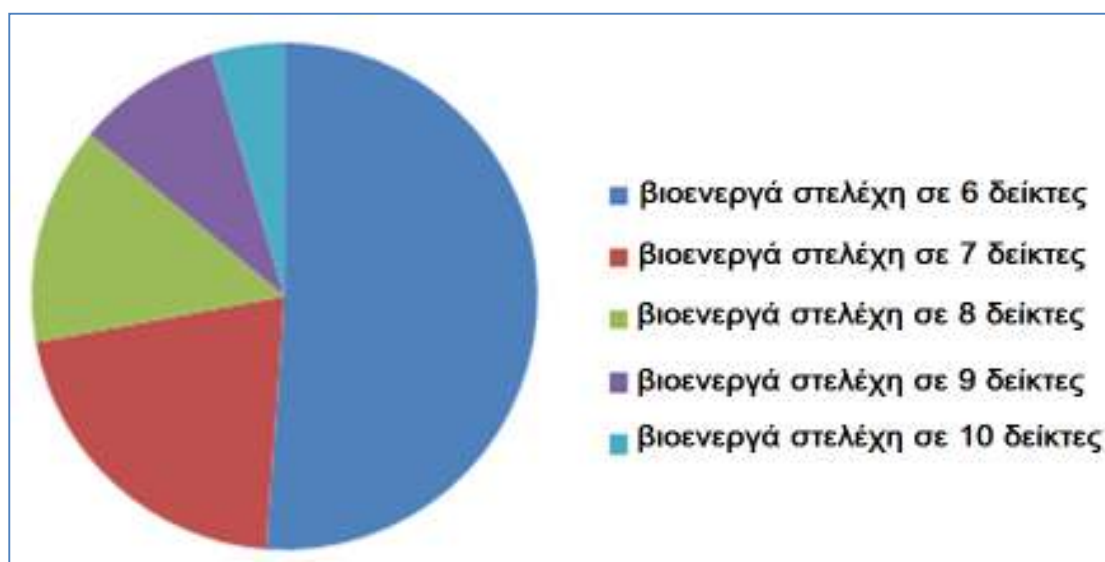
Εικόνα 3.5. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων στελεχών ενάντια σε καθέναν από τους 18 μικροβιακούς δείκτες.

Το ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης ήταν διαφορετικό και μεταξύ των ευκαρυωτικών δεικτών που εξετάστηκαν. 38 % από τα στελέχη με αντιμικροβιακή δράση ανέστειλε την ανάπτυξη του δείκτη *Aspergillus niger*, 64 % του δείκτη *Rhizoctonia solani*, 20,6 % του δείκτη *Candida albicans*, 3,2 % του δείκτη *Aspergillus nidulans* και 3 % του δείκτη *Saccharomyces cerevisiae*.

Από την Εικόνα 3.5. φαίνεται ότι οι πιο συχνοί στόχοι αντιμικροβιακής δράσης των βακτηρίων ήταν οι νηματοειδείς μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Aspergillus niger* και ο θετικός κατά Gram βακτηριακός δείκτης *Streptococcus pneumoniae*. Αντίθετα πολύ μικρός αριθμός βακτηρίων ανέστειλε την ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram

βακτηριακών δεικτών *Burkholderia xenovorans*, *Haemophilus influenza* και *Pseudomonas aeruginosa* καθώς και των ευκαρυωτικών δεικτών *Aspergillus nidulans* και *Saccharomyces cerevisiae*.

Τα 42 από τα 189 στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ήταν πολυενεργά και συγκεκριμένα τα στελέχη S36, C47, C54, S99, S163, S222, S250, S252, S264, S286, S396, S453, S463, S595, S601, S604, S610, C652, C701, C705, C799 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι 6 δεικτών. Τα στελέχη S93, S122, C126, S141, S287, S572, S638, C737, C764 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι 7 δεικτών. Τα στελέχη S30, S104, S175, S301, S446, S461 έναντι 8 δεικτών, τα στελέχη S38, S71, S278, S567 έναντι 9 δεικτών και τέλος τα στελέχη S336 και C816 έναντι 10 δεικτών (Εικ. 3.6.).

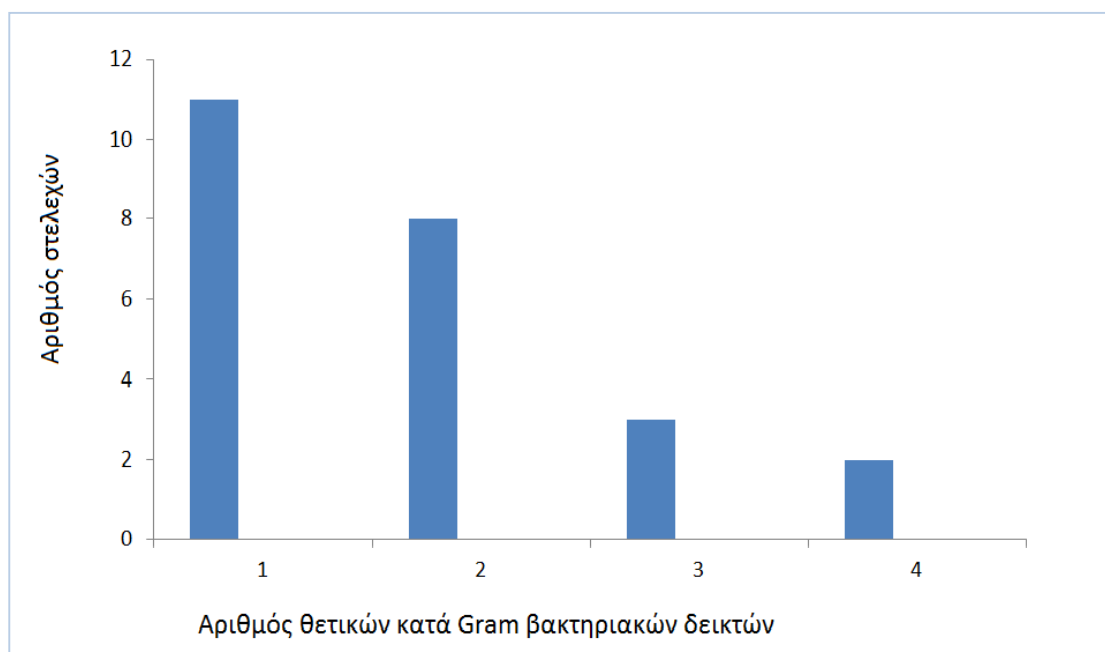


Εικόνα 3.6. Απομονωθέντα στελέχη βακτηρίων που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ταυτόχρονα έναντι 6, 7, 8, 9 ή και 10 μικροβιακών δεικτών.

Το μεγαλύτερο μέρος από τα πολυενεργά στελέχη εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι 6 μικροβιακών δεικτών, ενώ ο αριθμός των πολυενεργών στελεχών μειώνεται (9, 6, 4, 2) καθώς αυξάνεται ο αριθμός των μικροβιακών δεικτών (7, 8, 9, 10). 26 από τα 42 πολυενεργά στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι και στις 3 κατηγορίες μικροβιακών δεικτών (βακτηρίων, θετικών και αρνητικών κατά Gram και μυκήτων).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παραθέτονται στον Πίνακα 3.3., από τα 230 μοναδικά στελέχη, τα 24 ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών

δεικτών. 29 % από τα 24 αυτά στελέχη, βρέθηκαν βιοενεργά ως προς τον δείκτη *Bacillus subtilis*, 25 % στον δείκτη *Micrococcus luteus*, 29 % στον δείκτη *Kocuria rhizophila*, 45,8 % στον δείκτη *Staphylococcus aureus*, 17 % στον δείκτη *Enterococcus faecalis* και 33 % στον δείκτη *Streptococcus pneumonia* (Εικ. 3.7.).

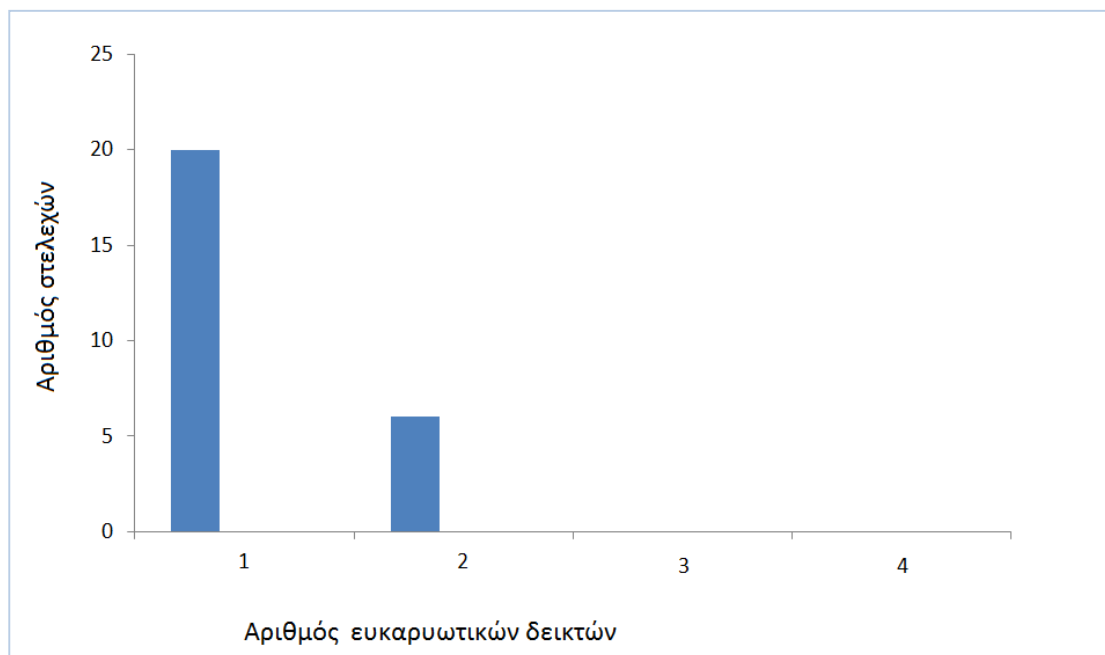


Εικόνα 3.7. Αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός ή περισσότερων θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών.

Στην Εικόνα 3.7. φαίνεται ότι από τα 24 συνολικά αυτά στελέχη, τα 11 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη ενός θετικού κατά Gram βακτηριακού δείκτη, τα 8 στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε 2 θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες, τα 3 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη 3 θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών και τα 2 στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε 4 θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παραθέτονται στον Πίνακα 3.3., τα 3 από τα 230 μοναδικά στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών. Συγκεκριμένα, 2 από τα 3 αυτά στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον αρνητικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη *Acinetobacter radioresistens* και 1 στέλεχος ανέστειλε την ανάπτυξη του αρνητικού κατά Gram βακτηριακού δείκτη *Neisseria gonorrhoeae*. Δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη εμφάνιση αντιμικροβιακής δράσης σε παραπάνω από έναν δείκτη.

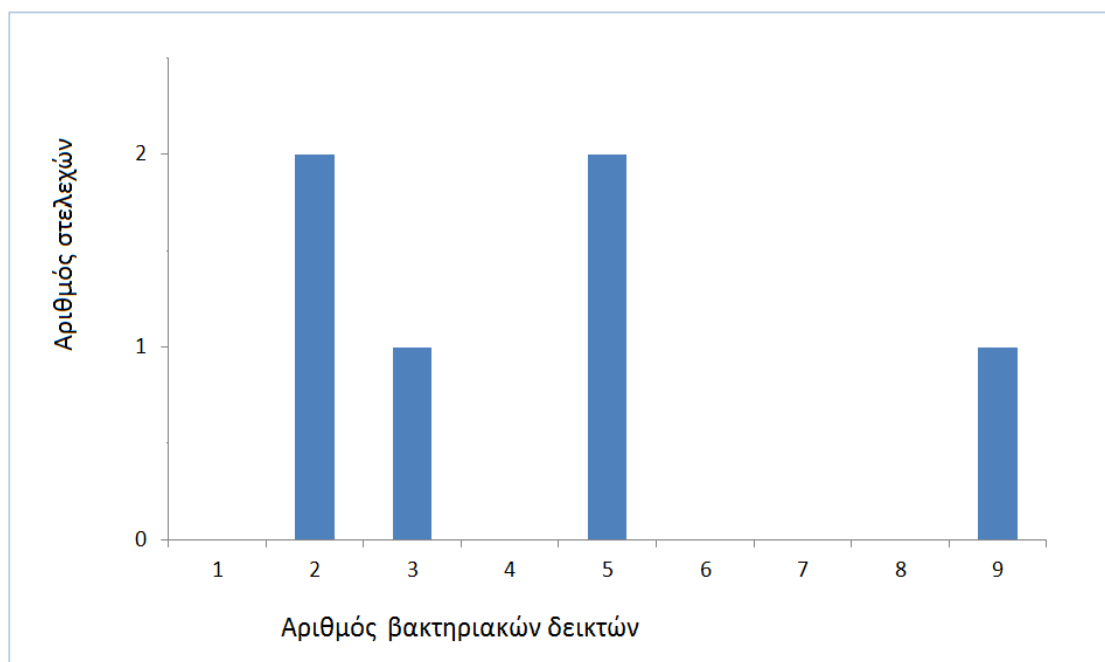
Από τον Πίνακα 3.3. παρατηρείται ότι τα 26 από τα 230 συνολικά μοναδικά στελέχη που εξετάστηκαν, ανέπτυξαν αντιμυκητιακή δράση ενάντια μόνο σε νηματοειδείς μύκητες και ζύμες. Από αυτά τα 26 στελέχη, το 37 % ήταν βιοενεργά έναντι του δείκτη *Aspegillus niger*, το 59 % στον δείκτη *Rhizoctonia solani* και το 7,4 % στον δείκτη *Candida albicans*, ενώ ένας μικρός αριθμός από τα παραπάνω στελέχη ανέστειλε ταυτόχρονα την ανάπτυξη 2 ευκαρυωτικών μικροβιακών δεικτών (Εικ. 3.8.).



Εικόνα 3.8. Βιοενεργότητα των στελεχών έναντι ευκαρυωτικών δεικτών.

Από την Εικόνα 3.8. προκύπτει ότι τα περισσότερα από τα 26 στελέχη ανέπτυξαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε έναν μόνο ευκαρυωτικό δείκτη εκτός από 6 στελέχη που ήταν δραστικά ταυτόχρονα ενάντια σε 2 ευκαρυωτικούς δείκτες.

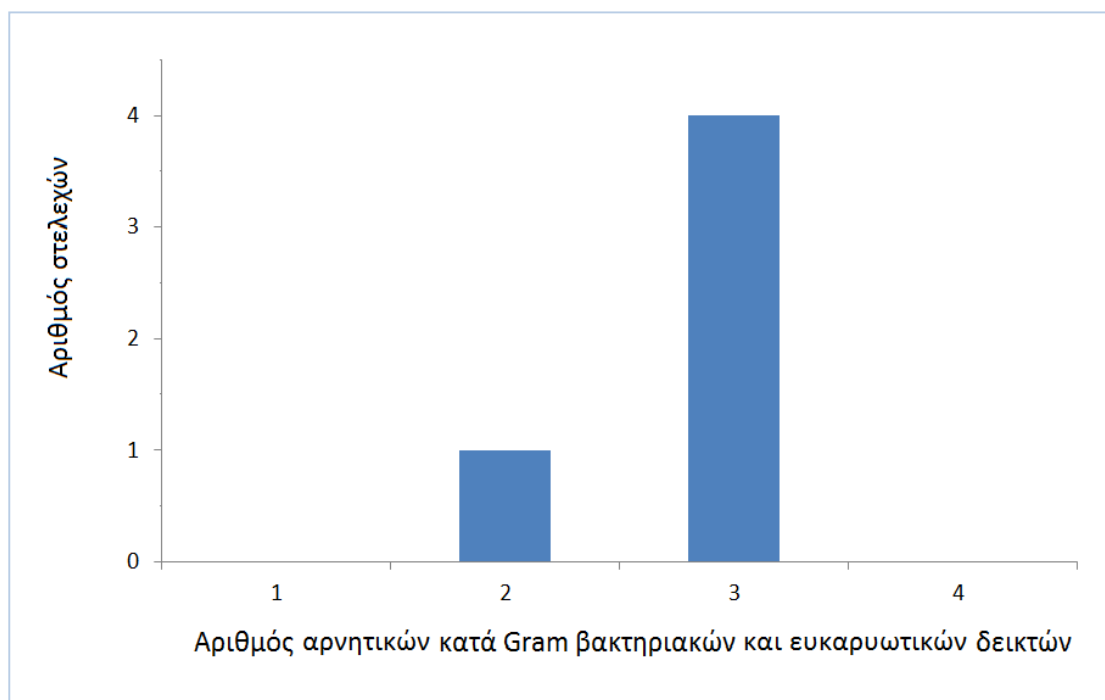
Στον Πίνακα 3.3. παρατηρείται επίσης η αντιμικροβιακή δράση που παρουσίασαν 6 από τα 230 μοναδικά στελέχη, έναντι θετικών και αρνητικών βακτηριακών δεικτών (Εικ. 3.9.). 4 από τα 6 στελέχη ανέπτυξαν αντιμικροβιακή δράση έναντι στον δείκτη *Acinetobacter radioresistens*, 4 στελέχη εμπόδισαν την ανάπτυξη του δείκτη *Streptococcus pneumonia*, 3 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη των δεικτών *Neisseria gonorrhoeae*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* και 1 στέλεχος ανέστειλε την ανάπτυξη των δεικτών *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis*.



Εικόνα 3.9. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων στελεχών ενάντια σε θετικούς και αρνητικούς βακτηριακούς δείκτες.

Στην Εικόνα 3.9. φαίνεται η ταυτόχρονη αντιμικροβιακή δράση σε παραπάνω από έναν βακτηριακούς δείκτες. Η ταυτόχρονη αντιμικροβιακή δράση έναντι 9 βακτηριακών δεικτών από το πολυενεργό στέλεχος S567 παρατηρήθηκε ενάντια στους αρνητικούς κατά Gram δείκτες *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* και *Neisseria gonorrhoeae* και στους θετικούς κατά Gram δείκτες *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus pneumonia*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3. από τα 230 μοναδικά στελέχη, τα 5 εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι ευκαρυωτικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών με ταυτόχρονη δράση έναντι 2 ή 3 μικροβιακών δεικτών (Εικ. 3.10.). Συγκεκριμένα, 1 στέλεχος ήταν βιοενεργό έναντι στον δείκτη *Neisseria gonorrhoeae*, 2 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη του δείκτη *Rhizoctonia solani*, 3 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη του δείκτη *Candida albicans*, 4 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη των δεικτών *Acinetobacter radioresistens* και *Aspergillus niger*.

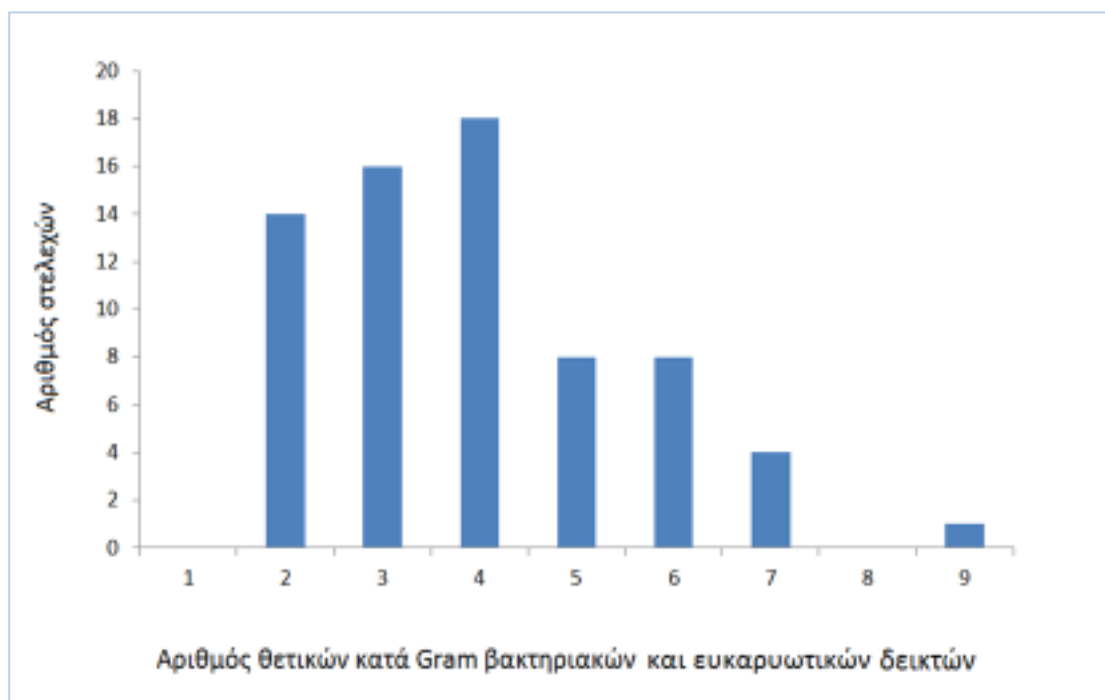


Εικόνα 3.10. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων στελεχών έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών δεικτών.

Στην Εικόνα 3.10. φαίνεται η ταυτόχρονη βιοενεργή δράση των βακτηριακών στελεχών σε 2 και σε 3 μικροβιακούς δείκτες. Στην πλειοψηφία τους τα στελέχη εμφάνισαν ταυτόχρονη αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε έναν αρνητικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη και 2 ευκαρυωτικούς δείκτες.

Από τα 189 μοναδικά στελέχη με αντιμικροβιακή δράση, τα 69 στελέχη ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών δεικτών (Εικ. 3.11.). 26 % ήταν βιοενεργά έναντι του δείκτη *Bacillus subtilis*, 43,5 % έναντι των δεικτών *Micrococcus luteus* και *Aspergillus niger*, 48 % στον δείκτη *Kocuria rhizophila*, 45 % στον δείκτη *Staphylococcus aureus*, 32 % στον δείκτη *Enterococcus faecalis*, 50,7 % στον *Streptococcus pneumoniae*, 2,9 % στον *Aspergillus nidulans*, 82,6 % στον *Rhizoctonia solani*, 1,45 % στον *Saccharomyces cerevisiae* και 20,3 % στον δείκτη *Candida albicans*.

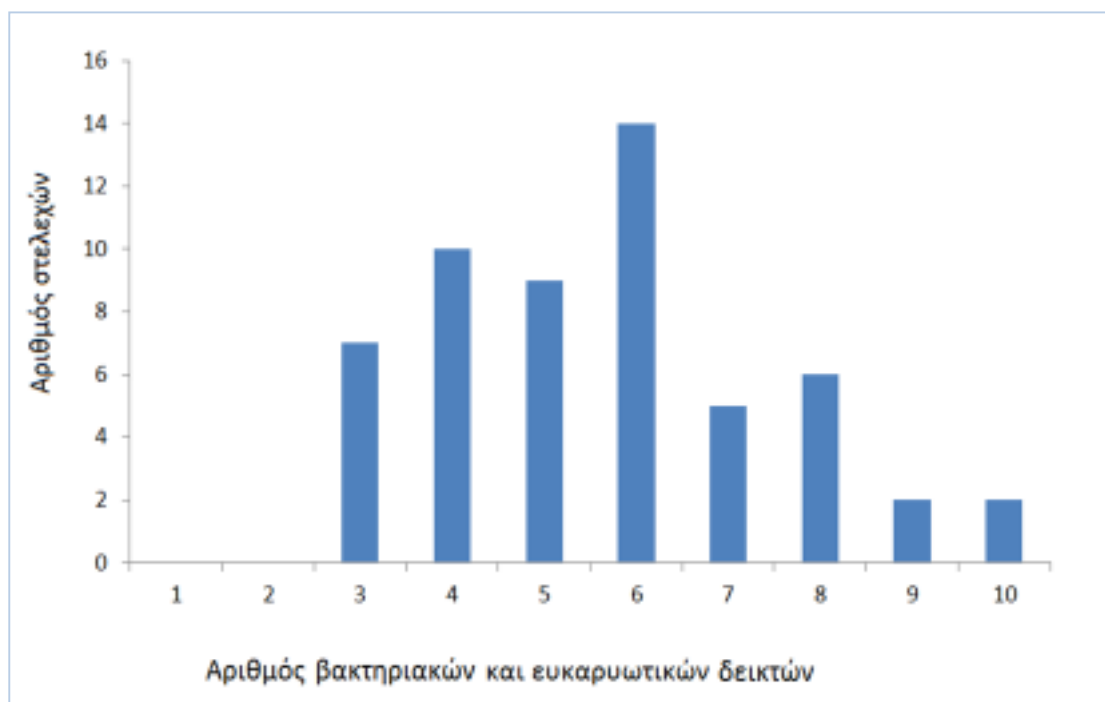
Στην Εικόνα 3.11. παρατηρείται η ταυτόχρονη βιοενεργή δράση έναντι θετικών κατά Gram και ευκαρυωτικών δεικτών. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα μοναδικά στελέχη, 14 από τα οποία είναι πολυενεργά, εμφανίζοντας ταυτόχρονη δράση σε 6, 7 και 9 μικροβιακούς δείκτες.



Εικόνα 3.11. Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων στελεχών έναντι θετικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών δεικτών.

Στον Πίνακα 3.3. παρατηρείται ότι 56 από τα 230 μοναδικά στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ταυτόχρονα σε θετικούς και αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς και ευκαρυωτικούς δείκτες και μάλιστα πολλά από αυτά τα στελέχη είναι πολυενεργά (Εικ. 3.12.). 82 % ήταν βιοενεργά έναντι του δείκτη *Acinetobacter radioresistens*, 5,3 % έναντι σους δείκτες *Burkholderia xenovorans*, *Haemophilus influenza*, *Aspergillus nidulans* και *Saccharomyces cerevisiae*. 14,3 % ήταν βιοενεργά έναντι στους δείκτες *Pseudomonas fluorescens* και *Escherichia coli*, 30,4 % στον δείκτη *Neisseria gonorrhoeae*, 3,6 % στον δείκτη *Pseudomonas aeruginosa*, 19,6 % στον *Bacillus subtilis*, 44,6 % στους *Micrococcus luteus* και *Staphylococcus aureus*, 35,7 % έναντι στους δείκτες *Kocuria rhizophila* και *Enterococcus faecalis*, 58,9 % στον δείκτη *Streptococcus pneumoniae*, 48,2 % έναντι του δείκτη *Aspergillus niger*, 75 % έναντι του δείκτη *Rhizoctonia solani* και 33,9 % στον δείκτη *Candida albicans*.

Στην Εικόνα 3.12. φαίνεται η αντιμικροβιακή δράση σε 3 έως 10 μικροβιακούς δείκτες. 29 από τα 56 στελέχη ήταν πολυενεργά και ανέστειλαν την ανάπτυξη 6 με 10 μικροβιακών δεικτών.

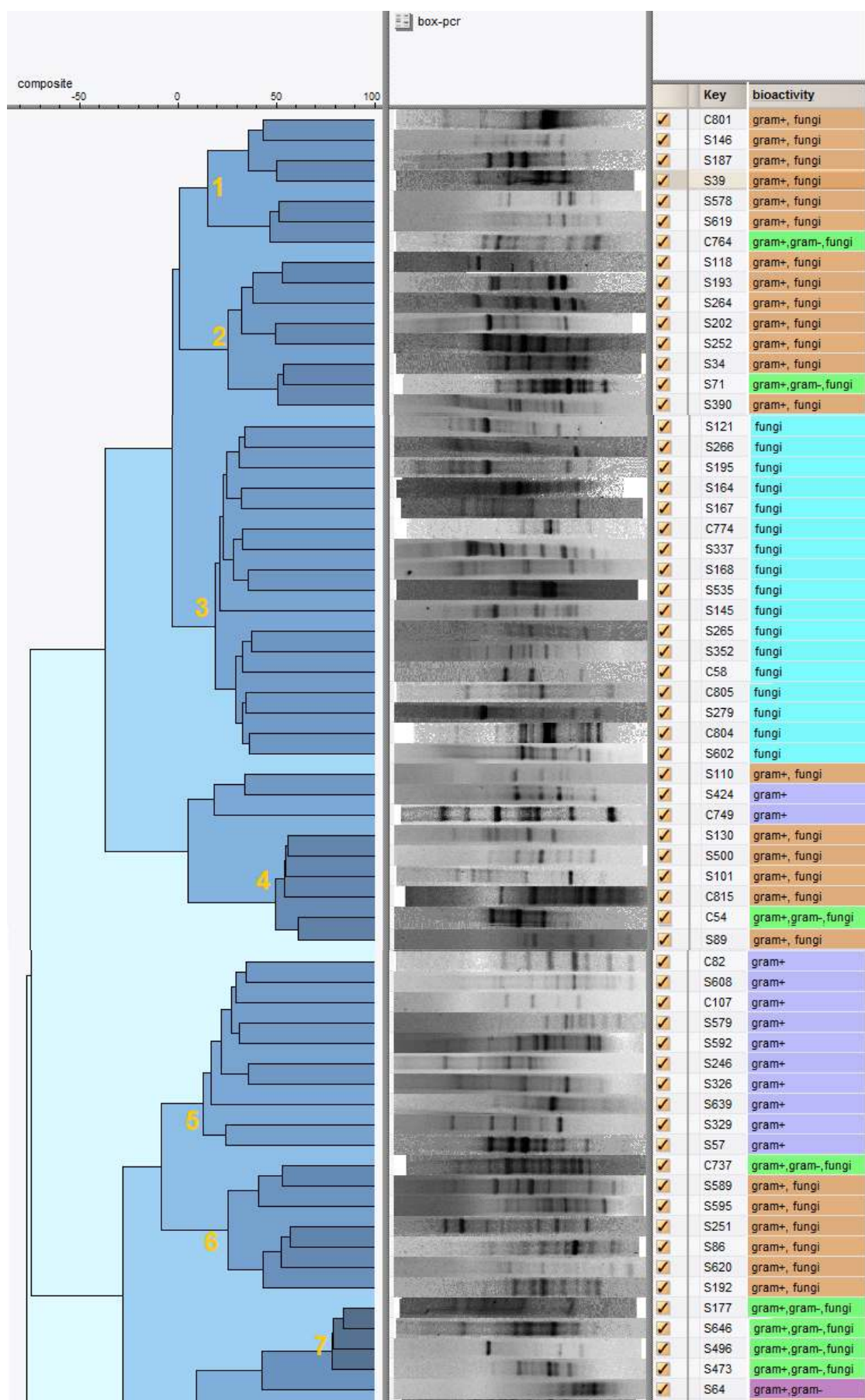


Εικόνα 3.12. Βιοενεργή δράση των απομονωθέντων στελεχών που παρατηρήθηκε ενάντια σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ευκαρυωτικούς δείκτες.

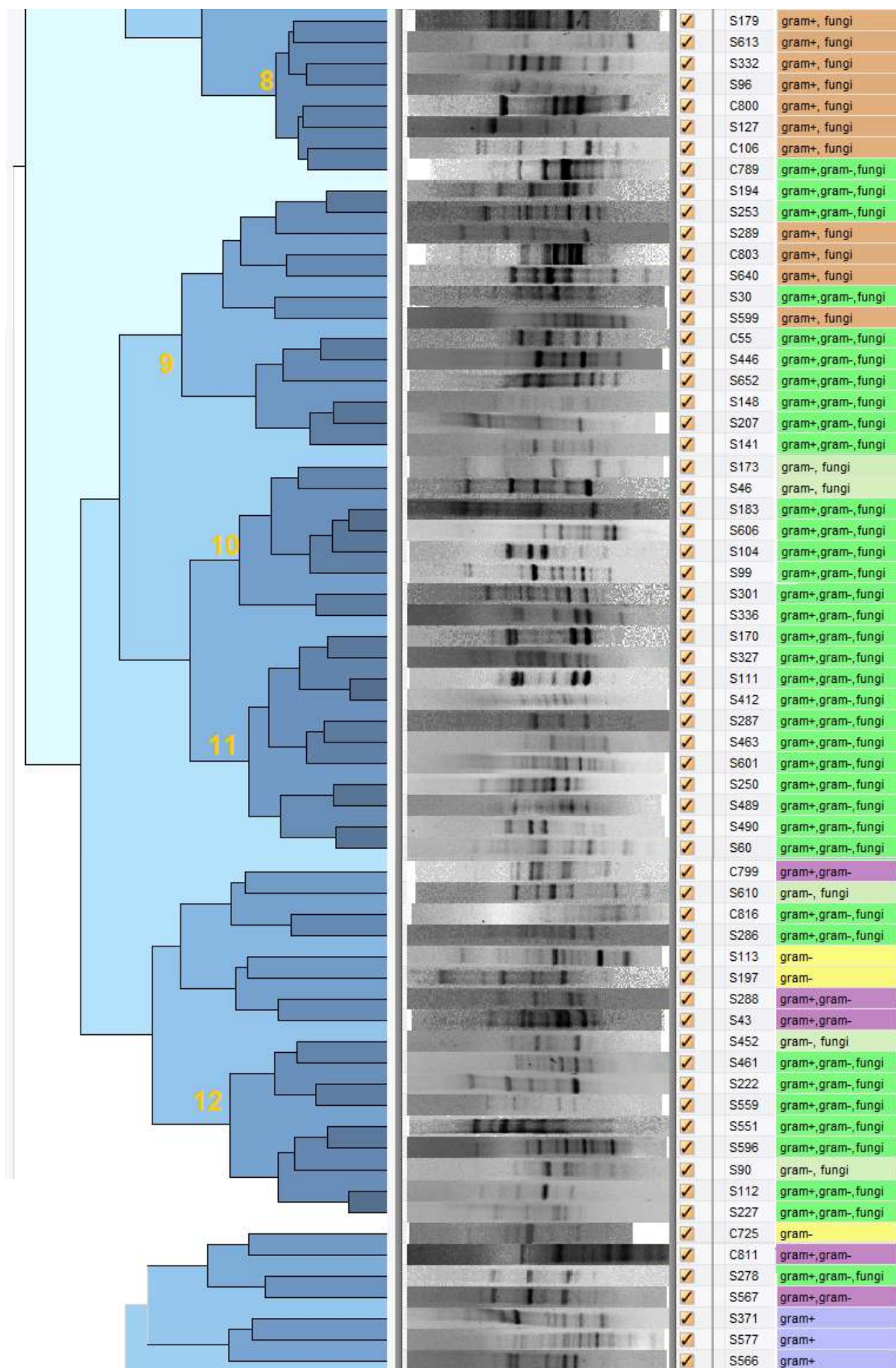
Η ομαδοποίηση των 230 μοναδικών στελεχών με βάση τη διαφορετική αντιμικροβιακή τους δράση όπως προέκυψε από τον Πίνακα 3.3. και σύμφωνα με το εύρος της ζώνης αναστολής που εμφάνισαν ξεχωριστά για καθέναν από τους 18 μικροβιακούς δείκτες, οδήγησε στη δημιουργία 20 ομάδων (Εικ. 3.13.).

Σε καθεμία από τις ομάδες αυτές, όλα τα στελέχη παρουσίασαν κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε 1 με 4 μικροβιακούς δείκτες, όπως καταγράφεται παρακάτω:

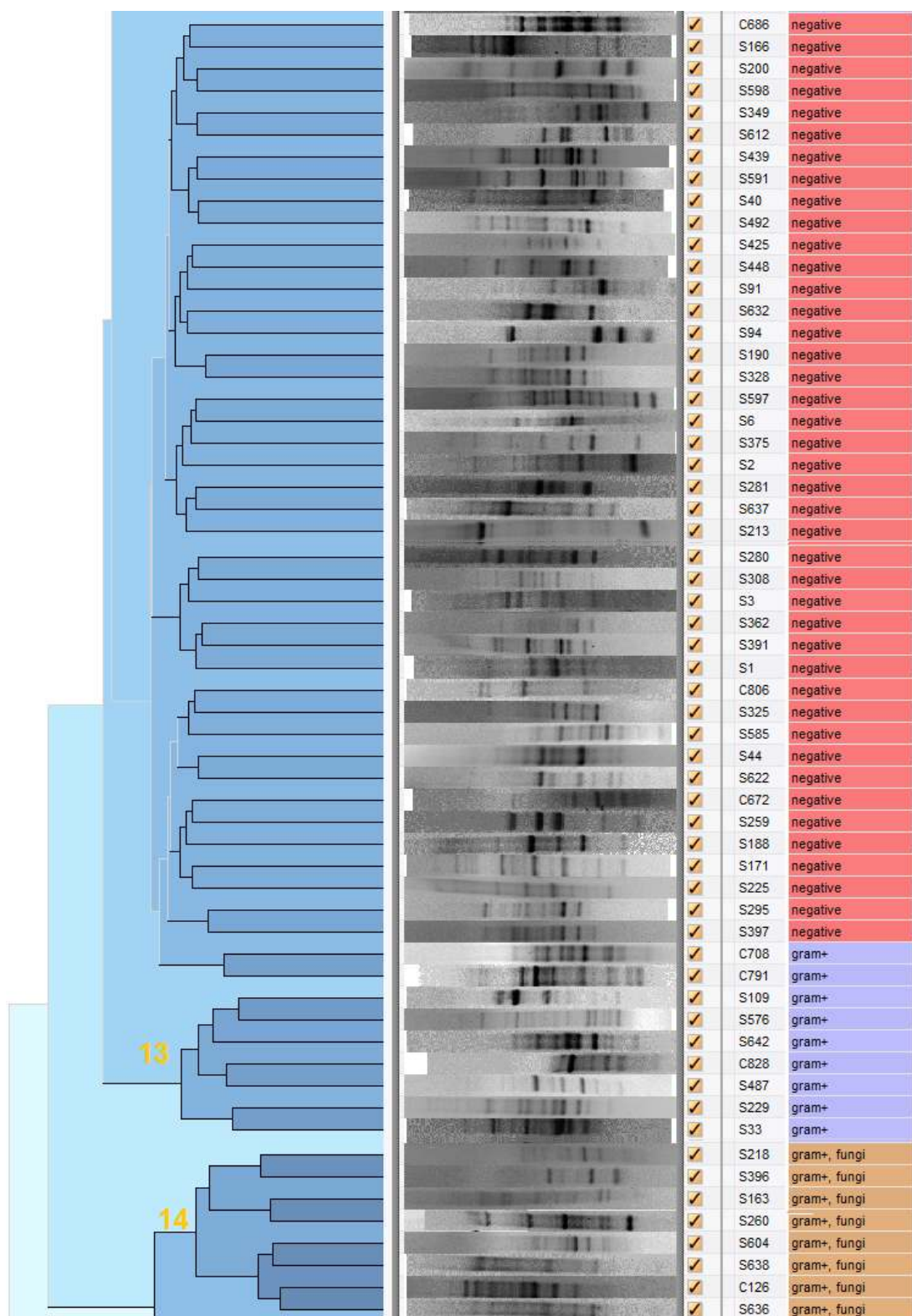
- Ομάδα 1 → *R. solani*, *B. subtilis*
- Ομάδα 2 → *R. solani*, *M. luteus*
- Ομάδα 3 → *R. solani*
- Ομάδα 4 → *R. solani*, *S. pneumoniae*
- Ομάδα 5 → *S. aureus*
- Ομάδα 6 → *R. solani*, *S. aureus*, *A. niger*
- Ομάδα 7 → *R. solani*, *S. aureus*, *A. radioresistens*
- Ομάδα 8 → *R. solani*, *S. aureus*
- Ομάδα 9 → *R. solani*, *K. rhizophila*, *S. pneumoniae*, *A. radioresistens*



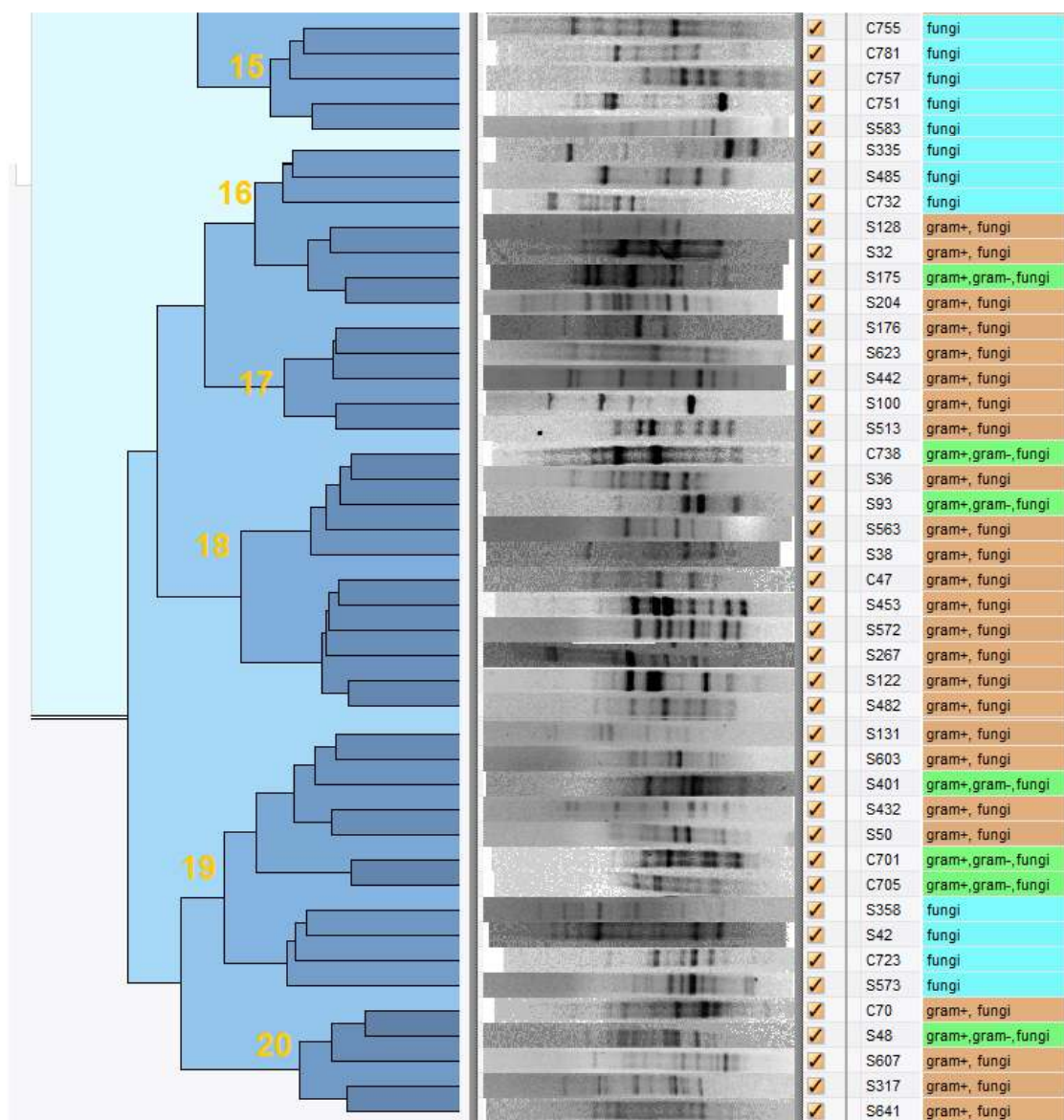
(Συνέχεια της Εικόνας 3.13.)



(Συνέχεια της Εικόνας 3.13.)



(Συνέχεια της Εικόνας 3.13.)



Εικόνα 3.13. Σύνθετη ομαδοποίηση με συντελεστή ομοιότητας Ward των 230 διαφορετικών στελεχών. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν στα 230 διαφορετικά αποτυπώματα BOX-PCR σε συνδυασμό με το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης ενάντια στους 18 μικροβιακούς δείκτες όπως προέκυψε από τον Πίνακα 3.3. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν 20 ομάδες στελεχών που ανέπτυξαν κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια ενός έως και τριών μικροβιακών δεικτών.

- Ομάδα 10 → *R. solani*, *A. radioresistens*, *A. niger*
- Ομάδα 11 → *R. solani*, *A. radioresistens*
- Ομάδα 12 → *C. albicans*, *A. radioresistens*
- Ομάδα 13 → *M. luteus*
- Ομάδα 14 → *R. solani*, *C. albicans*, *K. rhizophila*
- Ομάδα 15 → *C. albicans*
- Ομάδα 16 → *R. solani*, *A. niger*
- Ομάδα 17 → *R. solani*, *A. niger*, *K. rhizophila*
- Ομάδα 18 → *R. solani*, *A. niger*, *K. rhizophila*, *M. luteus*
- Ομάδα 19 → *A. niger*
- Ομάδα 20 → *A. niger*, *E. faecalis*

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω ομάδες, ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Rhizoctonia solani* απαντήθηκε στις περισσότερες από τις ομαδοποιήσεις και σε συνδυασμό κυρίως με θετικά κατά Gram βακτήρια εκτός από το παθογόνο στέλεχος *Enterococcus faecalis* το οποίο βρέθηκε σε συνδυασμό με τον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus niger* (ομάδα 20). Η παρουσία μυκήτων στις παραπάνω ομαδοποιήσεις αφορούσε σε νηματοειδείς μύκητες (συνδυασμένους είτε μεταξύ τους, με ζύμες είτε με βακτήρια) εκτός από τα στελέχη της ομάδας 12 με κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο παθογόνο στέλεχος ζύμης *Candida albicans* σε συνδυασμό με το αρνητικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη *A. radioresistens*.

Η αναστολή ανάπτυξης του καθένα από τους 18 μικροβιακούς δείκτες που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε από στελέχη με διαφορετική αντιμικροβιακή δράση.

Τα στελέχη με αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες, στην πλειονότητά τους ανέστειλαν και την ανάπτυξη μυκήτων. Η κατανομή των βακτηρίων ήταν παρόμοια για όλους τους θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες μεταξύ των οποίων το μικρότερο ποσοστό αναστολής ανάπτυξης παρουσίασε ο *B. subtilis*.

Η αναστολή ανάπτυξης καθενός από τους 7 αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε από στελέχη με διαφορετική αντιμικροβιακή δράση και μάλιστα τα περισσότερα από τα στελέχη αυτά, ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών και ευκαρυωτικών

δεικτών. Η αναστολή της ανάπτυξης των δεικτών *B. xenovorans*, *H. influenza* και *P. aeruginosa* ανιχνεύθηκε μόνο από στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη και των 3 κατηγοριών μικροβιακών δεικτών. Η αναστολή ανάπτυξης των δεικτών *E. coli*, *A. radioresistens*, *P. fluorescens* και *N. gonorrhoeae* παρατηρήθηκε και από στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο βακτηριακών δεικτών. Επίσης, στελέχη με αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες και μύκητες ανέστειλαν την ανάπτυξη των δεικτών *A. radioresistens* και *N. gonorrhoeae*.

Η αναστολή ανάπτυξης καθενός από τους 5 ευκαρυωτικούς δείκτες που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε από στελέχη με διαφορετική αντιμικροβιακή δράση. Τα περισσότερα από τα στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη των νηματοειδών μυκήτων *A. niger* και *R. solani* εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες και μύκητες. Αντίθετα, τα περισσότερα από τα στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη των ζυμών *C. albicans* και *S. cerevisiae* εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση εκτός από τους μύκητες, ενάντια και σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ορισμένα από τα στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη των δεικτών *C. albicans*, *A. niger* και *R. solani* εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια είτε σε αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες και μύκητες είτε μόνο σε ευκαρυωτικούς δείκτες.

Από την παραπάνω ομαδοποίηση και τη συσχέτιση με τις διαφορετικές κατηγορίες αντιμικροβιακής δράσης όπως αυτές αναγράφονται στη δεξιά στήλη της Εικόνας 3.13. προκύπτει ότι:

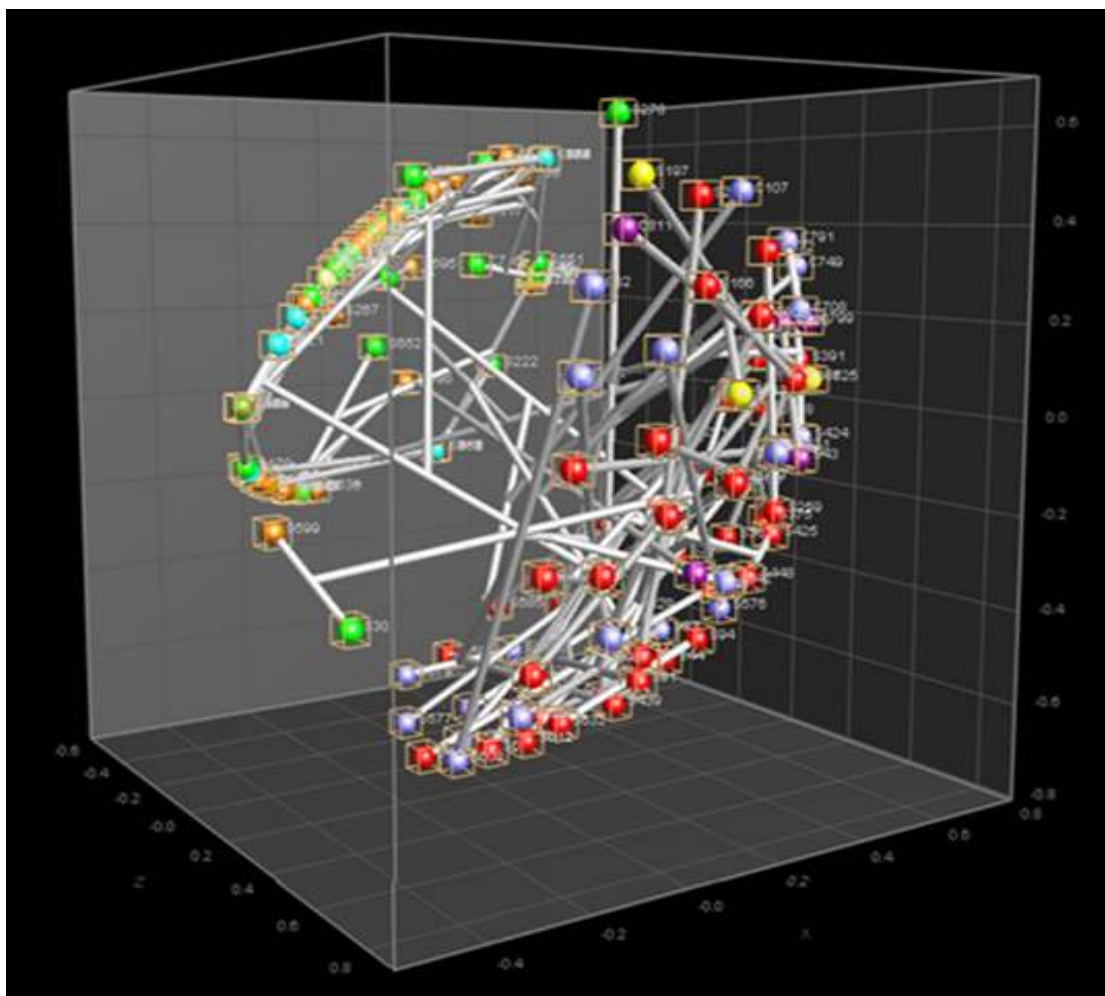
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον δείκτη *Micrococcus luteus* ή στον δείκτη *Staphylococcus aureus* παρουσίασαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* εμφάνισαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο ευκαρυωτικών δεικτών (μικρό εύρος αντιμικροβιακής δράσης), καθώς και στελέχη με ευρεία αντιμικροβιακή δράση ενάντια και στις 3 κατηγορίες μικροβιακών δεικτών.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus niger* αλλά και σε συνδυασμό με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* εμφάνισαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο ευκαρυωτικών

δεικτών, καθώς και στελέχη με αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικά κατά Gram βακτήρια και μύκητες.

- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο παθογόνο στέλεχος της ζύμης *Candida albicans* εμφάνισαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο ευκαρυωτικών δεικτών.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο αρνητικό κατά Gram στέλεχος *Acinetobacter radioresistens* σε συνδυασμό με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* καθώς και των 2 με τον μύκητα *Aspergillus niger* ή με τα θετικά κατά Gram βακτήρια *Kocuria rhizophila* και *Streptococcus pneumoniae* ή με το παθογόνο στέλεχος *Staphylococcus aureus*, εμφάνισαν στελέχη με ευρεία αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και μύκητες.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στο αρνητικό κατά Gram στέλεχος *Acinetobacter radioresistens* σε συνδυασμό με το παθογόνο στέλεχος ζύμης *Candida albicans* εμφάνισαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και ευκαρυωτικών δεικτών.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* σε συνδυασμό με έναν θετικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη όπως ο δείκτης *Bacillus subtilis* ή ο *Streptococcus pneumoniae* ή ο *Micrococcus luteus*, εμφάνισαν στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών και μυκήτων.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus niger* σε συνδυασμό με το θετικό κατά Gram παθογόνο στέλεχος *Enterococcus faecalis* εμφάνισαν στελέχη που εμπόδισαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριακών δεικτών και μυκήτων.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον νηματοειδή μύκητα *Aspergillus niger* σε συνδυασμό με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* και τον θετικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη *Staphylococcus aureus* ή των 2 νηματοειδών μυκήτων με τα ακτινοβακτήρια *Kocuria rhizophila* και *Micrococcus luteus* εμφάνισαν τα στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων.
- κοινή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* σε συνδυασμό με τον θετικό κατά Gram βακτηριακό δείκτη *Kocuria*

rhizophila και το παθογόνο στέλεχος ζύμης *Candida albicans* εμφάνισαν τα στελέχη που ανέστειλαν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων.

Προκειμένου να απεικονιστεί με στατιστική ανάλυση η ομοιότητα της αντιμικροβιακής δράσης των 230 στελεχών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πολυδιάστατης κλιμακοποίησης (Multidimensional Scaling, MDS) (Εικ. 3.14.) που βασίστηκε στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 3.13.



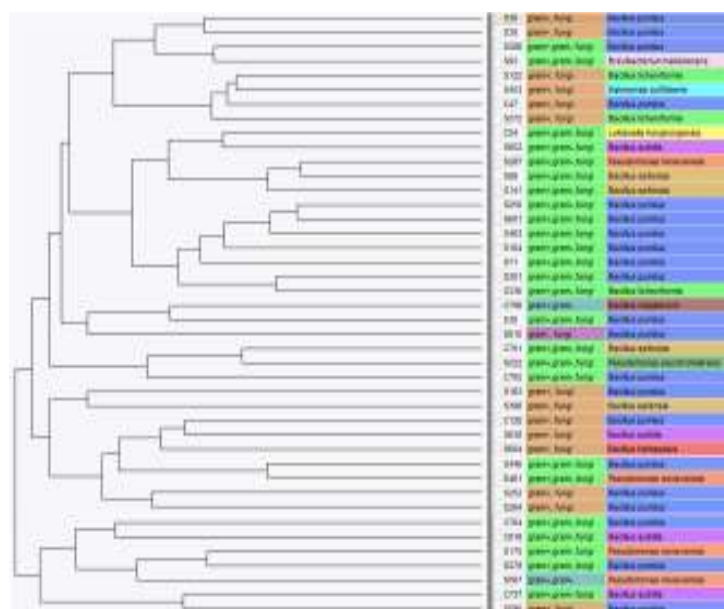
Εικόνα 3.14. Πολυδιάστατη κλιμακοποίηση των 230 βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση, σε συνδυασμό με τα διαφορετικά αποτυπώματα BOX-PCR. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στη διαφορετική αντιμικροβιακή δράση των στελεχών, σύμφωνα με το δενδρόγραμμα της Εικόνας 3.13.

Με τη μέθοδο αυτή, η ομοιότητα των στελεχών όσων αφορά στην αναστολή ανάπτυξης των μικροβιακών δεικτών σε συνδυασμό με τα γενετικά αποτυπώματα του

κάθε στελέχους όπως προέκυψαν από την αντίδραση BOX-PCR, μετατρέπεται σε απόσταση που παριστάνεται στο χώρο. Τα περισσότερα όμοια στελέχη τοποθετούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η απόσταση μεταξύ τους να είναι μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα με αποτέλεσμα να διακρίνουμε τις διαφορές μεταξύ ομάδων με διαφορετικούς συνδυασμούς αντιμικροβιακής δράσης.

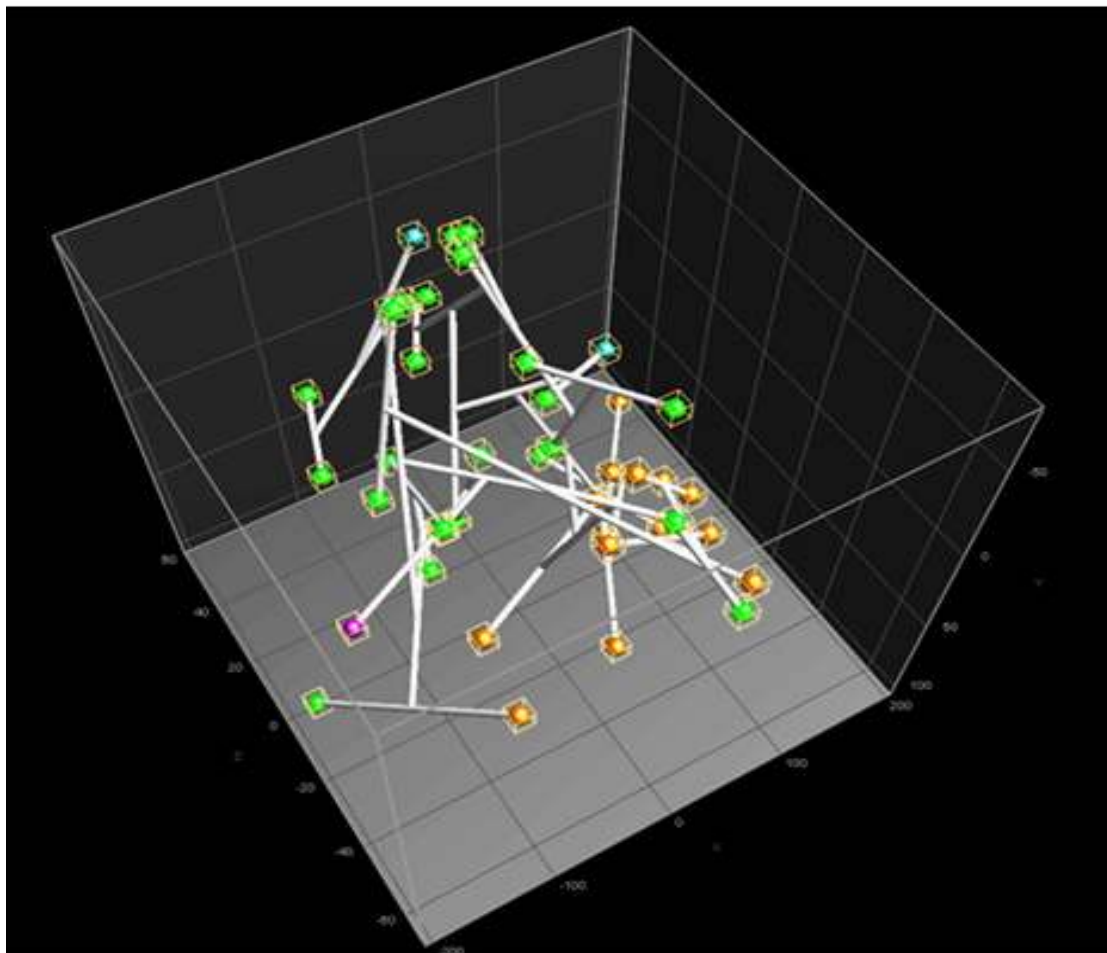
Από την Εικόνα 3.14. φαίνεται η διάκριση των 230 στελεχών σε 2 διαφορετικές ομάδες. Η ομάδα αριστερά του κάθετου άξονα περιλαμβάνει στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια είτε μόνο σε ευκαρυωτικούς είτε σε συνδυασμό με προκαρυωτικούς δείκτες, ενώ η ομάδα δεξιά από τον κάθετο άξονα περιλάμβανε τα στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση μόνο σε προκαρυωτικούς δείκτες, μαζί με τα στελέχη εκείνα που δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη σε κανέναν από τους 18 διαφορετικούς μικροβιακούς δείκτες.

Τα 42 ταυτοποιημένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με συντελεστή ομοιότητας Pearson (Εικ. 3.15.) χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους σύγκρισης την αντιμικροβιακή τους δράση και τα αποτυπώματα BOX. Το δενδρόγραμμα που προέκυψε υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) (Εικ. 3.16.). Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το software του προγράμματος Bionumerics, της εταιρίας Applied Maths.



Εικόνα 3.15. Ομαδοποίηση των 42 πολυενεργών στελεχών με συντελεστή ομοιότητας Pearson. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης και τα αποτυπώματα DNA όπως προέκυψαν από την αντίδραση BOX-PCR. Δεξιά από τον κωδικό του κάθε στελέχους αναγράφεται η κατηγορία των δεικτών στους οποίους ανέστειλε την ανάπτυξη και η φυλογενετική του συγγένεια βάσει της αλληλούχισης του γονιδίου 16S rDNA.

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.16, τα πολυενεργά στελέχη διαχωρίστηκαν στον άξονα y σε 2 ομάδες. Η ομάδα αριστερά του κάθετου άξονα περιλάμβανε όλα τα πολυενεργά στελέχη που ανέπτυξαν αντιμικροβιακή δράση και σε αρνητικούς κατά Gram βακτηριακούς δείκτες, αντίθετα με την ομάδα στα δεξιά του άξονα που περιλάμβανε τα στελέχη με αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικούς κατά Gram βακτηριακούς και ευκαρυωτικούς δείκτες.



Εικόνα 3.16. Ανάλυση κύριων συνιστωσών των 42 πολυενεργών στελεχών ανάλογα με τη διαφορετική αντιμικροβιακή τους δράση. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στη διαφορετική αντιμικροβιακή δράση των στελεχών, σύμφωνα με το δενδρόγραμμα της Εικόνας 3.15.

3.1.στ. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το βακτηριακό στέλεχος S222

Το αρχικό υπόλειμμα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR) και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) και στη

συνέχεια υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών για την απομόνωση των χημικών συστατικών του σε καθαρή μορφή με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό υπόλειμμα της καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους S222 περιγράφεται αναλυτικά από τα παρακάτω στάδια του χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Το αρχικό υπόλειμμα (0,5 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex/EtOAc και EtOAc/MeOH σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 41 κλάσματα (Πίν. 3.4.), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC.

Πίνακας 3.4. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (ml)
1-4	cHex/EtOAc (50:50)	100
5-8	cHex/EtOAc (40:60)	100
9-12	cHex/EtOAc (30:70)	100
13-16	cHex/EtOAc (20:80)	100
17-20	cHex/EtOAc (10:90)	100
21-24	EtOAc (100%)	100
25-28	EtOAc/MeOH (95:5)	100
29-32	EtOAc/MeOH (90:10)	100
33-36	EtOAc/MeOH (80:20)	100
37	EtOAc/MeOH (50:50)	100
38	EtOAc/MeOH (40:60)	100
39	EtOAc/MeOH (30:70)	100
40	EtOAc/MeOH (30:70)	100
41	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (20:80)	100

Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν, οπότε τελικά προέκυψαν 13 κλάσματα (Πίν. 3.5.) τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR.

Πίνακας 3.5. Κλάσματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και τα βάρη αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΒΑΡΟΣ (mg)
BMB-A	1-4	3,5
BMB-B	5-8	57,0
BMB-C	9-13	4,4
BMB-D	14-19	4,4
BMB-E	20-21	2,4
BMB-F	22	2,0
BMB-G	23-26	4,0
BMB-H	27-36	4,3
BMB-I	37	4,9
BMB-J	38	34,1
BMB-K	39	112,9
BMB-L	40	140,8
BMB-M	41	55,3

Το υπόλειμμα BMB-K (112,9 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης σε στήλη γέλης πυριτίου αντίστροφης φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα MeOH/H₂O σε συστήματα μειούμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 5 κλάσματα (Πίν. 3.6.), τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR και χρωματογραφικά με TLC.

Πίνακας 3.6. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και τα βάρη αυτών.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΒΑΡΟΣ (mg)
BMB-K1	MeOH/H ₂ O (20:80)	91,0
BMB-K2	MeOH/H ₂ O (50:50)	0,9
BMB-K3	MeOH/H ₂ O (90:10)	1,5
BMB-K4	MeOH (100%)	9,0

Το υπόλειμμα BMB-K1 (91 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης με σύστημα διαλυτών έκλουσης

CH₂Cl₂/MeOH (90:10). Παρελήφθησαν συνολικά 96 κλάσματα τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν, οπότε τελικά προέκυψαν 8 κλάσματα (Πίν. 3.7.), τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR.

Πίνακας 3.7. Κλάσματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και τα βάρη αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΒΑΡΟΣ (mg)
BMB-K.1.A	0	8,6
BMB-K.1.B	1-3	14,4
BMB-K.1.C	4-6	8,2
BMB-K.1.D	7-10	9,9
BMB-K.1.E	11-19	5,8
BMB-K.1.F	20-24	1,9
BMB-K.1.G	25-40	17,5
BMB-K.1.H	41-96	10,8

Το υπόλειμμα BMB-K.1.B (14,4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης με ισοκρατικό σύστημα MeOH/H₂O (40:60) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα συνολικά, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BMB-K.1.B.2 και BMB-K.1.B.4 ήταν καθαρές ουσίες (Πίν. 3.8.).

Πίνακας 3.8. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, οι χρόνοι έκλουσης και τα βάρη αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ		
Στήλη:	Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm	
Διαλύτης Έκλουσης:	MeOH/H ₂ O (40:60)	
Ροή Έκλουσης:	1,5 mL/min	
Ανιχνευτής:	RI	
ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)	ΒΑΡΟΣ (mg)
BMB-K.1.B.1	1,9	2,5
BMB-K.1.B.2	1,7	3,4
BMB-K.1.B.3	7	4,3
BMB-K.1.B.4	0,9	4,2

Το υπόλειμμα BMB-K.1.C (8,2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης με ισοκρατικό σύστημα MeOH/H₂O (40:60) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα συνολικά, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BMB-K1.C.2 ήταν καθαρή ουσία (Πίν. 3.9.).

Πίνακας 3.9. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, οι χρόνοι έκλουσης και τα βάρη αυτών.

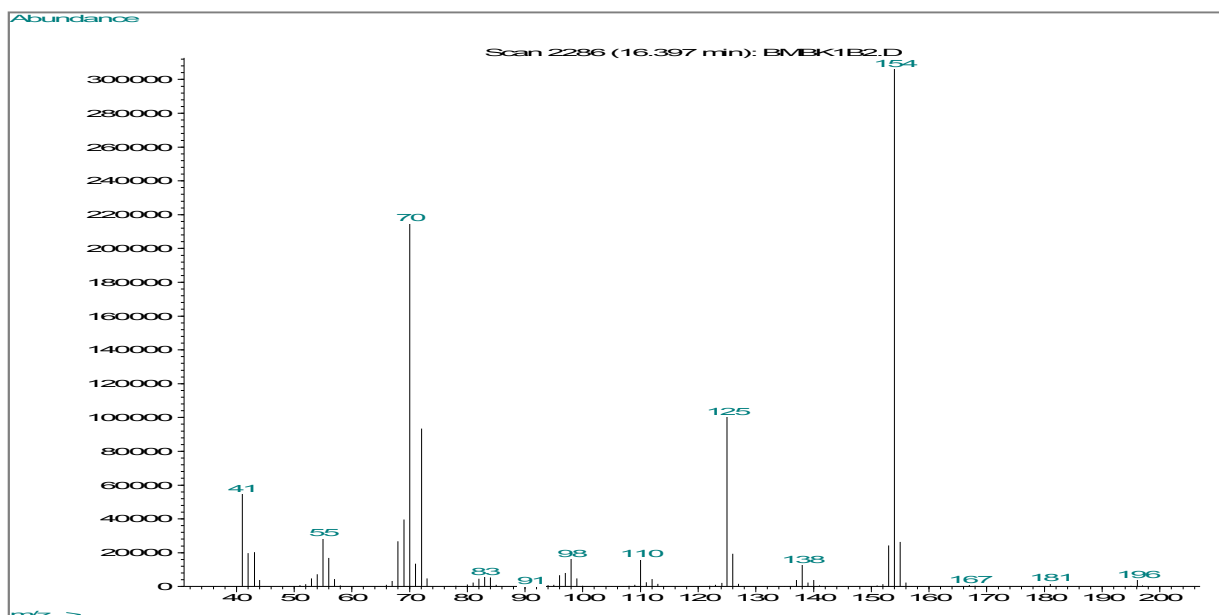
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ		
Στήλη:		Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm
Διαλύτης Έκλουσης:		MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή Έκλουσης:		2 ml/min
Ανιχνευτής:		RI
ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)	ΒΑΡΟΣ (mg)
BMB-K.1.C.1	1,52	1,4
BMB-K.1.C.2	1,3	1,1
BMB-K.1.C.3	2,9	2,1

Οι παραπάνω μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με βάση την ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR και MS) και τη σύγκρισή τους με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών BMB-K.1.B.2, BMB-K.1.B.4 και BMB-K.1.C.2 και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

Μεταβολίτης BMB-K1B2

Ο μεταβολίτης **BMB-K1B2** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικού βάρους 3,4 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 3.17.) ο μεταβολίτης **BMB-K1B2** εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε m/z 196.



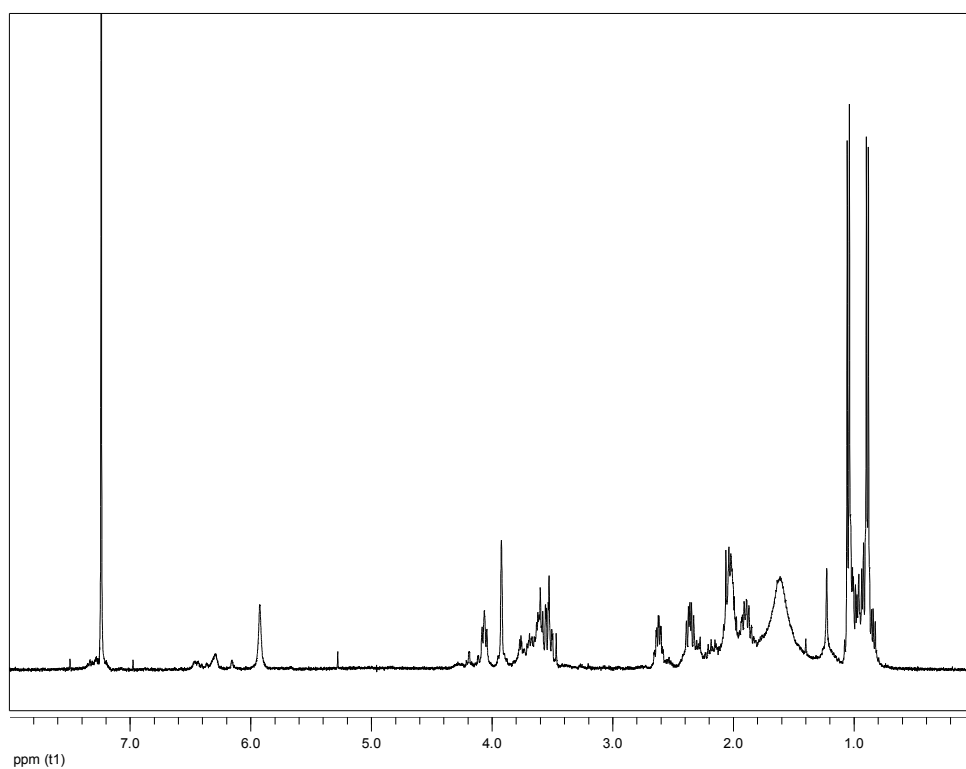
Εικόνα 3.17. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **BMB-K1B2**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B2** (Εικ. 3.18.) παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 0.89 και 1.05, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια των δύο μεθυλίων σε τριτοταγείς άνθρακες, (ii) μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.06 και μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.92, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων και (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.93, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας.

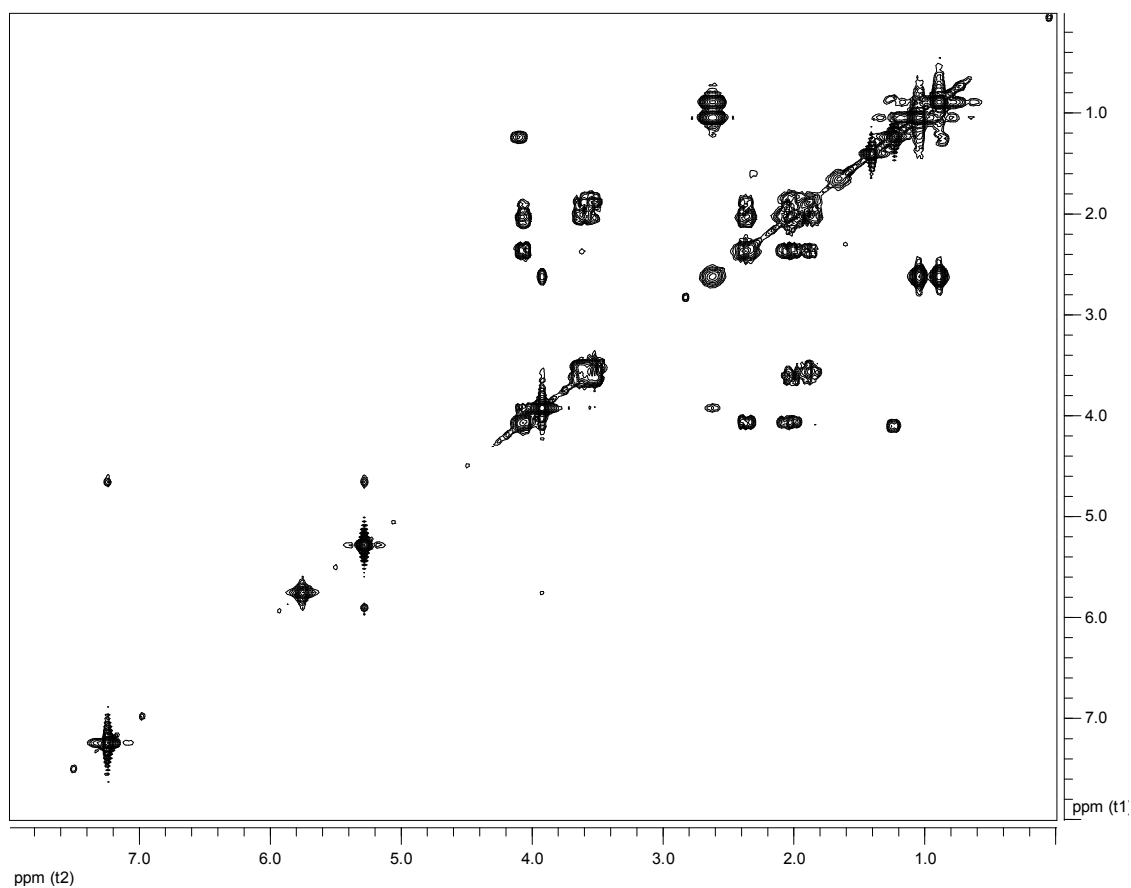
Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 3.19.) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) $\text{H-6} / \text{H}_2\text{-7} / \text{H}_2\text{-8} / \text{H}_2\text{-9}$ που παρέπεμπε σε μία προλίνη και (ii) $\text{H-4} / \text{H-3} / \text{H-10} / (\text{H}_3\text{-12}) \text{H}_3\text{-11}$ που παρέπεμπε σε μία βαλίνη.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **BMB-K1B2** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο ήταν δικυκλικό και έφερε δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-οξυγόνου.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **BMB-K1B2** (Πίν. 3.10.) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-βαλίνη) [*cis*-cyclo (Pro-Val)] (Εικ. 3.20.).



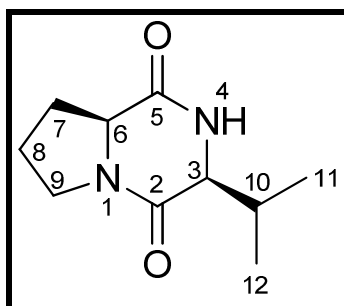
Εικόνα 3.18. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B2**.



Εικόνα 3.19. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **BMB-K1B2**.

Πίνακας 3.10. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B2** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
3	3.92 (brs)
4	5.93 (brs)
6	4.06 (dd, 8.2, 7.7)
7	2.38 (m), 2.04 (m)
8	2.01 (m), 1.87 (m)
9	3.61 (m), 3.55 (m)
10	2.61 (m)
11	0.89 (d, 7.0)
12	1.05 (d, 7.0)

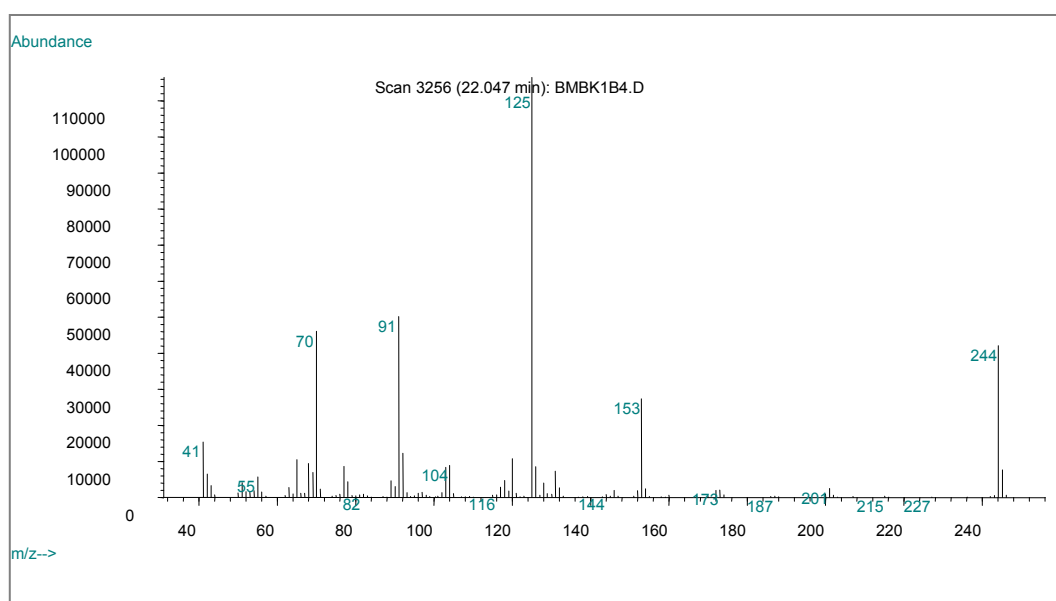


Εικόνα 3.20. Η δομή του μεταβολίτη **BMB-K1B2**.

Μεταβολίτης BMB-K1B4

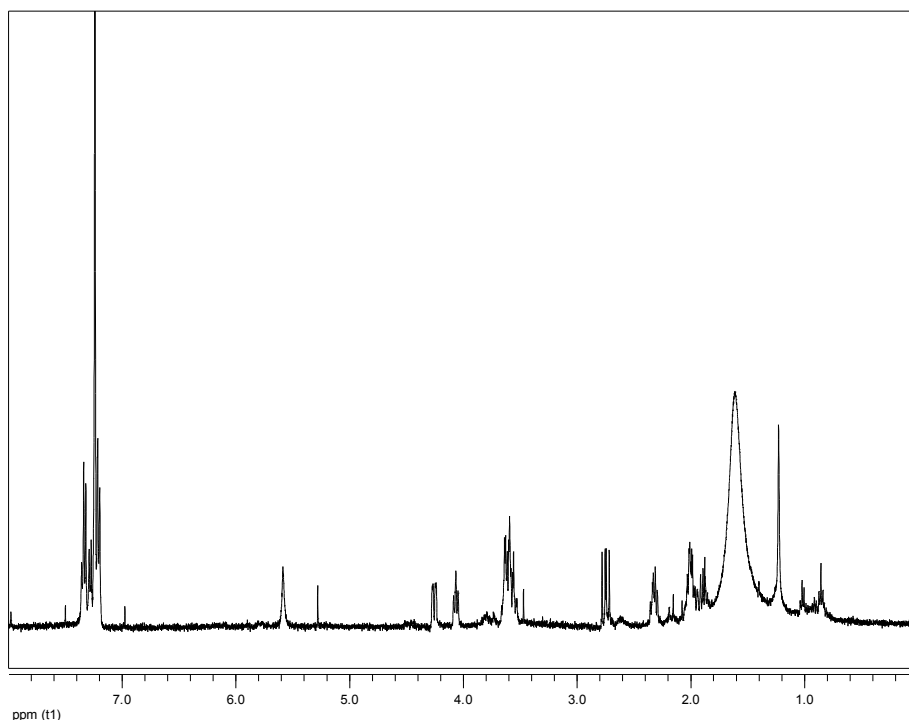
Ο μεταβολίτης **BMB-K1B4** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικού βάρους 4,2 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 3.21.) ο μεταβολίτης **BMB-K1B4** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 244.



Εικόνα 3.21. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **BMB-K1B4**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B4** (Εικ. 3.22.) παρατηρήθηκαν: (i) πέντε αρωματικά πρωτόνια σε δ 7.20–7.33, (ii) δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 4.07 και 4.26, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων και (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.59, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας.

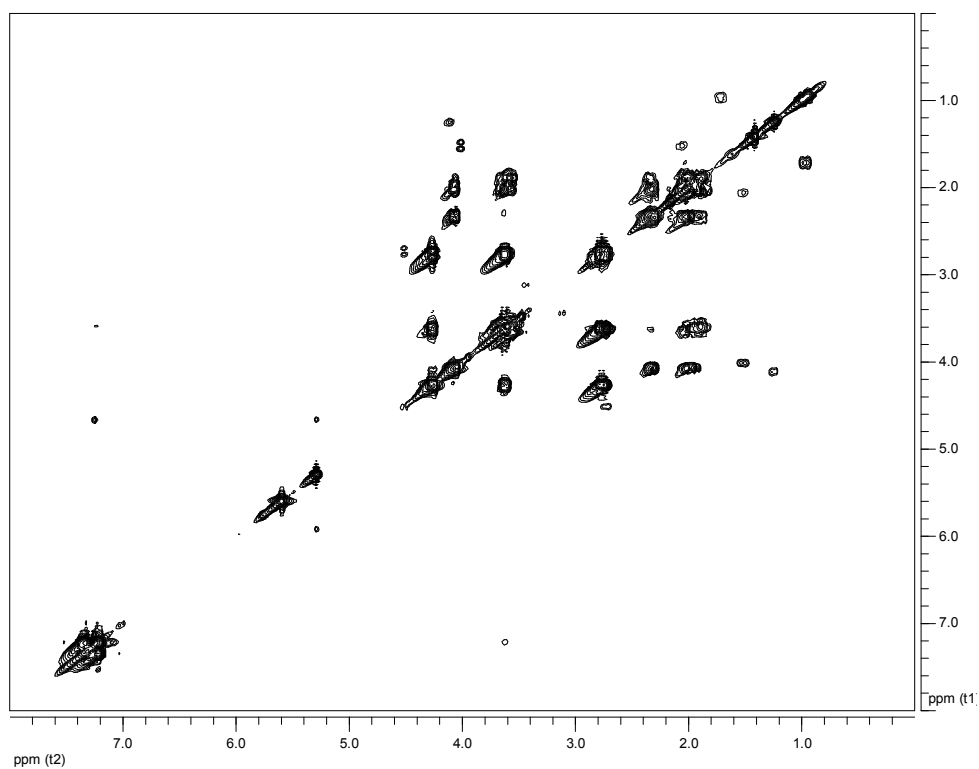


Εικόνα 3.22. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B4**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 3.23.) καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που παρέπεμπε σε μία προλίνη, (ii) H-4 / H-3 / H₂-10 και (iii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-12 έως H-16), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία φαινυλαλανίνη.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **BMB-K1B4** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας οχτώ. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στον μεταβολίτη **BMB-K1B4** προστέθηκε ένας αρωματικός δακτύλιος, δηλαδή μία φαινυλαλανίνη αντικατέστησε τη βαλίνη του μεταβολίτη **BMB-K1B2**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **BMB-K1B4** (Πίν. 3.11.) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο (προλίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Phe)] (Εικ. 3.24.).



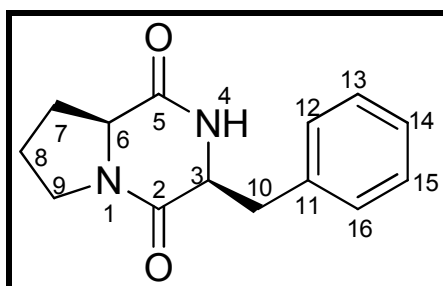
Εικόνα 3.23. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **BMB-K1B4**.

Πίνακας 3.11. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1B4** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
3	4.26 (dd, 10.5, 3.1)
4	5.59 (brs)
6	4.07 (dd, 8.6, 7.0)
7	2.33 (m), 2.00 (m)
8	2.04 (m), 1.88 (m)
9	3.59 (m), 3.51 (m)
10	3.63 (m), 2.75 (dd, 14.4, 10.8)

(Συνέχεια του Πίνακα 3.11.)

12, 16	7.20 (brd, 7.3)
13, 15	7.33 (brt, 7.3)
14	7.28 (brd, 7.3)



Εικόνα 3.24. Η δομή του μεταβολίτη **BMB-K1B4**.

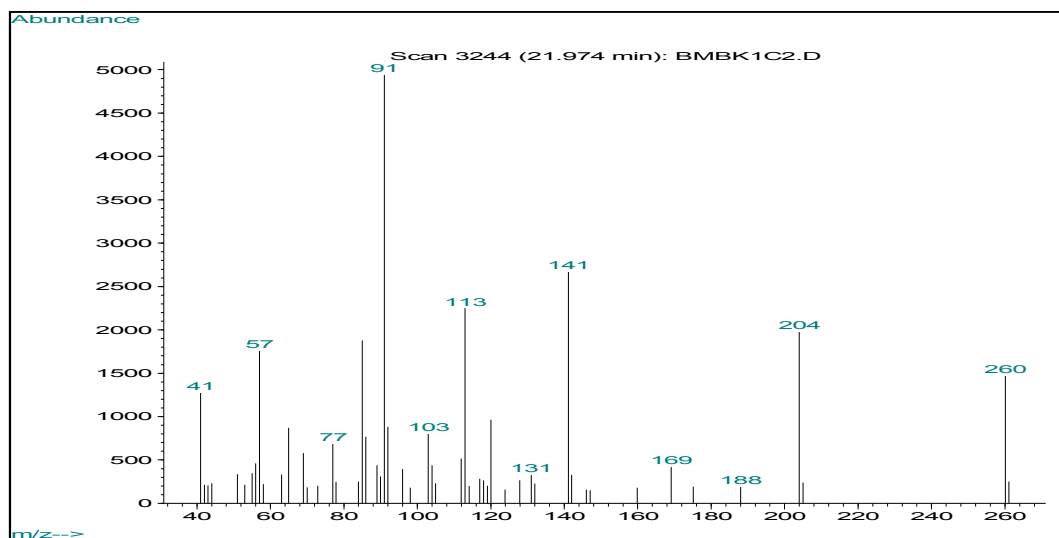
Μεταβολίτης **BMB-K1C2**

Ο μεταβολίτης **BMB-K1C2** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικού βάρους 1,1 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.

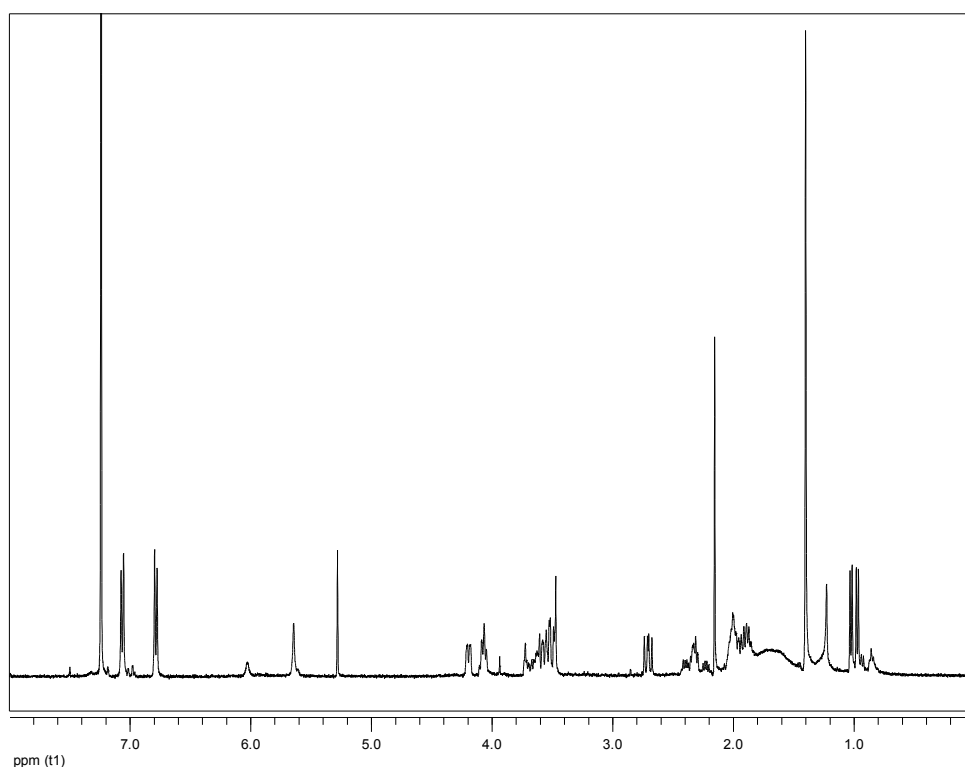
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 3.25.) ο μεταβολίτης **BMB-K1C2** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 260.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1C2** (Εικ. 3.26.) παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 6.79 και 7.06, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε τέσσερα αρωματικά πρωτόνια ενός 1,4-διϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου, (ii) δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 4.07 και 4.19, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων και (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.64, η οποία

ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας.



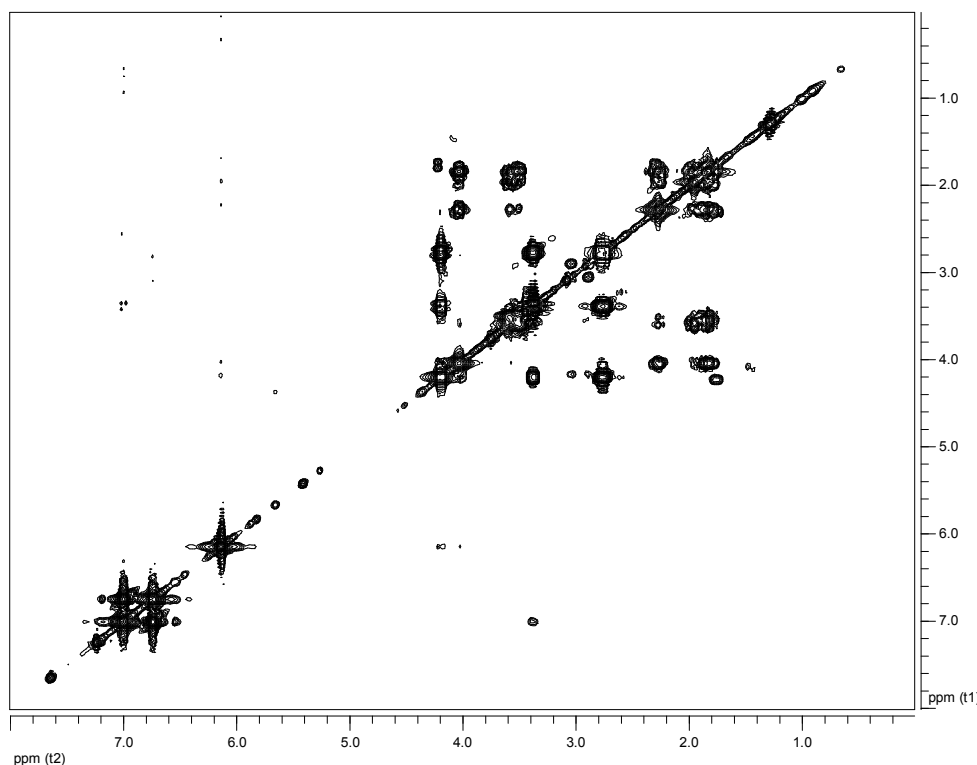
Εικόνα 3.25. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **BMB-K1C2**.



Εικόνα 3.26. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1C2**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 3.27.) καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που

παρέπεμπε σε μία προλίνη, (ii) H-4 / H-3 / H₂-10 και (iii) έναν διϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-12 / H-13 και H-15 / H-16), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία τυροσίνη.



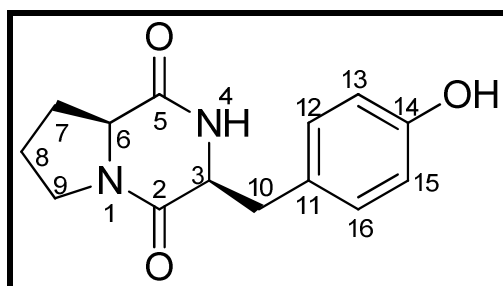
Εικόνα 3.27. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **BMB-K1C2**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **BMB-K1C2** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₄H₁₆N₂O₃ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας οχτώ. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στον μεταβολίτη **BMB-K1C2** η τυροσίνη αντικατέστησε τη φαινυλαλανίνη του μεταβολίτη **BMB-K1B4**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **BMB-K1C2** (Πίν. 3.12.) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-τυροσίνη) [*cis*-cyclo (Pro-Tyr)] (Εικ. 3.28.).

Πίνακας 3.12. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **BMB-K1C2** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
3	4.19 (dd, 10.2, 2.9)
4	5.64 (brs)
6	4.07 (t, 7.7)
7	2.32 (m), 1.93 (m)
8	1.99 (m), 1.86 (m)
9	3.61 (m), 3.54 (m)
10	3.45 (m), 2.71 (dd, 14.7, 10.6)
12, 16	7.06 (d, 8.3)
13, 15	6.79 (d, 8.3)



Εικόνα 3.28. Η δομή του μεταβολίτη **BMB-K1C2**.

3.2.1. Απομόνωση του γονιδίου NRPS

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 19 αλληλουχίες του γονιδίου NRPS. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν αλληλουχίες αδενυλικών ενζυμικών περιοχών (A) από 19 στελέχη, σε 5 από τα οποία ανιχνεύθηκαν και β-κετοακύλ-συνθάσες (KS). Σε 3 από τα 4 στελέχη του είδους *Pseudomonas moraviensis* που εξετάστηκαν, ανιχνεύθηκαν αδενυλικές ενζυμικές περιοχές (A), οι οποίες εμφάνισαν υψηλή ομοιότητα (96-100 %) με αντίστοιχες που απομονώθηκαν από στελέχη του είδους *Pseudomonas moraviensis* και *Pseudomonas protegens*.

Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα της στοίχισης των αλληλουχιών αμινοξέων από τα γονίδια αδενυλικής περιοχής που απομονώθηκαν από 19 πολυενεργά στελέχη με τον αλγόριθμο BLAST X.

Κωδικός Γονιδίου	Στέλεχος από το οποίο απομονώθηκε	Αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank	Μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Ομοιότητα %
NS 287	<i>P. moraviensis</i>	KM186546	LchAA <i>B. licheniformis</i> U95370.1	99
NS 567	<i>P. moraviensis</i>	KM186559	<i>P. moraviensis</i> WP024012355.1	96
NS 175	<i>P. moraviensis</i>	KM186564	LgrD <i>P. protegens</i> WP01563425.1	99
NS 461	<i>P. moraviensis</i>	KM186563	LgrD <i>P. protegens</i> WP01563425.1	100
NS 572	<i>B. licheniformis</i>	KM186555	BacA <i>B. licheniformis</i> WP020452079.1	98
NS 336	<i>B. licheniformis</i>	KM 186556	BacA <i>B. subtilis</i> ABB80123.1	98
NS 122	<i>B. licheniformis</i>	KM186547	TycIII <i>B. sonorensis</i> WP006640279.1	99

(Συνέχεια του Πίνακα 3.13.)

NC 701	<i>B. safensis</i>	KM186551	<i>B. pumilus</i> WP025092822.1	95
NS 141	<i>B. safensis</i>	KM186548	<i>B. safensis</i> WP024424295.1	98
NS 99	<i>B. safensis</i>	KM186557	<i>B. pumilus</i> WP025092819.1	97
NS 396	<i>B. safensis</i>	KM186554	<i>B. pumilus</i> KDE51553.1	96
NS 93	<i>B.</i> <i>halotolerans</i>	KM186552	<i>B. subtilis</i> WP015252053.1	84
NC 816	<i>B. subtilis</i>	KM186562	<i>B. amyloliquefaciens</i> EYB38008.1	90
NC 737	<i>B. subtilis</i>	KM186560	<i>B. subtilis</i> WP029946301.1	99
NS 638	<i>B. subtilis</i>	KM186553	<i>B. pumilus</i> KDE51551.1	97
NS 652	<i>B. subtilis</i>	KM186561	<i>B. subtilis</i> EXF52074.1	100
NS 446	<i>B. pumilus</i>	KM186549	<i>B. pumilus</i> KDE51553.1	98
NC 764	<i>B. pumilus</i>	KM186558	<i>B. pumilus</i> KDE51553.1	97
NS 601	<i>B. pumilus</i>	KM186550	<i>B. pumilus</i> KDE51553.1	98

Οι 2 από αυτές τις (Α) εμφάνισαν υψηλή ομολογία με την αδενυλική περιοχή της γραμμικής γραμισιδίνης (LgrD), η οποία απομονώθηκε από στέλεχος του είδους *Pseudomonas protegens*. Στο 4^ο στέλεχος *Pseudomonas moraviensis* (S287) καθώς και σε 15 στελέχη του γένους *Bacillus* ανιχνεύθηκαν (Α) που απομονώθηκαν από στελέχη του γένους *Bacillus* (Πίνακας 3.13.).

Το ποσοστό ομοιότητας των αδενυλικών ενζύμων (Α) με αλληλουχίες αναφοράς ήταν 84-100 % και κάποιες από αυτές έδειξαν στενή συγγένεια με (Α) που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών τυροσιδίνη (TycC), βακιτρακίνη (BacA), και λιχενισίνη (LchAA). Οι περισσότερες από τις αδενυλικές ενζυμικές περιοχές που απομονώθηκαν, συμπεριλαμβανομένης και της λιχενυσίνης (LchAA) είχαν υψηλή ομολογία με την αδενυλική περιοχή του τελικού ενζυμικού σύμπλοκου σύνθεσης της σουρφακτίνης από στελέχη του είδους *Bacillus subtilis*.

3.2.2. Απομόνωση του γονιδίου PKS

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 6 αλληλουχίες αμινοξέων του γονιδίου PKS. Οι αλληλουχίες β-κετοακύλ-συνθάσης (KS) είχαν υψηλή ομοιότητα (87-100 %) με αλληλουχίες απομονωμένων γονιδίων από θαλάσσια βακτήρια της τάξης *Actinomycetales* και του γένους *Bacillus* (Πίν. 3.14.).

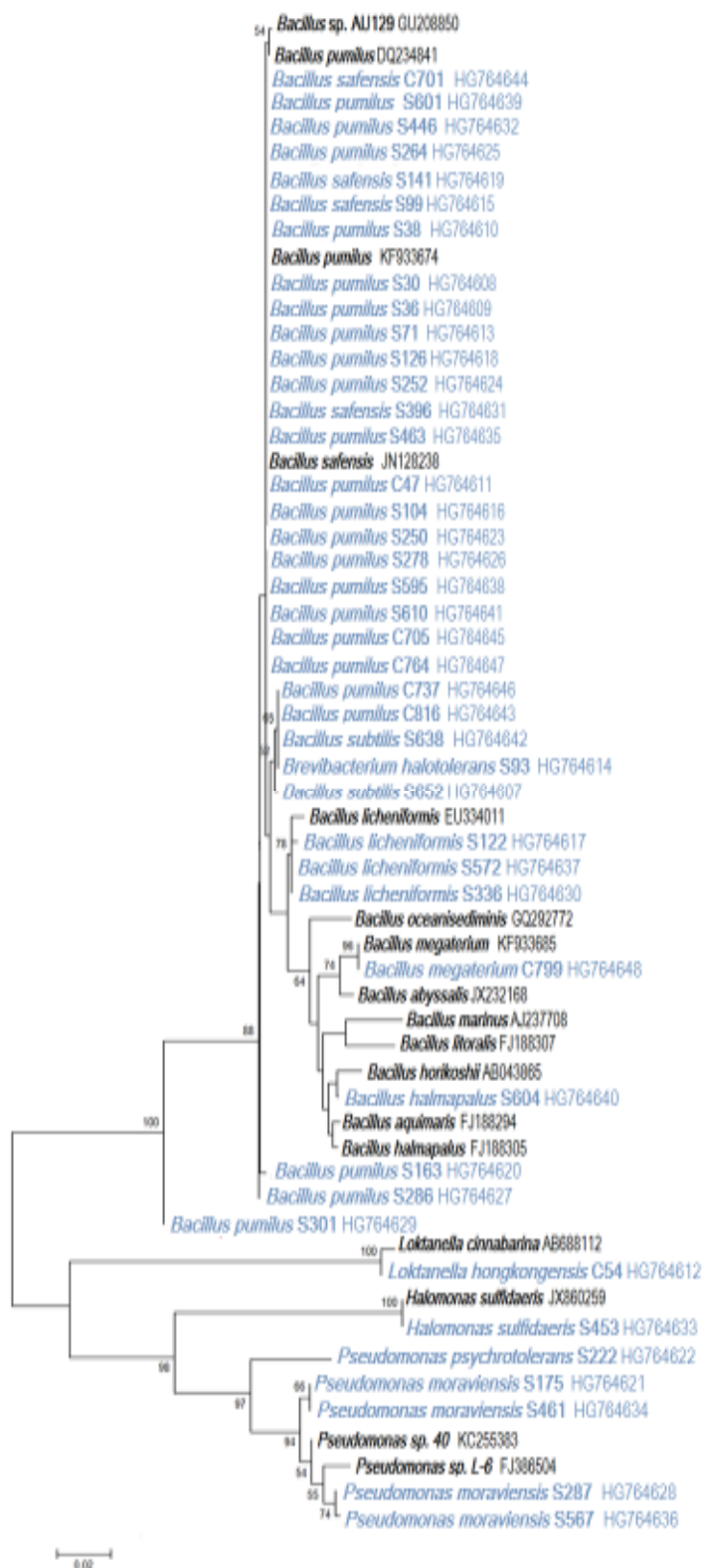
Πίνακας 3.14. Αποτελέσματα της στοίχισης των αλληλουχιών αμινοξέων από γονίδια β-κετοακύλ-συνθάσης που απομονώθηκαν από 6 πολυενεργά στελέχη με τον αλγόριθμο BLAST X.

Κωδικός γονιδίου (KS)	Στέλεχος από το οποίο απομονώθηκε	Αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank	Μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Ομοιότητα %
KC 701	<i>B. safensis</i>	KM186569	<i>B. subtilis</i> ABR19764.1	99
KS 93	<i>B. halotolerans</i>	KM186567	<i>B. sp. WPhG3</i> ACG70843.1	96
KC 816	<i>B. subtilis</i>	KM186570	<i>B. amyloliquefaciens</i> AGL92433.1	87
KS638	<i>B. subtilis</i>	KM186566	<i>Actinomycetales</i> ABR19779.1	97
KC 764	<i>B. pumilus</i>	KM186565	<i>B. subtilis</i> ABR19764.1	99
KC 705	<i>B. pumilus</i>	KM186568	<i>Actinomycetales</i> ABR19779.1	97

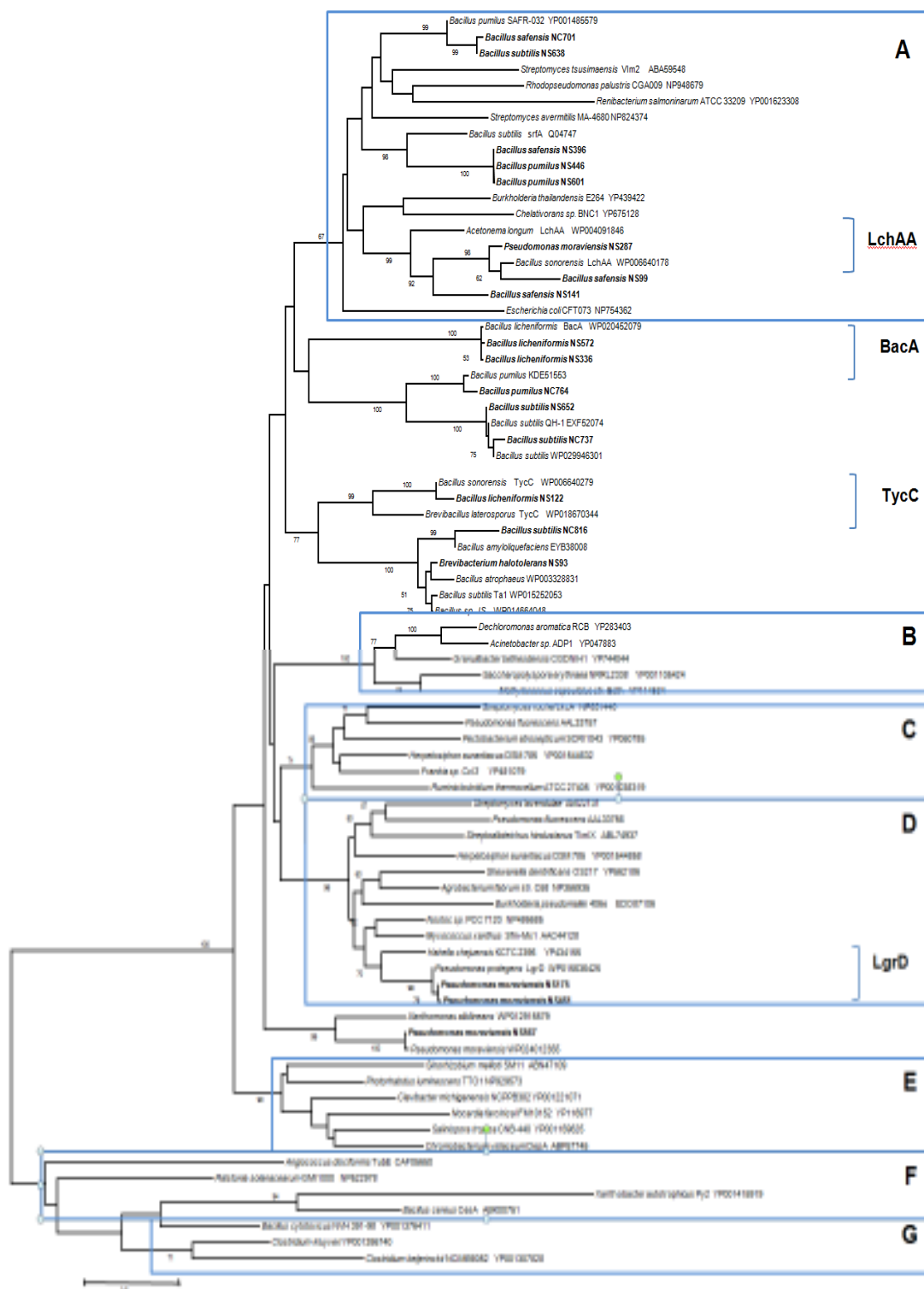
Οι 2 από τις 6 αλληλουχίες β-κετοακύλ-συνθάσης (KS) που απομονώθηκαν, ήταν συγγενικές με αντίστοιχες (KS), που απομονώθηκαν από υβριδικά σύμπλοκα NRPS/PKS. Οι υπόλοιπες 4 αλληλουχίες β-κετοακύλ-συνθάσης (KS) εμφάνισαν υψηλή ομολογία με αντίστοιχες κετοακύλ-συνθάσεις που ανήκουν στην κατηγορία *trans*-AT PKS και ανιχνεύθηκαν σε απομονωθέντα στελέχη από θαλάσσιους σπόγγους. Στον Πίνακα 3.15. αναγράφεται συνοπτικά η αντιμικροβιακή δράση των πολυενεργών στελεχών όπως προέκυψε από την ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων και τα πειράματα του βιοελέγχου *in vitro*.

3.2.3. Φυλογενετική μελέτη των γονιδίων 16S rDNA, NRPS και PKS

Οι 42 αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rDNA διαχωρίστηκαν σε 2 μεγάλες ομάδες όπως προέκυψε από τη φυλογενετική τους ανάλυση στην οποία



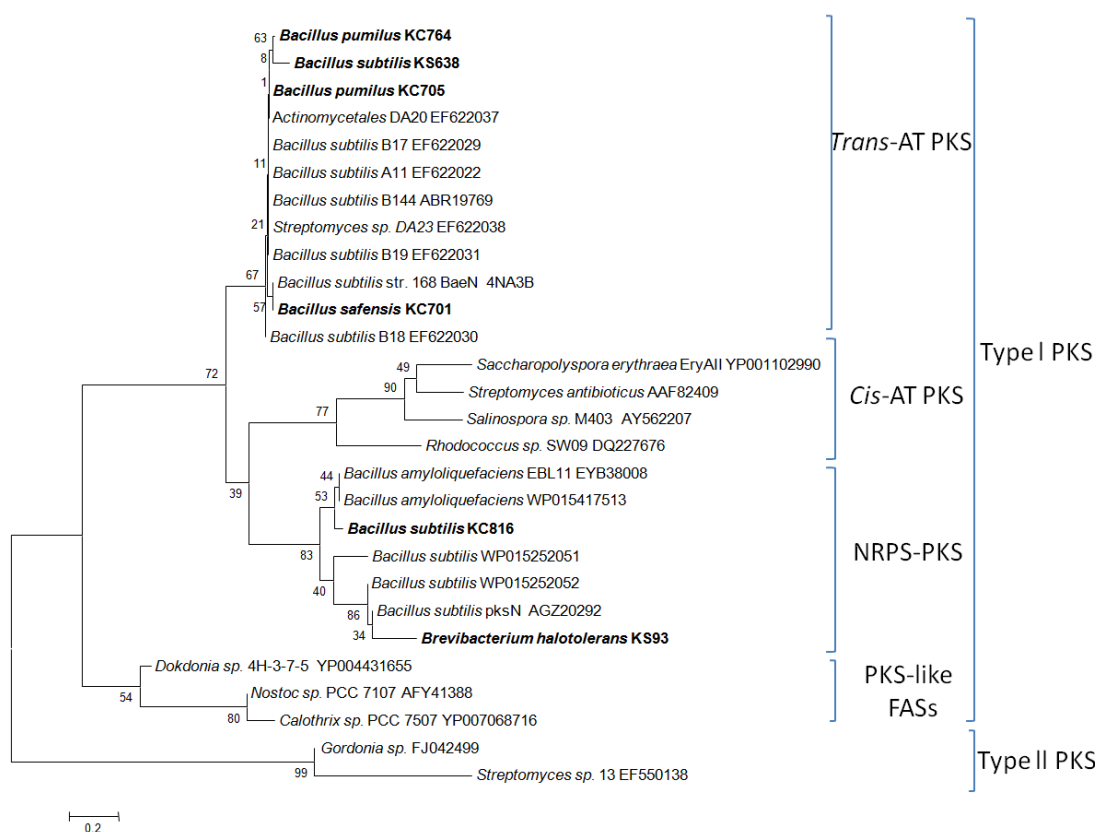
Εικ. 3.29. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο της Γειτνίαςης βασισμένο στη στοίχιση των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rDNA των πολυενεργών στελεχών (μπλε χρώμα) και στενών συγγενών τους απομονωμένων από θαλάσσια ιζήματα. Μπροστά από τον κωδικό, το γράμμα S αντιπροσωπεύει το ιζήμα και το C, την καμινάδα. Στους κόμβους αναγράφονται οι τιμές bootstrap ≥ 50 %. Η κλίμακα αναφέρεται στον αριθμό των αντικαταστάσεων ανά θέση νουκλεοτιδίου.



Εικ. 3.30. Φυλογενετικό δέντρο με αλληλουχίες αμινοξέων (A) δομικών επικρατειών με τη μέθοδο της Γειτνίασης, απομονωμένες από 19 πολυενεργά στελέχη του Κολούμπο (με έντονη γραφή, NS για το ίζημα και NC για την καμινάδα) και αλληλουχίες αναφοράς από γνωστές NRPS. A, οικογένεια σουρφακτίνης, B, οικογένεια σιδηροφόρων, C, οικογένεια (TA) της ομάδας αντιβιοτικών μυξοβιρεσίνης, D, οικογένεια σαφραμυκίνης, E, οικογένεια ταλισομυκίνης, F, οικογένεια τουμπουλικίνης, G, οικογένεια μυκοσομπιλίνης. Το ποσοστό των τιμών bootstrap της ανάλυσης neighbor-joining από 1,000 επαναλήψεις καταγράφεται στους κόμβους. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει αντικατάσταση 0.5 AA ανά θέση.

χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες αναφοράς από στελέχη που έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ιζήματα (Εικ. 3.29.).

Οι περισσότερες από τις αλληλουχίες αναφοράς που επιλέχθηκαν για τη φυλογένεση των απομονωθέντων 19 αδενυλικών λειτουργικών επικρατειών, ανήκουν στις διαφορετικές οικογένειες (Α). Οι περισσότερες από τις παραπάνω 19 (Α) αλληλουχίες, συμπεριλαμβανομένης της υπομονάδας της λιχενισίνης Α, ομαδοποιήθηκαν στην οικογένεια της σουρφακτίνης (SrfA-C), ενώ η αδενυλική λειτουργική επικράτεια της γραμμικής γραμισιδίνης ομαδοποιήθηκε στην οικογένεια της σαφραμυσίνης (Εικ. 3.30.).



Εικόνα 3.31. Φυλογενετικό δέντρο των πρωτεϊνικών περιοχών (KS) που έγινε με τη μέθοδο της Γειτνίασης χρησιμοποιώντας αλληλουχίες αμινοξέων. Τα πολυενεργά στελέχη που περιέχουν γονίδια KS έχουν έντονη γραφή (bold) και ο κωδικός KS υποδεικνύει ότι προέρχεται από το δείγμα ιζήματος ενώ το KC από το δείγμα καμινάδας). Στους κόμβους αναγράφονται οι τιμές bootstrap σε % και η κλίμακα αναφέρεται στον αριθμό των αντικαταστάσεων ανά θέση νουκλεοτιδίου.

Για τη φυλογενετική μελέτη των απομονωθέντων (KS), επιλέχθηκαν αλληλουχίες αναφοράς από υβρίδια NRPS-PKS, *trans*-ακυλ-τρανσφεράσες (*trans*-AT), *cis*-ακυλ-

τρανσφεράσες (*cis*-AT) και συνθάσες λιπαρών οξέων (FAS). Ως ρίζα του δέντρου (outgroups) επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες PKS τύπου II. 2 από τις απομονωμένες (KS) αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν με εκείνες της ομάδας NRPS-PKS και οι υπόλοιπες 4 (KS) με τις *trans*-ακυλ-τρανσφεράσες (AT) τύπου I (Εικ. 3.31.).

Πίνακας 3.15. Αντιμικροβιακή δράση των πολυενεργών στελεχών και παρουσία των γονιδίων NRPS και PKS

Κωδικός απομονωθέντος στελεχούς	16S rDNA NRPS PKS			ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΚΑΤΑ Gram							ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΘΕΤΙΚΟΙ ΚΑΤΑ Gram						ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ				
				<i>A. radioresistens</i> <i>B. xenovorans</i> <i>P. fluorescens</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>H. influenza</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i> <i>M. luteus</i> <i>K. rhizophila</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. niger</i> <i>R. solani</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>C. albicans</i>						ΝΗΜΑΤΟΕΙΔΕΙΣ ΜΥΚΗΤΕΣ			ΖΥΜΕΣ					
S30	<i>B. pumilus</i>			+++	—	—	++	++	—	—	—	++	+++	—	++	—	—	—	++	+++	—
S36	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++	—	—	—
S38	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+	++	+	++	+++	+	—	+
C47	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+	+	—	+	+++	—	—
S71	<i>B. pumilus</i>			++	++	++	++	++	—	—	—	++	—	++	++	—	—	—	+++	—	—
S104	<i>B. pumilus</i>			++	—	—	—	—	—	—	—	+++	++	+	++	+	—	++	++	—	—
C126	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	++	++	++	—	—	+++	—	++
S163	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	+	—	—	—	++	—	
S250	<i>B. pumilus</i>			+++	—	—	+++	—	—	—	—	+++	—	—	+++	+++	—	—	+++	—	—
S252	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	++	++	++	—	—	++	—	—
S264	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	+++	+++	+++	—	—	++	—	—
S278	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	++	—	—	++	++	—	—	++	—	++	+++	+++	+++	+++	—
S286	<i>B. pumilus</i>			+	—	—	++	—	—	—	—	—	++	—	++	+	—	++	—	—	—
S301	<i>B. pumilus</i>			++	—	—	++	—	—	—	++	+++	—	—	+++	+++	—	++	++	—	—
S446	<i>B. pumilus</i>	NRPS		++	—	++	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	—	—	++	—	+++
S463	<i>B. pumilus</i>			++	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	+++	—	—	+++	—	—
S595	<i>B. pumilus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+++	+++	+++	—	+++
S601	<i>B. pumilus</i>	NRPS		+++	—	—	+++	—	—	—	—	+++	—	+++	—	+++	—	—	+++	—	—
S610	<i>B. pumilus</i>			+++	—	—	++	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+++	—	—	+++
C705	<i>B. pumilus</i>		PKS	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	++	—	+++	++	—	+++

C764	<i>B. pumilus</i>	NRPS	PKS	—	—	—	++	—	—	+++	+++	++	—	—	++	++	—	—	+++	—	—
S638	<i>B. subtilis</i>	NRPS	PKS	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	++	—	+++
S652	<i>B. subtilis</i>	NRPS		+++	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	+++	—	+++	
C737	<i>B. subtilis</i>	NRPS		—	—	—	+++	—	—	+++	—	—	—	+++	—	—	+++	+++	+++	—	+++
C816	<i>B. subtilis</i>	NRPS	PKS	+	—	—	++	—	—	++	+++	—	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++
S93	<i>B. halotolerans</i>	NRPS	PKS	+++	—	+++	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	—	—	—
S99	<i>B. safensis</i>	NRPS		++	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	++	—	—	—	++	++	—	—
S141	<i>B. safensis</i>	NRPS		+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+++	+++	+	—	
S396	<i>B. safensis</i>	NRPS		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+	+	
C701	<i>B. safensis</i>	NRPS	PKS	+	—	—	—	—	—	++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++	—	—	+++
S572	<i>B. licheniformis</i>	NRPS		—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—
S122	<i>B. licheniformis</i>	NRPS		—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	—	++	++	—	+++	+++	—	—
S336	<i>B. licheniformis</i>	NRPS		++	—	++	++	—	—	—	+++	+++	—	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	—
C799	<i>B. megaterium</i>			—	—	—	++	—	—	—	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—	—	—	—
S604	<i>B. halmapalus</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	—	++	—	—	++	—	+++
S567	<i>P. moraviensis</i>	NRPS		+++	—	+++	+++	—	—	++	+++	++	+++	+++	—	+++	—	—	—	—	—
S461	<i>P. moraviensis</i>	NRPS		++	—	+	—	—	—	—	++	++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
S175	<i>P. moraviensis</i>	NRPS		+	++	—	+	—	—	++	++	—	—	—	+	—	+++	+++	—	—	—
S287	<i>P. moraviensis</i>	NRPS		++	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	—	+++	—	—	+++	—	—
S222	<i>P. psychrotolerans</i>			++	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	++	—	—	+++
S453	<i>H. sulfidaeris</i>			—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+	—	—
C54	<i>L. hongkongensis</i>			+++	++	+++	—	—	+++	—	—	—	—	—	—	++	—	—	+++	—	—

- απουσία αντιμικροβιακής δράσης, + ζώνη αναστολής ≥ 1 cm, ++ ζώνη αναστολής ≥ 2 cm, +++ ζώνη αναστολής ≥ 3 cm

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, οι μικροβιακοί πληθυσμοί απαντώνται σε όλο και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όσο αυξάνεται η απόσταση από την πηγή έκλυσης των υδροθερμικών ρευστών (Thornburg και συνεργάτες, 2010). Η αφθονία βιομάζας που χαρακτηρίζει αυτά τα οικοσυστήματα, οφείλεται στον μεταβολισμό των μεσόφιλων μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται στον χώρο που δημιουργείται μεταξύ των ακραίων υδροθερμικών συνθηκών και του κρύου οξυγονωμένου θαλασσινού νερού (Van Dover και συνεργάτες, 2002). Η ικανότητα οξειδωσης αναγωγικών ενώσεων, παρέχει στους μεσόφιλους μικροοργανισμούς την απαραίτητη ενέργεια για τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα, τη μετατροπή του σε οργανική ύλη και τη μεταφορά του σε υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Nakagawa και Takai, 2008). Τα μεσόφιλα βακτήρια, όπως έχει διαπιστωθεί στο παρελθόν, έχουν την ιδιότητα να προσαρμόζονται με μεγαλύτερη ευκολία σε μεταβολές των περιβαλλοντικών φυσικοχημικών παραμέτρων (Rheinheimer, 1977). Λόγω της ευρείας μεταβολικής τους δραστηριότητας, μελετώνται προκειμένου να εξεταστεί η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με το περιβάλλον τους και η αφθονία των μικροβιακών πληθυσμών σε σχέση με τη συγκέντρωση σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC) στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Fukami και συνεργάτες, 1983). Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια απομόνωσης ετερότροφων, μεσόφιλων βακτηρίων προκειμένου να μελετηθεί η ποικιλότητα των βακτηριακών στελεχών και συγκεκριμένα εκείνων με αντιμικροβιακή δράση, από το υδροθερμικό πεδίο στον πυθμένα του υποθαλάσσιου ηφαίστειου Κολούμπο.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το παραπάνω υδροθερμικό πεδίο αποτελεί ένα σπάνιο περιβάλλον με ιδιαίτερη, χαρακτηριστική γεωδυναμική (Sigurdsson και συνεργάτες, 2006β). Οι ποσότητες αντιμονίου, υδραργύρου και θαλλίου που προσδιορίστηκαν ήταν οι υψηλότερες που έχουν παρατηρηθεί σε αντίστοιχα περιβάλλοντα (Kiliyas και συνεργάτες, 2013). Η σύσταση των ρευστών που εκλύονταν από τις καμινάδες και από οπές (μικροί κρατήρες) στον πυθμένα, περιείχαν κυρίως διοξείδιο του άνθρακα (99 % w/v) δημιουργώντας συνθήκες υποξίας και όξινου pH (pH~5,0), σε συνδυασμό με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίου και σιδήρου (Kiliyas και συνεργάτες, 2013). Σε μικρότερα βάθη, παρατηρήθηκε η παρουσία οξειδωμένου αμμωνίου υπό τη μορφή νιτρωδών και νιτρικών ιόντων συνοδευόμενη από την αύξηση του pH στην κολώνα του νερού, γεγονός που υποδεικνύει την κατανάλωση του εκλυόμενου CO₂ στον πυθμένα. Η οξείδωση του αμμωνίου πιθανά να οφείλεται στην κυρίαρχη παρουσία μεσόφιλων νιτρωδοποιητικών αρχαίων προκαρυωτικών

μικροοργανισμών του είδους *Nitrosopumilus maritimus*, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τους μικροβιακούς παραγωγούς άμορφου υδροξειδίου του σιδήρου στο ίζημα. Η στενή σχέση του κύκλου του σιδήρου με τον κύκλο του αζώτου που υποστηρίζεται από τους μεσόφιλους μικροβιακούς πληθυσμούς του ιζήματος και των καμινάδων, αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση οικοσυστήματος που δεν έχει προηγουμένως παρατηρηθεί σε όξινο υδροθερμικό περιβάλλον (Kilias και συνεργάτες, 2013).

4.1. Ποικιλότητα των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε μεγάλος αριθμός (832) μεσόφιλων ετερότροφων βακτηρίων από το ίζημα και την εξωτερική επιφάνεια μίας υδροθερμικής καμινάδας. Μόνο από το δείγμα της καμινάδας απομονώθηκαν βακτήρια από το θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, ενώ μικρό ποσοστό απομόνωσης παρατηρήθηκε από το υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, αντίθετα με το δείγμα ιζήματος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια του ετερότροφου μεσόφιλου βακτηριακού πληθυσμού σε συνδυασμό με τη στρατηγική προσαρμογής του στο συγκεκριμένο οικοσύστημα. Παρόμοια αποτελέσματα αφθονίας απομονωθέντων μεσόφιλων βακτηρίων αναφέρθηκαν σε μελέτη υδροθερμικού πεδίου στη νήσο Vulcano (5 m βάθος), στη Μεσόγειο (Gugliandolo και Maugeri, 1998), όπου σε αντίθεση με το υδροθερμικό πεδίο στο Κολούμπο, η εισφορά ενέργειας προερχόταν σε μεγάλο ποσοστό από τη φωτοσύνθεση. Έχει βρεθεί ότι, ο αριθμός των μεσόφιλων βακτηρίων που απομονώθηκαν από διαφορετικού τύπου οικοσυστήματα σε μεγάλα βάθη ήταν πολύ μικρός. Συγκεκριμένα, ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μελέτη του οικοσυστήματος πυκνής άλμης Urania (3.500 m βάθος) στη Μεσόγειο, με στόχο την καλλιέργεια μεσόφιλων βακτηρίων από την υπεραλατώδη εξωτερική επιφάνεια της άλμης, η οποία οδήγησε στην απομόνωση συνολικά μόνο 70 βακτηριακών στελεχών (Sass και συνεργάτες, 2001). Ένα δεύτερο παράδειγμα είναι το χαμηλό ποσοστό απομόνωσης μεσόφιλων βακτηρίων που παρατηρήθηκε από δείγματα ιζήματος σε οικοσυστήματα βαθιάς θάλασσας του Νότιου Ατλαντικού Ωκεανού (1.905 και 5.560 m βάθος) (Castro da Silva και συνεργάτες, 2013) και της Ανατολικής Μεσογείου (Gärtner και συνεργάτες, 2011). Το τελευταίο, θεωρείται ένα ιδιαίτερο ολιγοτροφικό θαλάσσιο οικοσύστημα αφού χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοκρασία σε σχέση με εκείνη που επικρατεί συνήθως στον πυθμένα (14 °C αντί 2-4 °C), γεγονός που μπορεί

να ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Gärtner και συνεργάτες, 2011).

Από τη διάκριση των 832 στελεχών, όπως προέκυψε με τη μέθοδο BOX-PCR, σχηματίστηκαν πολλές μικρές ομάδες που περιλάμβαναν λιγότερα από 10 πρότυπα BOX. Τα 89 από τα 832 συνολικά πρότυπα BOX απαντήθηκαν μία μόνο φορά και προέρχονταν από στελέχη που απομονώθηκαν και από τα τρία θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τόσο από το ίζημα όσο και από την καμινάδα. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν το μεγάλο ποσοστό ποικιλότητας του απομονωθέντος μεσόφιλου βακτηριακού πληθυσμού σε επίπεδο στελεχών.

4.2. Αντιμικροβιακή δράση όλων των μοναδικών βακτηριακών στελεχών

Όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα (§ 3.1.ε.) έγινε έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη έναντι 18 επιλεγμένων μικροβιακών δεικτών. Από τα 230 διαφορετικά στελέχη που προέκυψαν σύμφωνα με την ομαδοποίηση της BOX-PCR, μόνο τα 41 δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση έναντι κανενός από τους 18 μικροβιακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα στελέχη αυτά περιλαμβάνονταν σε μικροβιακές ομάδες μικρής ποικιλότητας (λιγότερα από 10 στελέχη) και αποτελούσαν ένα μικρό ποσοστό του απομονωθέντος συνολικού μεσόφιλου βακτηριακού πληθυσμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του βιοελέγχου *in vitro*, τα στελέχη με αντιμικροβιακή δράση εκτός του ότι ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο αρνητικών ή μόνο θετικών κατά Gram βακτηρίων, ανέστειλαν και την ανάπτυξη είτε θετικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων, είτε θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ευκαρυωτικών δεικτών, γεγονός που υποδεικνύει την ευρεία και έντονη μεταβολική τους δραστηριότητα. Παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός στελεχών με αντιμικροβιακή δράση και αυτό ίσως υποδηλώνει πως η δραστηριότητα αυτή αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα του απομονωθέντος μεσόφιλου πληθυσμού. Το ποσοστό (89%) των στελεχών με αντιμικροβιακή δράση βρέθηκε να είναι κατά πολύ μεγαλύτερο συγκριτικά με ανάλογες μελέτες σε βακτήρια διαφορετικών θαλάσσιων ενδιατημάτων όπως την κολώνα του νερού από δείγματα που συλλέχθηκαν κοντά στην ακτή στην Ανατολική Θάλασσο της Κίνας (Zheng και συνεργάτες, 2005). Στη

συγκεκριμένη περίπτωση η παρατήρηση ίσως να οφείλεται στο ότι τα θαλάσσια βακτήρια περνούν μεγάλο μέρος της ζωής τους αιωρούμενα, προσπαθώντας να προσκολληθούν σε διαθέσιμες επιφάνειες και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών ίσως αποτελεί περιττή κατανάλωση ενέργειας. Αντίθετα, η έκκριση αντιμικροβιακών ουσιών κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίων, όπως συμβαίνει στην παρούσα μελέτη, φαίνεται να ρυθμίζει τη σύσταση των βακτηριακών πληθυσμών όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Long και Azam, 2001, Rao και συνεργάτες, 2005). Οι Yan και συνεργάτες (2003) παρατήρησαν σε μελέτη για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από στελέχη των ειδών *B. licheniformis* και *B. subtilis*, ότι τα στελέχη αυτά εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση μόνο κατά την ανάπτυξή τους σε βιοϋμένια κι όχι σε υγρές κλειστές καλλιέργειες. Η παραπάνω διαπίστωση ενισχύει και τα συμπεράσματα των Mearns-Spragg και συνεργατών (1998), σύμφωνα με τους οποίους, θαλάσσια βακτήρια οργανωμένα σε βιοϋμένια εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση ως απάντηση σε άλλους βακτηριακούς πληθυσμούς που τα περιβάλλουν, αφού η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών φαίνεται να επηρεάζεται από ρυθμιστικά επαγωγικά μόρια που απελευθερώνονται στο εσωτερικό των βιοϋμενίων.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι, το ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης που παρατηρήθηκε στο συγκεκριμένο οικοσύστημα ήταν υψηλότερο συγκριτικά με αντίστοιχες μελέτες σε μικροβιακούς τάπητες, προσκολλημένους τόσο σε αβιοτικές επιφάνειες (Nithya και συνεργάτες, 2010) όσο και στην επιφάνεια ασπόνδυλων που συνήθως εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό αναστολής ανάπτυξης των μικροβιακών δεικτών, πιθανά λόγω της στενής σχέσης και αλληλεπίδρασης μεταξύ των βακτηρίων και του ξενιστή (Penesyan και συνεργάτες, 2009).

Ένα άλλο σημείο που θα πρέπει να τονιστεί είναι ότι εκτός από την αναστολή της ανάπτυξης βακτηριακών δεικτών, διαπιστώθηκε και η έντονη αντιμυκητιακή δράση των εξεταζόμενων απομονωθέντων στελεχών από το Κολούμπο. Οι αντιμυκητιακές ουσίες που παράγουν τα θαλάσσια βακτήρια προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στον ανταγωνισμό για την προσκόλλησή τους σε επιφάνειες και η δράση αυτή αποτελεί την προκαταρκτική διαδικασία δημιουργίας μεικτών μικροβιακών πληθυσμών σε υμένα. Μελέτες σε πειράματα ταυτόχρονου εμβολιασμού ζυμών και βακτηρίων σε ελεύθερες επιφάνειες, παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη των πληθυσμών των ζυμών διακόπηκε μετά το πέρας της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων (φάση επιβράδυνσης της αύξησης), κατά την οποία τα βακτήρια αρχίζουν να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες (Franks και συνεργάτες, 2006). Στην

παρούσα εργασία επίσης, παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης της ζύμης *Candida albicans* και του νηματοειδή μύκητα *Aspergillus niger*. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παρουσία πληθυσμών του γένους *Candida* και *Aspergillus*, σε υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας (Burgaud και συνεργάτες, 2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό (62 %) των στελεχών με αντιμικροβιακή δράση παρατηρήθηκε ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*, ενός μύκητα που επικρατεί σε ριζικά οικοσυστήματα. Αν και φαινομενικά, το οικοσύστημα της ριζόσφαιρας και τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας φαίνεται να διαφέρουν πολύ μεταξύ τους, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, πιθανά να υπάρχουν ομοιότητες στο οργανικό και ανόργανο υλικό και ίσως και στον μεταβολισμό των μεσόφιλων βακτηριακών πληθυσμών. Στη ριζόσφαιρα, οι μεταβολές των φυσικοχημικών παραμέτρων (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση CO₂ και H₂O) κατά την εναλλαγή ημέρας-νύχτας, υποχρεώνουν τους μικροοργανισμούς να υιοθετούν ειδικές στρατηγικές προσαρμοστικότητας προκειμένου να επιβιώσουν. Σύμφωνα με μεταγονιδιωματική μελέτη του μεταβολισμού βακτηρίων στη ριζόσφαιρα, ανιχνεύθηκαν εκτός των άλλων, γονίδια ανάλογα με εκείνα που βρέθηκαν σε μικροβιακούς πληθυσμούς από υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, για τη δέσμευση και αποθήκευση σιδήρου και αζώτου και την εξουδετέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (Xie και συνεργάτες, 2011, Sessitsch και συνεργάτες, 2012). Τα παραπάνω οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση οργανικών ενώσεων σε μεγάλες συγκεντρώσεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλης συγκέντρωσης βιομάζας, σε σύγκριση με τα περιβάλλοντα οικοσυστήματα. Στην περίπτωση της ριζόσφαιρας, η μετακίνηση κι εγκατάσταση των βακτηριακών πληθυσμών από το ολιγοτροφικό περιβάλλον του εδάφους προς τη ρίζα επιτυγχάνεται με τη χρήση μαστιγίων και την παραγωγή λιποπεπτιδίων όπως η σουρφακτίνη, που μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ υποστρώματος και κυττάρου, καθιστώντας δυνατή την εξάπλωση των βακτηρίων πάνω σε μία επιφάνεια (Raaijmakers και συνεργάτες, 2008, Ortega-Morales και συνεργάτες, 2008). Διαπιστώθηκε επίσης ότι εκτός από την κίνηση, τα λιποπεπτίδια αυτά αναστέλλουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως το λιποπεπτίδιο μασσετολίδη A που παράγεται από στελέχη του είδους *Pseudomonas fluorescens* (Tran και συνεργάτες, 2007).

Η σύνθεση αντιμυκητιακών λιποπεπτιδίων που παράγονται από στελέχη του γένους *Bacillus* θεωρείται ο πιθανότερος μηχανισμός αναστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων και φαίνεται να συνδέεται με τη σύνθεση μαστιγίων, την ικανότητα δέσμευσης και αποθήκευσης σιδήρου, τη δέσμευση/απομάκρυνση του N₂ και την αναγωγή οξειδωτικών ενώσεων (Ortega- Morales και συνεργάτες, 2008). Εκτός από την παρούσα εργασία, έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες η αναστολή της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων, από βακτήρια θαλάσσιας προέλευσης του γένους *Bacillus* που απομονώθηκαν από βιοϋμένια προσκολλημένα σε μακροφύκη και σε βραχώδεις ακτές (Menge και Branch, 2001, Elkahoui και συνεργάτες, 2011).

4.3. Πολυενεργά βακτηριακά στελέχη

42 από τα 230 εξεταζόμενα μοναδικά βακτηριακά στελέχη εμφάνισαν ευρεία κι επαναλαμβανόμενη αντιμικροβιακή δράση (πολυενεργά). Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA των 42 πολυενεργών στελεχών, τα 35 ανήκουν στο γένος *Bacillus*, εκ των οποίων το 91 % ανήκει στην ομάδα *Bacillus subtilis* που περιλαμβάνει τα είδη *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. licheniformis* και *B. pumilus* (Liu και συνεργάτες, 2013). Τα υπόλοιπα 7 πολυενεργά στελέχη ανήκουν στις τάξεις των α-πρωτεοβακτηρίων, γένος *Loktanella* και γ-πρωτεοβακτηρίων, γένη *Pseudomonas* και *Halomonas*. Τα στελέχη αυτά εμπόδισαν την ανάπτυξη τόσο συγγενικών όσο και ταξινομικά μακρινών βακτηριακών δεικτών. Παρατηρήθηκε ότι διαφορετικά στελέχη που ανήκαν στο ίδιο γένος ή και στο ίδιο είδος, απομονώθηκαν από διαφορετικά εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα τόσο από το δείγμα ιζήματος όσο και από το δείγμα καμινάδας.

Το μεγάλο ποσοστό πολυενεργών στελεχών (83 %) που ανήκουν στο γένος *Bacillus* δε συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη μεταγονιδιωματικής ανάλυσης του μεσόφιλου πληθυσμού του ίδιου οικοσυστήματος, σύμφωνα με την οποία τα πρωτεοβακτήρια αποτελούσαν το μεγαλύτερο μέρος του μεσόφιλου βακτηριακού πληθυσμού (Kilias και συνεργάτες, 2013). Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι σπάνια συμφωνούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους απομόνωσης με εκείνα που βασίζονται σε μοριακές τεχνικές (Gontang και συνεργάτες, 2007, Gärtner και συνεργάτες, 2011). Το γεγονός αυτό αφορά κυρίως σε θετικά κατά Gram βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια με αποτέλεσμα να μην

αναφέρονται σε βιβλιοθήκες κλώνων ακόμα κι όταν έχει γίνει προηγουμένως προσπάθεια λύσης των σπορίων (Gontang και συνεργάτες, 2007).

Το ίζημα αποτελεί το κυριότερο θαλάσσιο οικοσύστημα από το οποίο έχουν ανακτηθεί στελέχη του γένους *Bacillus* (Austin, 1988), ενώ τα είδη *B. pumilus* και *B. subtilis* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό στελεχών του γένους *Bacillus* που έχουν ανιχνευθεί σε βιοϋμένια, στο θαλάσσιο περιβάλλον (Liu και συνεργάτες, 2013). Απομονωθέντα στελέχη του γένους *Bacillus* από υδροθερμικό πεδίο στον κόλπο της Καλιφόρνια (βάθος 1.500 m), αναπτύχθηκαν σε μεγάλο εύρος διαφορετικών τιμών θερμοκρασίας και αλατότητας και ήταν υπεύθυνα για την οξείδωση του διαλυμένου μαγγανίου Mn(II), το οποίο ανιχνεύθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο υδροθερμικό ρευστό (Dick και συνεργάτες, 2006). Εκτός από τα προϊόντα οξείδωσης του μαγγανίου, σε υδροθερμικά οικοσυστήματα παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα σε οξειδωτική καταπόνηση όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Στελέχη των ειδών *B. subtilis* και *B. licheniformis* καταφέρνουν να επιβιώνουν στις παραπάνω τοξικές συνθήκες, χάρη σε εξειδικευμένους ρυθμιστικούς μεταγραφείς που ανιχνεύθηκαν στο γονιδίωμά τους και είναι υπεύθυνοι για την εξουδετέρωση των οξειδωτικών παραγόντων, την προστασία των μακρομορίων και την επιδιόρθωση ή απομάκρυνση των μορίων που έχουν καταστραφεί (Zuber, 2009). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε μεγάλο ποσοστό (50 %) των πολυενεργών στελεχών να ανήκουν στο είδος *B. pumilus*. Έχει διαπιστωθεί ότι στελέχη αυτού του γένους, επιβιώνουν σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκριτικά με τα συγγενικά είδη *B. subtilis* και *B. licheniformis* χάρη σε έναν εξειδικευμένο μηχανισμό εξουδετέρωσης των δραστικών μορφών οξυγόνου που ανιχνεύθηκε στο γονιδίωμά τους (Handtke και συνεργάτες, 2014). Εκτός από την προσαρμογή τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις οξειδωτικών ουσιών, στελέχη του είδους *B. pumilus* διαπιστώθηκε πως είναι πολύ ανθεκτικά και στην υπεριώδη ακτινοβολία γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την παρουσία τους υπό μορφή βιώσιμων σπορίων σε ακραία περιβάλλοντα, όπως τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, που χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές αυτής της ακτινοβολίας (Jolivet και συνεργάτες, 2003, Kempf και συνεργάτες, 2005).

Ο συντονισμός της γονιδιακής έκφρασης που επιτελείται κατά την έκθεση των βακτηριακών στελεχών της ομάδας *Bacillus subtilis* σε παράγοντες καταπόνησης, επιφέρει τη συλλογική απενεργοποίηση μέρους του πληθυσμού, προκειμένου να διασφαλιστεί η επιβίωση των ανθεκτικών στελεχών. Κατά το αρχικό στάδιο

δημιουργίας ενδοσπορίων από στελέχη αυτού του είδους, έχει ανιχνευθεί η παραγωγή του παράγοντα Skf (killing factor) που προκαλεί τη λύση συγγενικών κυττάρων, τα οποία δε σχηματίζουν ενδοσπόρια (Gonzalez-Pastor και συνεργάτες, 2003). Δεδομένου ότι ο παράγοντας Skf μπορεί να αναστείλει και την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (Lin και συνεργάτες, 2001), η παραγωγή του θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη της άμεσης σχέσης μεταξύ της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και της δημιουργίας ενδοσπορίων (Stein, 2005, Fickers, 2012).

Εκτός από τα 35 στελέχη που ανήκουν στο γένος *Bacillus*, τα υπόλοιπα 7 πολυενεργά στελέχη ανήκουν στην ομάδα των πρωτεοβακτηρίων. Το στέλεχος C54 ανήκει στο είδος *Loktanella hongkongensis*, της οικογένειας *Roseobacteriaceae* των α -πρωτεοβακτηρίων. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τα μοναδικά στελέχη που έχουν απομονωθεί σε καθαρή καλλιέργεια από την τάξη των α -πρωτεοβακτηρίων, η οποία αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ετερότροφων βακτηρίων που απαντάται στο θαλάσσιο περιβάλλον (Cottrell και Kirchman, 2000). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο οικολογικός ρόλος των στελεχών της οικογένειας *Roseobacter* συνδέεται με την παρεμπόδιση της προσκόλλησης άλλων βακτηριακών ειδών σε μικροβιακούς τάπητες στους οποίους αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό, χάρη στην έκκριση δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακή δράση (Wagner-Dobler και συνεργάτες, 2004). Επιπρόσθετα, το ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης στελεχών της οικογένειας *Roseobacteriaceae* που απομονώθηκαν από βιοϋμένια από τις ακτές της Νότιας Καλιφόρνια, ήταν πολύ μεγαλύτερο συγκριτικά με το ποσοστό στελεχών της ίδιας οικογένειας, που απομονώθηκαν από την κολώνα του νερού τόσο στις ίδιες θέσεις δειγματοληψίας όσο και σε μεγαλύτερη απόσταση από την ακτή (Long και Azam, 2001).

Ένα άλλο πολυενεργό στέλεχος της παρούσας εργασίας ήταν το στέλεχος *Halomonas sulfidaeris* S453 που ανήκει στην τάξη των γ -πρωτεοβακτηρίων. Στελέχη του γένους αυτού έχουν απομονωθεί από βιοϋμένια προσκολλημένα σε διαβρωμένο βασάλτη και σουλφιδικές καμινάδες υδροθερμικού πεδίου στο υποθαλάσσιο όρος Loihi (Hawaii, βάθος 1.174 m), τα οποία οξειδώνουν αναγωγικές μορφές σιδήρου και μαγγανίου [Fe(II), Mn(II)], καθώς και πολλές διαφορετικές κατηγορίες οργανικών ενώσεων (Kaye και Baross, 2000). Ένα από τα παραπάνω στελέχη βρέθηκε να παράγει τις πιο υδρόφιλες από τις αμιφιφιλικές πεπτιδικές σιδηροφόρες που αναφέρονται έως σήμερα στη βιβλιογραφία, τις λοϊχικελίνες A–F (Homann και συνεργάτες, 2009).

Τα υπόλοιπα από τα πολυενεργά στελέχη αυτής της εργασίας ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* της τάξης των γ- πρωτεοβακτηρίων που θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα γένη για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (Giancarlo και Rolando, 1993). Στελέχη του γένους *Pseudomonas* έχουν απομονωθεί από ίζημα σε μεγάλα βάθη όπως στην τάφρο Mariana, το πιο βαθύ σημείο του ωκεάνιου πυθμένα (~ 11.000 m βάθος) (Kato και συνεργάτες, 1997, Xu και συνεργάτες, 2007).

4.4. Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών σε καθαρή μορφή από το στέλεχος *Pseudomonas psychrotolerans* S222

Στην παρούσα μελέτη από το στέλεχος S222 που ανήκει στο είδος *Pseudomonas psychrotolerans* απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή 3 μεταβολίτες που ανήκουν στην οικογένεια των 2,5 δικετοπιπεραζινών και είναι γνωστές για την ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση (Fdhila και συνεργάτες, 2003, Stark και Hofmann, 2005, Campbell και συνεργάτες, 2009, Wang και συνεργάτες, 2012). Οι δικετοπιπεραζίνες είναι τα μικρότερα γνωστά κυκλικά πεπτίδια και παράγονται από το 90 % των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αλλά και από θετικά κατά Gram βακτήρια, μύκητες και ανώτερους οργανισμούς. Οι σημαντικές αυτές ιδιότητες προκύπτουν από τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση της επικοινωνίας μεταξύ βακτηριακών στελεχών και τον έλεγχο δημιουργίας βιοϋμενίων, προστατεύοντας τον μικροοργανισμό από τις ικές λοιμώξεις και καταστέλλοντας ανταγωνιστικούς πληθυσμούς βακτηρίων ή μυκήτων (De Carvalho και Abraham, 2012).

4. 5. Ανίχνευση των υπεύθυνων γονιδίων για την αντιμικροβιακή δράση

Συμπληρωματικά στην παρούσα μελέτη, στο γονιδίωμα ορισμένων από τα παραπάνω πολυενεργά στελέχη του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas*, ανιχνεύθηκαν γονίδια, υπεύθυνα για τη σύνθεση πολυκετιδίων και πεπτιδίων μη ριβοσωμικής προέλευσης, δύο από τις μεγαλύτερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων, με ευρεία αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και αντιπαρασιτική δράση (Gulder και Moore, 2009). Τα γονίδια αυτά που δεν αποτελούν σύνθετες συστατικό του προκαρυωτικού γονιδιώματος, ανιχνεύονται σε επίπεδο στελέχους (Fischbach και Walsh, 2006) και χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος (> 5 kb) που οδηγεί στην υπόθεση πως ίσως προέρχονται από τη συνένωση περισσότερων γονιδίων. Συνήθως ανιχνεύονται σε μη

παθογόνα περιβαλλοντικά στελέχη, τα οποία χαρακτηρίζονται από αργούς κύκλους αναπαραγωγής και τη δυνατότητα ανάπτυξης σε εναλλασσόμενες συνθήκες διαθεσιμότητας θρεπτικών και ασιτίας. Οι συνθήκες αυτές φαίνεται να ευνοούν τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών που ενισχύουν την προστασία των παραγωγών τους από τους ανταγωνιστές ή τους θηρευτές τους, αυξάνοντας έτσι την προσαρμοστικότητά τους σε αντίξοες συνθήκες. Ωστόσο, η υλοποίηση της πληροφορίας που περιλαμβάνουν αυτά τα γιγάντια γονίδια συνδέεται με υψηλό κόστος ενέργειας, χρόνου και διαθέσιμου υποστρώματος και αντανακλά το σημαντικό όφελος των μικροοργανισμών από την έκφρασή τους για την παραγωγή των αντιμικροβιακών μεταβολιτών (Riva και Tumbler, 2008).

4.5.1. Ανίχνευση γονιδίων πολυκετιδικών συνθασών (PKS)

Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της β-κετοακύλ-συνθάσης (KS), το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε έξι από τα 42 πολυενεργά στελέχη. Δύο από τις έξι κετοακύλ-συνθάσες εμφάνισαν υψηλή ομοιότητα με υβριδικές NRPS/PKS και οι υπόλοιπες τέσσερις ήταν συγγενικές με (KS) τύπου *trans*-AT. Ο τύπος *trans*-AT PKS προέρχεται από πολλαπλούς συνδυασμούς οριζόντιας μεταφοράς πρωτεϊνικών κετοσυνθασών (KS) και παρουσιάζει χαρακτηριστικά που απέχουν από την κανονική αρχιτεκτονική των συστημάτων *cis*-AT (Nguyen και συνεργάτες, 2008). Οι *trans*-AT PKS έχουν ανιχνευθεί σε βακτήρια από σπάνια και ιδιαίτερα οικοσυστήματα κι έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων πολυκετιδίων με αντιβιοτική (μουπιροσίνη, στρεπτογραμίνη) και αντικαρκινική δράση (βρουστατίνη) (Piel, 2010). Στην παρούσα εργασία, τα γονίδια (KS) τύπου *trans*-AT είχαν υψηλή συγγένεια με (KS) που απομονώθηκαν από συμβιωτικά βακτήρια σπόγγων από τη Νότια Θάλασσα της Κίνας (Zhang και συνεργάτες, 2008). Αν και οι σπόγγοι θεωρούνται απλοί και πρωτόγονοι ζωικοί οργανισμοί, χαρακτηρίζονται από ένα πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα που τους επιτρέπει να επιβιώνουν και να προστατεύονται από ανταγωνιστικά είδη, θηρευτές και παθογόνους μικροοργανισμούς. Η άμυνα αυτή οφείλεται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από τους μικροοργανισμούς που φιλοξενούνται στον ιστό τους κι αποτελούν το 40 % του όγκου τους με πυκνότητα $\sim 10^9$ κύτταρα/ml, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο θαλασσινό νερό ($\sim 10^5$ κύτταρα/ml). Η έκκριση αμμωνίου από τον σπόγγο, ως προϊόν του καταβολισμού

του, η συσσώρευση και στη συνέχεια η οξείδωση του αμμωνίου από αρχαίους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς του είδους *Nitrosopumilus maritimus* χαρακτηρίζουν τον κύκλο του αζώτου στο συγκεκριμένο οικοσύστημα (Walker και συνεργάτες, 2010). Η μεγάλη συσσώρευση βιομάζας σε σχέση με το περιβάλλον ωκεάνιο νερό, η χημιοαυτότροφη δέσμευση ανόργανου άνθρακα CO₂, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις θείου και αζώτου και η ανίχνευση γονιδίων για την εξάλειψη ή επισκευή μακρομορίων που έχουν υποστεί βλάβη από τις τοξικές δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται (Li και συνεργάτες, 2014), θα μπορούσαν να αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά ανάμεσα στο ενδιαίτημα του θαλάσσιου σπόγγου και του υδροθερμικού πεδίου του Κολούμπο. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, κοινό χαρακτηριστικό των μεσόφιλων πληθυσμών υδροθερμικού πεδίου και θαλάσσιου σπόγγου αποτελεί και η ανίχνευση μεγάλου ποσοστού γονιδίων που κωδικοποιούν τρανσποζάσες, οι οποίες ευθύνονται για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και θα μπορούσαν να εξηγήσουν την παρουσία των γονιδίων *trans*-AT (PKS) (Xie και συνεργάτες, 2011, Liu και συνεργάτες, 2012).

4.5.2. Ανίχνευση γονιδίων μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθασών (NRPS)

Επιπρόσθετα, πολλά από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά πεπτίδια συνθέτονται από τις μη ριβοσωμικές συνθασές (NRPS) και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλότητα στη δομή και τη λειτουργία τους. Η ποικιλότητα στη δομή εξαρτάται από τον διαφορετικό αριθμό των καταλυτικών περιοχών, την ποικιλία των ενεργοποιημένων αμινοξέων από τις αδενυλικές πρωτεϊνικές περιοχές ή/και την προσθήκη δευτερευόντων τροποποιημένων περιοχών (Schwarzer και συνεργάτες, 2003). Όλες οι αδενυλικές περιοχές που απομονώθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία από τα πολυενεργά στελέχη είχαν υψηλή ομοιότητα με αδενυλικές περιοχές (NRPS). Ορισμένες από αυτές ήταν συγγενικές με υπομονάδες γνωστών πεπτιδίων για την αντιμικροβιακή τους δράση. Δύο από τις αλληλουχίες στελεχών του γένους *Pseudomonas* είχαν υψηλή ομοιότητα με την υπομονάδα D της γραμμικής γραμισιδίνης, η οποία χαρακτηρίζεται από έναν σχετικά σπάνιο τύπο κατάληξης της αλυσίδας από μία αναγωγή (R) (Du και Lou, 2010). Η γραμμική γραμισιδίνη αναστέλλει την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων ανάπτυξής τους, αντίθετα με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες (β-λακτάμες,

κινολόνες) που αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων μόνο κατά τη φάση της εκθετικής αύξησης (Xiong και συνεργάτες, 2005). Συγκριτικά με άλλα πεπτίδια, εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης, η οποία οφείλεται κυρίως στην παραγωγή και διάχυση τοξικών υδροξυλικών ανιόντων (Liou και συνεργάτες, 2015).

Οι αλληλουχίες του γονιδίου (NRPS) τριών στελεχών *Bacillus* ήταν συγγενικές με τις υπομονάδες των αντιβιοτικών τυροσιδίνη C και βακιτρακίνη A, δύο αμφιφιλικών κυκλικών πεπτιδίων, οι υδρόφιλες ομάδες των οποίων, σχηματίζουν δεσμούς με τη φωσφορική ομάδα των λιπιδίων του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και το αποσταθεροποιούν. Ταυτόχρονα, το υδρόφοβο τμήμα τους εισέρχεται στη μεμβράνη, δημιουργώντας ένα κανάλι που προκαλεί τη θραυσματοποίησή της και κατ' επέκταση τη λύση του κυττάρου. Λόγω των δεσμών που συνάπτουν με τα φωσφολιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος, τα δύο αυτά αντιβιοτικά προκαλούν την αναστολή της ανάπτυξης κυρίως θετικών κατά Gram βακτηρίων (Ming και Epperson, 2002, Marques και συνεργάτες, 2007). Επίσης, έχει παρατηρηθεί η αντιμυκητιακή δράση της τυροσιδίνης ενάντια σε νηματοειδείς μύκητες και τη δημιουργία βιοϋμενίων από στελέχη του είδους *Candida albicans*, λόγω της μεταβολής της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης της ζύμης, που πραγματοποιείται χάρη στους δεσμούς της τυροσιδίνης με την εργοστερόλη, ένα σημαντικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης (Troskie και συνεργάτες, 2014). Η ανθεκτικότητα πολλών παθογόνων μικροοργανισμών στη βακιτρακίνη και την τυροσιδίνη παρατηρείται σπάνια, λόγω της πολύπλοκης και ενεργειακά δαπανηρής διαδικασίας που απαιτείται για να τροποποιηθεί η σύσταση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης ώστε να μην δεσμεύονται από τα παραπάνω αντιβιοτικά. Το γεγονός αυτό, καθώς και η αδυναμία δημιουργίας δεσμών με τη χοληστερόλη, το φωσφολιπίδιο της μεμβράνης των πολυκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών, έχουν ως αποτέλεσμα, η βακιτρακίνη και η τυροσιδίνη να αποτελούν αντικείμενο μελέτης στην προσπάθεια για την καταπολέμιση των πολυανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών (Marques και συνεργάτες, 2007).

Η πλειονότητα των αδενυλικών περιοχών που ανιχνεύθηκαν, ήταν συγγενικές με το λιποπεπτίδιο σουρφακτίνη και προέρχονταν από στελέχη του γένους *Bacillus*, ενώ η αδενυλική περιοχή που απομονώθηκε από στέλεχος του γένους *Pseudomonas* εμφάνισε υψηλή συγγένεια με την υπομονάδα (A) της λιχενισίνης. Τα λιποπεπτίδια σουρφακτίνη και λιχενισίνη έχουν αντιβακτηριακή, αντική και αιμολυτική δράση

τροποποιώντας τη διαπερατότητα και διαλυτότητα της μεμβράνης του κυττάρου στόχου. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η αναστολή του σχηματισμού βιοϋμενίων ανταγωνιστικών βακτηρίων, εμποδίζοντας την προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες (Roongsawang και συνεργάτες, 2011). Η ποικιλία στη δομή των παραπάνω λιποπεπτιδίων επηρεάζει εκτός από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μικυλλιοποίηση, μείωση της επιφανειακής τάσης) και τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, ώστε να εμφανίζουν ευρεία αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Peypoux και συνεργάτες, 1999, Bonmatin και συνεργάτες, 2003). Λόγω της αμφιφιλικής τους δομής, η σουρφακτίνη και η λιχενισίνη σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και δημιουργούν συσσωματώματα που δεν αναμειγνύονται, αλλά αλληλεπιδρούν κι αλλοιώνουν τις ιδιότητες των συστατικών της, προκαλώντας ανισορροπία της ιοντικής ροής και κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα με άλλα λιποπεπτίδια που δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων λόγω της προστασίας που τους προσφέρει η εξωτερική τους μεμβράνη (Nybroe και Sørensen, 2004), η σουρφακτίνη έχει ευρεία αντιμικροβιακή δράση ενάντια τόσο σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπως στελέχη του είδους *B. cereus* (Huang και συνεργάτες, 2007), όσο και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως στην περίπτωση φυτοπαθογόνων στελεχών του είδους *Xanthomonas campestris* (Etchegaray και συνεργάτες, 2008) και *P. syringae* (Bais και συνεργάτες, 2004) καθώς και παθογόνων στελεχών μυκοπλάσματος (Vollenbroich και συνεργάτες, 1997α). Ωστόσο, η αντιμυκητιακή της δράση δεν παρατηρείται συχνά, αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις η σουρφακτίνη προκάλεσε τη διόγκωση των μυκηλιακών υφών και την αναστολή της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Magnaporthe grisea* (Tendulkar και συνεργάτες, 2007), προκαλώντας την αύξηση της συρροής ιόντων Ca^{2+} και H^+ στην κυτταρική μεμβράνη (Thrane και συνεργάτες, 1999). Η σουρφακτίνη είναι επίσης υπεύθυνη για την απενεργοποίηση πολλών και διαφορετικών ειδών ιών επιδρώντας στον λιποπεπτιδικό τους μανδύα, που οδηγεί στην αποσύνθεση των ιικών μορίων (Vollenbroich και συνεργάτες, 1997β, Huang και συνεργάτες, 2006).

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, στελέχη των ειδών *B. subtilis* και *B. licheniformis* που απομονώθηκαν από διάφορα ακραία οικοσυστήματα (Price και συνεργάτες, 2007), παρήγαγαν διαφορετικούς τύπους λιποπεπτιδίων, που πιθανά συνεισέφεραν στον αποτελεσματικό ανταγωνισμό των βακτηριακών παραγωγών τους με τις

προϋπάρχουσες μικροβιακές κοινότητες και την προσαρμογή τους σε αλλαγές αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων.

Τα λιποπεπτίδια σουρφακτίνη και λιχενισίνη, εκτός από την ευρεία αντιμικροβιακή δράση, συμμετέχουν στη δημιουργία βιοϋμενίων και την προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες. Η παραγωγή τους ρυθμίζεται από τη διακυτταρική επικοινωνία και συνδέεται με την παρουσία τοξικών δραστικών μορφών οξυγόνου ή με την αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας, η οποία προωθεί και την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Danhorn και Fuqua, 2007). Κατά την προσκόλληση σε επιφάνειες, με την παραγωγή σουρφακτίνης, αυξάνεται η υγρανσιμότητα των υδροφοβικών τμημάτων των κυττάρων καθώς και η διαλυτότητα και η διάχυση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Lindow και Brandl, 2003). Η αύξηση της επιφανειακής τάσης οδηγεί στη συνάθροιση των κυττάρων σε δενδρίτες και την αποτελεσματική συντονισμένη τους μετατόπιση (Daniels και συνεργάτες, 2006).

Συνοψίζοντας, από την παρούσα εργασία είναι δυνατόν να καταλήξουμε στα παρακάτω γενικά συμπεράσματα:

- Τα δεδομένα υποστηρίζουν υψηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα των μεσόφιλων στελεχών σε σύγκριση με άλλα οικοσυστήματα βαθιάς θάλασσας.
- Η δεδομένη ανάπτυξη των παραπάνω στελεχών σε περισσότερα του ενός εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα υποστηρίζει την πιθανή ικανότητα αποίκησης αυτών των στελεχών σε μεγάλου εύρους διαφορετικού τύπου οικοσυστημάτα.
- Βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης (82 %) συγκριτικά με αντίστοιχες μελέτες σε μικροβιακούς τάπητες (35 %).
- Εκφράστηκε έντονη αντιμυκητιακή δράση των εξεταζόμενων απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών κυρίως ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε βιοτεχνολογική εφαρμογή στο βιοέλεγχο των καλλιεργειών.

- 42 από τα 832 απομονωθέντα μεσόφιλα βακτηριακά στελέχη είναι **πολυενεργά** και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Τα ανωτέρω πολυενεργά στελέχη έδειξαν να έχουν τα παρακάτω βασικά χαρακτηριστικά τα οποία θα τα έκαναν πολύ ενδιαφέροντα για περαιτέρω έρευνα:

1. Απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή 3 μεταβολίτες από το πολυενεργό στέλεχος *Pseudomonas psychrotolerans* S222 που ανήκουν στην οικογένεια των 2,5 δικετοπιπεραζινών, γνωστές για την ισχυρή αντιμικροβιακή τους δράση.
2. Το γονίδιο της β-κετοακύλ-συνθάσης (KS) ανιχνεύθηκε σε έξι από τα 42 πολυενεργά στελέχη.
3. Βρέθηκε υψηλή ομοιότητα των αδενυλικών περιοχών που απομονώθηκαν από τα πολυενεργά στελέχη, με αδενυλικές περιοχές (NRPS).
4. Έγινε ανίχνευση παράγωγων σουρφακτίνης, από πολυενεργά στελέχη του γένους *Bacillus* και παράγωγου λιχενισίνης από στέλεχος του γένους *Pseudomonas*. Τα παραπάνω λιποπεπτίδια φαίνεται να αποτελούν σημαντικό μηχανισμό προσαρμογής των βακτηριακών στελεχών στο υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο.
5. Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων, έγινε συσχέτιση των οικοσυστημάτων θαλάσσιου σπόγγου και ριζόσφαιρας που χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία και διατήρηση υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας σε αντίθεση με το υπόλοιπο οικοσύστημα της περιοχής, με το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο. Η συσχέτιση αυτή προκύπτει από την ανίχνευση παράγωγων σουρφακτίνης και λιχενισίνης, το μεγάλο ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης ενάντια στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* και την υψηλή ομοιότητα των απομονωθέντων *trans*-AT (PKS) γονιδίων με αντίστοιχα απομονωθέντα από συμβιωτικά στελέχη θαλάσσιων σπόγγων.
6. Στα περισσότερα απομονωθέντα στελέχη ενάντια σε παθογόνα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων, έγινε ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης και παραγωγή των αντιμικροβιακών ουσιών (γραμισιδίνη, βακιτρακίνη και τυροσιδίνη). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα του μεταβολικού προφίλ των απομονωθέντων στελεχών, στην προσπάθεια καταπολέμησης των παθογόνων πολυανθεκτικών μικροοργανισμών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alain K., Olagnon M., Desbruyeres D., Page A., Barbier G., Juniper S. K., Querellou J. and Cambon-Bonavita M.A. (2002) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 42, 463–476.
- Alain K., Zbinden M., Le Bris N., Lesongeur F., Gaill F. and Cambon-Bonavita M.A. (2004) Early steps of microbial colonization process at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*, 6, 227–241.
- Alain K. and Querellou J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, Springer Verlag (Germany), 13, 4, 583-594.
- Amend, J.P., McCollom T.M., Hentscher M. and Bach W. (2011) Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 5, 736-748.
- Antibus D.E., Leff L.G., Hall B.L., Baeseman J.L. and Blackwood C. (2012) Cultivable bacteria from ancient algal mats from the Mcmurdo dry valleys, Antarctica. *Extremophiles*, 16, 105-114.
- Atlas R.M. (1993) *Handbook of Microbiological Media*. Parks L.C. (Eds), Boca Raton, FL: CRC Press.
- Austin B. (1988) *Marine microbiology*. Cambridge University Press, New York.
- Bais H.P., Fall R. and Vivanco J.M. (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134, 307–319.
- Balch W.E. and Wolfe R.S. (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethane-sulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 781-791.
- Barry S.M. and Challis G.L. (2009) Recent advances in siderophores biosynthesis. *Current opinion in chemical biology*, 13, 205-215.
- Behnken S. and Hertweck C. (2012) Cryptic polyketide synthase genes in non-pathogenic *Clostridium* spp. *PloS One*, 7, 1, e29609.

- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdano-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R. and James K.D. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417, 141–147.
- Bérdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites, a personal view. *Journal of Antibiotics*, 58, 1, 1–26.
- Bergendahl V., Linne U. and Marahiel M.A. (2002) Mutational analysis of the C domain in nonribosomal peptide synthesis. *European Journal of Biochemistry*, 269, 620–29.
- Bonmatin J.M., Laprevote O. and Peypoux F. (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 541–556.
- Brachmann A.O., Joyce S.A., Jenke-Kodama H., Schwar G., Clarke D.J. and Bode H.B. (2007) A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chembiochem*, 8, 14, 1721–1728.
- Bleas M.J., De Grandis S.A., Lee H. and Trevors J.T. (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 99–114.
- Brusetti L., Malkhazova I., Gtari M., Tamagnini I., Borin S., Merabishvili M., Chanishvili N., Mora D., Cappitelli F. and Daffonchio D. (2008) Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BioMedCentral Microbiology*, 8, 220–234.
- Bull A.T. (2010) The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 993–1021.
- Burgaud G., Arzur D., Durand L., Cambon Bonavita M.A. and Barbier G. (2010) Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS Microbial Ecology*, 73, 121–133.
- Campbell B.C., Engel A.S., Porter M.L. and Takai K. (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 458–468.
- Campbell J., Lin Q., Geske G.D. and Blackwell H.E. (2009) New and unexpected

- insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology*, 4, 1051-1059.
- Campbell C.D. and Vederas J.C. (2010) Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. *Biopolymers*, 93, 3, 755-763.
- Cane D.E., Walsh C.T. and Khosla C. (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations and mutations. *Science*, 282, 63 – 68.
- Cary S.C., Cottrell M.T., Stein J.L., Camacho F. and Desbruyeres D. (1997) Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1124–1130.
- Carey St., Croff Bell K., Nomikou P., Vougioukalakis G., Roman C., Cantner K., Bejelou K., Bourboulis M. and Martin J.F. (2011) Kolumbo Volcanic Rift Zone (Aegean Sea, Greece). In: *New Frontiers in Ocean Exploration, The E/V Nautilus 2010 Field Season*. Special supplement to the journal *Oceanography*.
- Castro da Silva M.A., Cavaletti A., Spinner A., Rosa D.C., Jasper R.B., Quecine M.C., Bonatelli M.L., Pizzirani-Kleiner A., Corcao G., Oliveira de Souza Lima A. and Lima A. (2013) Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. *Springerplus*, 2, 127–137.
- Cavalier-Smith T. (2006) Rooting the tree of life by transition analyses. *Biology Direct*, 1, 19.
- Chang J.Y. (1981) Isolation and characterization of polypeptide at the picomole level. Pre-column formation of peptide derivatives with dimethyl aminoazobenzene isothiocyanate. *Journal of Biochemistry*, 199, 537-545.
- Cheng Y.Q., Tang G.L. and Shen B. (2003) Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100, 3149 – 3154.
- Childress J.J. and Fisher C.R. (1992) In: *Oceanography and marine biology: an annual review*. Barnes M., Ansell A.D. and Gibson R.N. (Eds), UCL Press Limited, London, 30, 337-441.

- Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Richard P.v.H., Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K. and Andel T.H. (1979) The hydrothermal mounds of the Galapagos Rift: Observations with DSRV Alvin and detailed heat flow studies. *Science*, 203, 1073–1083.
- Costerton J.W., Stewart P.S. and Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322.
- Cottrell M.T. and Kirchman D.L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5116–5122.
- Danhorn T. and Fuqua C. (2007) Biofilm formation by plant associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401–422.
- Daniels R., Reynaert S. and Hoekstra H. (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103, 14965–14970.
- Danovaro R., Luna G.M., Dell’Anno A. and Pietrangeli B. (2006) Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 9, 5982-5989.
- Dantas G., Sommer M.O., Oluwasegun R.D. and Church G.M. (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 320, 100-103.
- Darby C., Hsu J.W., Ghori N. and Falkow S. (2002) *Caenorhabditis elegans*: Plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*, 417, 243–244.
- De Carvalho M.P. and Abraham W.R. (2012) Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 21, 3564-3577.
- Di Meo C.A., Wilbur A.E., Holben W.E., Feldman R.A., Vrijenhoek R.C. and Cary C. (2000) Genetic variation among endosymbionts of widely distributed vestimentiferan tubeworms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2, 651-658.
- Dick G.J., Lee Y.E. and Tebo B.M. (2006) Manganese (II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin hydrothermal sediments and plumes. *Applied and*

- Environmental Microbiology, 72, 3184–3190.
- Donelli G., Vuotto C. and Mastromarino P. (2013) Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 24, 20105-20122.
- Du L. and Lu L. (2010) PKS and NRPS release mechanisms: review. *Natural Products Reports*, 27, 255–278.
- Duitman E.H., Hamoen L.W., Rembold M., Venema G., Seitz H., Saenger W., Bernhard F., Reinhardt R., Schmidt M., Ullrich C, Stein T., Leenders F. and Vater J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Protocols of the National Accademy of Sciences, USA*, 96, 23, 13294–13299.
- D' Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W. and Wright G.D. (2008) Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311, 374-377.
- Edwards U., Rogall T., Blockerl H., Emde M. and Bottger E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Elkahoui S., Djebali N., Tabbene O., Hadjbrahim A., Mnasri B., Mhamdi R. and Liman F. (2011) Screening of bacterial isolates collected from marine bio-films for antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 5, 2, 1-4.
- El-Sayed A.K., Hothersall J., Cooper S.M., Stephens E., Simpson T.J. and C.M. Thomas (2003) Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chemistry and Biology*, 10, 419–430.
- Emerson D., Agulto L., Liu H. and Liu L. (2008) Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. *BioScience*, 58, 10, 925-936.
- Etchegaray A., Bueno C.D. and de Melo I.S. (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190, 611–622.
- Faulkner D.J. (2002) Marine natural products. *Natural Products Reports*, 19, 1–48.

- Fdhila F., Vázquez V., Sánchez J.L. and Riguera R. (2003) dd-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *Journal of Natural Products*, 66, 1299–1301.
- Fickers P. (2012) Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8, 40–46.
- Fieseler L., Hentschel U., Grozdanov L., Schirmer A., Wen G., Platzer M., Hrvatin S., Butzke D., Zimmermann K. and Piel J. (2007) Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7, 2144-2155.
- Fischbach M.A. and Walsh C.T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and non ribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106, 3468-3496.
- Foti M., Ma S., Sorokin D.Y., Rademaker J.L.W., Kuenen J. and Muyzer G. (2006) Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 95-101.
- Franks A., Egan S., Holmström C., James S., Lappin-Scott H. and Kjelleberg S. (2006) Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 9, 6079-6087.
- Fukami K., Simidu U. and Taga N. (1983) Distribution of heterotrophic bacteria in relation to the concentration of particulate organic matter in seawater. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 5, 570-575.
- Gärtner A., Blumel M., Wiese J. and Imhoff J.F. (2011) Isolation and characterization of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 100, 421–435.
- Giancarlo L. and Rolando L. (1993) Antibiotics and bioactive microbial metabolites. In: *Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites*. New York: Plenum Press, 1 – 18.
- Ginolhac A., Jarrin C., Gillet B., Robe P., Pujic P., Tuphile K., Bertrand H., Vogel

- T.M., Perriere G., Simonet P. and Nalin R. (2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5522-5527.
- Giovannelli D., d'Errico G., Manini E., Yakimov M. and Vetriani C. (2013) Diversity and phylogenetic analyses of bacteria from a shallow-water hydrothermal vent in Milos island (Greece). *Frontiers in Microbiology*, 4, 184.
- Goh E.B., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M.G. and Davies J. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 17025-17030.
- Gontang E.A., Fenical W. and Jensen P.R. (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3272–3282.
- Gonzalez-Pastor J.E., Hobbs E.C. and Losick R. (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301, 510 - 513.
- Guerrero-Barajas C., Garibay-Orijel C. and Rosas Rocha L. (2011) Sulfate reduction and trichloroethylene biodegradation by a marine microbial community from hydrothermal vents sediments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 1, 116-123.
- Gulder T.A.M. and Moore B.S. (2009) Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 252–260.
- Gugliandolo C. and Maugeri T.L. (1998) Temporal variations in heterotrophic mesophilic bacteria from a marine shallow hydrothermal vent off the island of Vulcano. *Microbial Ecology*, 36, 13-22.
- Gulick A.M. (2009) Conformational dynamics in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *Chemical Biology*, 4, 811- 827.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W. and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95–108.
- Handtke S., Schroeter R., Jurgen B., Methling K., Schluter R., Albrecht D., van Hijum S.A.F.T., Bongaerts J., Maurer K.H., Lalk M., Schweder T., Hecker M. and Voigt B. (2014) *Bacillus pumilus* reveals a remarkably high resistance to

- hydrogen peroxide provoked oxidative stress. *PloS One*, 9, 1, e85625.
- Harmsen H.J.M., Prieur D. and Jeanthon C. (1997) Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2876–2883.
- Haught C., Wilkinson D.L., Zgafas K. and Harrison R.G. (1994) A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. *Biotechniques*, 16, 1, 46-48.
- Hay M.E. and Steinberg P.D. (1992) The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In: *Herbivores: Their alteration with Secondary Metabolites, Evolutionary and Ecological Processes*. Rosenthal J. and Berenbaum M. (Eds), Academic Press, San Diego, 371-413.
- Hertweck C. (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 4688-4716.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. and Wellington E. (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.
- Hildebrand M., Waggoner L.E., Liu H.B., Sudek S., Allen S., Anderson C., Sherman D.H. and Haygood M. (2004) *bryA*: An unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Chemistry and Biology*, 11, 1543-1552.
- Homann V.V., Sandy M., Tincu J.A., Templeton A.S., Tebo B.M. and Butler A.J. (2009) Loihechelins A–F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. *Journal of Natural Products*, 72, 884–888.
- Hopwood D.A. (1997) Genetic contribution to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97, 2465-2497.
- Hopwood D.A. (2007) *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, New York.
- Huang X.Q., Lu Z.X., Zhao H.Z., Bie X.M., Lu F.X. and Yang S.J. (2006) Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* against pseudorabies virus, porcine parvovirus, newcastle disease virus and infectious bursal disease virus in vitro. *International Journal of Peptides Research Therapy*, 12, 373–377.

- Huang X.Q., Lu Z.X., Bie X.M., Lu F.X., Zhao H.Z. and Yang S.J. (2007) Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* strains using a response surface method. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74, 454–461.
- Huber R., Langworthy T.A., König H., Thomm M., Woese C.R., Sleytr U.B. and Stetter K.O. (1986) *Thermotogamaritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archives of Microbiology*, 144, 324–333.
- Hugler M. and Sievert S.M. (2011) Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science*, 3, 261–289.
- Italiano F. and Nuccio P.M. (1991) Geochemical investigation of submarine volcanic exhalations to the east of Panarea, Aeolian Islands, Italy. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 46, 125–141.
- Jannasch H.W. and Wirsén C.O. (1979) Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience*, 29, 592–598.
- Jenke-Kodama H., Borner T. and Dittman E. (2006) Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *Plos Computational Biology*, 2, 10, e132.
- Jesser K.J., Fullerton H., Hager K.W. and Moyer C.L. (2015) Quantitative PCR Analysis of Functional Genes in Iron-Rich Microbial Mats at an Active Hydrothermal Vent System (Loihi Seamount, Hawaii). *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 9, 2976–2984.
- Jiang W., Ye P., Chen C.T., Wang K., Liu P., He S., Wu X., Gan L., Ye Y. and Wu B. (2013) Two novel hepatocellular carcinoma cycle inhibitory cyclodepsipeptides from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus clavatus* C2WU. *Marine Drugs*, 11, 12, 4761–4772.
- Jolivet E., L’Haridon S., Corre E., Forterre P. and Prieur D. (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 847–851.
- Jørgensen B.B. and Boetius A. (2007) Feast and famine: microbial life in the deep-

- sea bed. *Nature Review Microbiology*, 5, 770–781.
- Jorgensen J.H. and Ferraro M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 11, 1749-1755.
- Juniper S.K., Sarrazin J. and Grehan A. (1998) Remote sensing of organism density and biomass at hydrothermal vents. *Cahiers de Biologie Marine*, 39, 245-247.
- Jurgens K. and Matz C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 81, 413–434.
- Kato C., Li L., Tamaoka J. and Horikoshi K. (1997) Molecular analyses of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles*, 1, 17–23.
- Kaye J.Z. and Baross J.A. (2000) High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 249–260.
- Katz E. and Demain A.L. (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriology Reviews*, 41, 449–474.
- Kelley D.S., Baross J.A. and Delaney J.R. (2002) Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 30, 385.
- Kempf M.J., Chen F., Kern R. and Venkateswaran K. (2005) Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of *Bacillus pumilus* from a spacecraft assembly facility. *Astrobiology*, 5, 391–405.
- Khosla C., Gokhale R.S., Jacobsen J.R. and Cane D.E. (1999) Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annual Reviews of Biochemistry*, 68, 219 – 253.
- Kicklighter C.E., Fisher C.R. and Hay M.E. (2004) Chemical defense of hydrothermal vent and hydrocarbon seep organisms: a preliminary assessment using shallow-water consumers. *Marine Ecology Progress Series*, 275, 11–19.
- Kiliass S.P., Nomikou P., Papanikolaou D., Polymenakou P.N., Godelitsas A., Argyraki A., Carey S., Gamaletsos P., Mertzimekis T.J., Stathopoulou E., Goettlicher J., Steininger R., Betzelou K., Livanos I., Christakis C., Bell K.C. and

- Scoullou M. (2013) New insights into hydrothermal vent processes in the unique shallow-submarine arc-volcano, Kolumbo (Santorini), Greece. *Nature Scientific Reports*, 3, 2421-2436.
- Kim T.K. and Fuerst J.A. (2006) Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environmental Microbiology*, 8, 1460–1470.
- Koehn F.E. (2008) High impact technologies for natural products screening. *Progress in Drug Research*, 65, 175-7.
- Kohli R.M., Trauger J.W., Schwarzer D., Marahiel M.A. and Walsh C.T. (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40, 7099-7108.
- Kohli R. and Walsh C. (2003) Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chemical Communications*, 297–307.
- Konstantinidis K.T., Braff J., Karl D.M. and DeLong E.F. (2009) Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4,000 meters at station ALOHA in the North Pacific subtropical gyre. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5345–5355.
- Kontro M., Lignell U., Hirvonen M.R. and Nevalainen A. (2005) pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 32-38.
- Kormas K.A., Tivey M.K., Von Damm K. and Teske A. (2006) Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9 degrees N, East Pacific Rise). *Environmental Microbiology*, 8, 909–920.
- Le Bris N., Sarradin P.M. and Caprais J.C. (2003) Contrasted sulphide chemistries in the environment of 13°N EPR vent fauna. *Deep Sea Research I*, 50, 737-747.
- Lepage E., Marguet E., Geslin C., Matte-Tailliez O., Zillig W., Forterre P. and Tailliez P. (2004) Molecular diversity of new Thermococcales isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified

- polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3, 1277-1286.
- Li L., Deng W., Song J. and Liu W. (2008) Characterization of the Saframycin A Gene Cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 Revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *Journal of Bacteriology*, 190, 1, 251-263.
- Li Y.H. and Tian X. (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12, 3, 2519-2538.
- Li Z.Y., Wang Y.Z., He L.M. and Zheng H.J. (2014) Metabolic profiles in prokaryotic and eukaryotic communities in deep-sea sponge *Neamphius huxleyi* indicated by metagenomics. *Nature Scientific Reports*, 4, e3895.
- Lin D., Qu L.J., Gu H. and Chen Z. (2001) A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1044–1050.
- Lindow S.E. and Brandl M.T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1875–1883.
- Liou J.W., Hung Y.J., Yang C.H. and Chen Y.C. (2015) The antimicrobial activity of gramicidin A is associated with hydroxyl radical formation. *PLoS One*, 10, 1371-1386.
- Liu M., Fan L., Zhong L., Kjelleberg S. and Thomas T. (2012) Metaproteogenomic analysis of a community of sponge symbionts. *International Society for Microbial Ecology*, 6, 1515-1525.
- Liu Y., Lai Q., Dong C., Sun F., Wang L., Li G. and Shao Z. (2013) Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS One*, 8, e80097.
- Long R.A. and Azam F. (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 11, 4975-4983.
- Lopez-Garcia P., Duperron S., Philippot P., Foriel J., Susini J. and Moreira D. (2003) Bacterial diversity in hydrothermal sediment and *epsilon*-proteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 5, 961–976.

- Louws F.J., Bell J., Medina-Mora C.M., Smart C.D., Opgenorth D., Ishimaru C.A., Hausbeck M.K., de Bruijn F.J. and Fulbright D.W. (1998) rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88, 8, 862-868.
- Luesch H., Chanda S.K., Raya R.M., De Jesus P.D., Orth A.P. and Walker J.R. (2006) A functional genomics approach to the mode of action of apratoxin A. *Nature Chemical Biology*, 2, 158–67.
- Luther G.W., Rozan T.F., Taillefert M., Nuzzio D.B., Di Meo C., Shank T.M., Lutz R.A. and Cary S.C. (2001) Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. *Nature*, 410, 813-815.
- Magnuson K., Jackowski S., Rock C.O. and Cronan J.E. (1993) Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 57, 522–542.
- Manini E., Luna G.M., Corinaldesi C., Zeppilli D., Bortoluzzi G., Caramanna G., Raffa F. and Danovaro R. (2008) Prokaryote diversity and virus abundance in shallow hydrothermal vents of the Mediterranean Sea (Panarea Island) and the Pacific Ocean (North Sulawesi-Indonesia). *Microbial Ecology*, 55, 626–639.
- Marahiel M.A., Nakano M.M. and Zuber P. (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*, 7, 631–636.
- Marahiel M.A., Stachelhaus T. and Mootz H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 97, 2651–74.
- Marfey P. (1984) *Carlsberg Research Communications*, 49, 591–596.
- Marinelli F. (2009) From microbial products to novel drugs that target a multitude of disease indications. *Methods in Enzymology*, 458, 29–58.
- Marques M.A., Citron D.N. and Wang C.C. (2007) Development of tyrocidine A analogues with improved antibacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 21, 6667-6677.
- Marteinsson V.T., Bjornsdottir S.H., Bienvenu N., Kristjansson J.K. and Birrien J.L. (2010) *Rhodothermus profundus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2729–2734.
- Martinez J.S., Zhang G.P., Holt P.D., Jung H.T., Carrano C.J., Haygood M.G. and Butler A. (2000) Self-assembling amphiphilic siderophores from marine

- bacteria. *Science*, 287, 1245-1247.
- Masschelein J., Mattheus W., Gao L.J., Moons P., Van Houdt R., Uytterhoeven B., Lamberigts C., Lescrinier E., Rozenski J., Herdewijn P., Aertsen A., Michiels C. and Lavigne R. (2013) A PKS/NRPS/FAS Hybrid Gene Cluster from *Serratia plymuthica* RVH1 Encoding the Biosynthesis of Three Broad Spectrum, Zeamine-Related Antibiotics. *PLoS One*, 8, 1, e54143.
- Matz C. and Kjelleberg S. (2005) Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13, 302–307.
- Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A. and Egan S. (2008) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS One*, 3, e2744.
- Maugeri T.L., Lentini V., Gugliandolo C., Italiano F., Cousinand S. and Stackebrandt E. (2008) Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy) *Extremophiles Microbial Life Under Extreme Conditions*© Springer.
- Mayer A.M., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W. and Little R.D. (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 255–65.
- Mearns-Spragg A., Bregu M., Boyd K.G. and Burgess J.G. (1998) Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 142—146.
- Menge B.A. and Branch G.M. (2001) Rocky Intertidal Communities. Bertness M.D., Gaines S.D. and Hay M.E. (Eds), *Marine community ecology*, 221–251.
- Metz J.G., Roessler P., Facciotti D., Levering C. and Dittrich F. (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 293, 290–293.
- Ming L.J. and Epperson J.D. (2002) Metal binding and structure activity relationship of the antibiotic peptide bacitracin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 1, 46-58.

- Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., L'Haridon S., Jeanthon C., Hippe H., Stackebrandt E. and Bonch-Osmolovskaya E.A. (2002) *Nautilialithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing ϵ -proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1299-1304.
- Moffitt M.C. and Neilan B.A. (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 446–457.
- Moldenhauer J., Gotz D.C.G., Albert C.R., Bischof S.K., Schneider K., Sussmuth R.D., Engeser M., Gross H., Bringmann G. and Piel J. (2010) The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for β,γ dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 1465-1467.
- Monod J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394.
- Monroe E.A. and Van Dolah F.M. (2008) The Toxic Dinoflagellate *Karenia brevis* Encodes Novel Type I-like Polyketide Synthases Containing Discrete Catalytic Domains. *Protist*, 159, 3, 471-482.
- Mootz H.D., Schwarzer D. and Marahiel M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 3, 490–504.
- Moyer C.L., Dobbs F.C. and Karl D.M. (1994) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 871–879.
- Muscholl-Silberhorn A., Thiel V. and Imhoff J.F. (2008) Abundance and bioactivity of culture sponge associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55, 94-106.
- Nakagawa S., Takai K., Horikoshi K. and Sako Y. (2004) *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 329-335.

- Nakagawa S., Takai K., Inagaki F., Chiba H., Ishibashi J., Kataoka S., Hirayama H., Nunoura T., Horikoshi K. and Sako Y. (2005) Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 141–155.
- Nakagawa S. and Takai K. (2006) The isolation of thermophiles from deep-sea hydrothermal environments. *Methods in Microbiology*, 35, 55-90.
- Nakagawa S., Takai Y., Shimamura S., Reysenbach A.L. and Takai K. (2007) Deep-sea vent epsilon-proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 12146–12150.
- Nakagawa S. and Takai K. (2008) Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 1-14.
- Naganuma T., Miyoshi T. and Kimura H. (2007) Phylotype diversity of deep-sea hydrothermal vent prokaryotes trapped by 0.2- and 0.1-µm-pore-size filters. *Extremophiles*, 11, 637–646.
- Nett M. and König G.M. (2007) The chemistry of gliding bacteria. *Natural Product Reports*, 24, 1245–1261.
- Newman D.J. and Cragg G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461–77.
- Nguyen T., Ishida K., Jenke-Kodama H., Dittmann E., Gurgui C., Hochmuth T., Taudien S., Platzer M., Hertweck C. and Piel J. (2008) Exploiting the mosaic structure of *trans*-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nature Biotechnology*, 26, 225–233.
- Nichols D.S. (2003) Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 1–7.
- Nithya C. and Pandian S.K. (2010) Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiological Research*, 165, 578–593.
- Nybroe O. and Sørensen J. (2004) Production of cyclic lipopeptides by fluorescent *pseudomonads*. *Pseudomonas*, Biosynthesis of Macromolecules and Molecular

- Metabolism (Ramos J-L, Eds), 147–172. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- O'Brien J. and Wright G.D. (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 552–558.
- Ortega-Morales O., Chan-Bacab M.J., Miranda-Tello E., Fardeau M.L., Carrero J. and Stein T. (2008) Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1, 9-15.
- Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G., Dasiou D. and Ambrosiadis I. (2006) Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor “indicator microorganism”. *Microbial Cell Factories*, 5, 30.
- Patel H.M. and Walsh C.T. (2001) In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and *N*-methyltransferase activities. *Biochemistry*, 40, 9023–9031.
- Paul V.J. (1992) *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, 245.
- Penesyan A., Marshall-Jones Z., Holmstrom C., Kjelleberg S. and Egan S. (2009) Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 113-124.
- Penesyan A., Kjelleberg S. and Egan S. (2010) Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Marine Drugs*, 8, 438–59.
- Peypoux F., Bonmatin J.M. and Wallach J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 5, 553-563.
- Piel J., Hui D., Fusetani N. and Matsunaga S. (2004) Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environmental Microbiology*, 6, 9, 921-927.
- Piel J. (2010) Biosynthesis of polyketides by *trans*-AT polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 27, 996-1047.
- Price N.P.J., Rooney A.P., Swezey J.L., Perry E. and Cohan F.M. (2007) Mass

- spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. FEMS Microbiology Letters, 271, 83–89.
- Qiao N. and Shao Z. (2010) Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. Journal of Applied Microbiology, 108, 1207–1216.
- Raaijmakers J.M., de Bruijn I. and de Kock MJ. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Molecular Plant Microbe Interactions, 19, 699–710.
- Rademaker J.L.W. and De Bruijn F.J. (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews, 151-171.
- Rademaker J.L.W., Louws F.J. and De Bruijn F.J. (1998) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. Molecular Microbial Ecology Manual, 3.4.3, 1-27.
- Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P. and de Bruijn F.J. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 665-677.
- Rademaker J.L.W., Louws F.J., Versalovic J. and de Bruijn F.J. (2004) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuck G.A., de Bruijn F.G., Head I.M., Akkermans A.D. and van Elsas J.D. (Eds) Molecular microbial ecology manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1–33.
- Rahman H., Austin B., Mitchell W.J., Morris P.C., Jamieson D.J. and Adams D.R. (2010) Novel antiinfective compounds from marine bacteria. Marine Drugs, 8, 498–518.
- Rao D., Webb J.S. and Kjelleberg S. (2005) Competitive interactions in mixed species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4, 1729—17636.
- Rastogi G. and Sani R.K. (2011) Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function and Dynamics in the Environment. Microbes

- and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications. Ahmad I. (Eds), Springer Science+Business Media.
- Rawlings B.J. (2001) Type I polyketide biosynthesis in bacteria (part A). *Natural Product Reports*, 18, 190–230.
- Rawlings B.J. (2001) Type I polyketide biosynthesis in bacteria (part B). *Natural Product Reports*, 18, 231–281.
- Renders N, Romling Y, Verbrugh H and van Belkum A. (1996) Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 12, 3190-3195.
- Reva O. and Tummler B. (2008) Think big-giant genes in bacteria. *Environmental Microbiology*, 10, 768–777.
- Reysenbach A.L., Liu Y., Banta A.B., Beveridge T.J., Kirshtein J.D., Schouten S., Tivey M.K., Von Damm K.L. and Voytek M.A. (2006) An ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature*, 442, 444-447.
- Rheinheimer G. (1977) Regional and seasonal distribution of saprophytic and coliform bacteria. In: Rheinheimer G. (Eds) *Microbial ecology in a brackish water environment*. Springer-Verlag, New York, 121–137.
- Ridley C.P., Lee H.Y. and Khosla C. (2008) Evolution of polyketide synthases in bacteria. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 105, 12, 4595-4600.
- Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W. and Hopwood D.A. (2008) Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 9, 670–5.
- Rix U., Fischer C., Remsing L.L. and Rohr J. (2002) Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, 19, 542 – 580.
- Roongsawang N., Washio K. and Morikawa M. (2011) Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 141–172.

- Rusch A., Walpersdorf E., deBeer D., Gurrieri S. and Amend J.P. (2005) Microbial communities near the oxic/anoxic interface in the hydrothermal system of Vulcano Island, Italy. *Chemical Geology*, 224, 1-3, 169-182.
- Sako Y., Nakagawa S., Takai K. and Horikoshi K. (2003) *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1, 59-65.
- Salomon C.E., Magarvey N.A. and Sherman D.H. (2003) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Natural Products Reports*, 21, 105-121.
- Salomon C.H., Magarvey N.A. and Sherman D.H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Natural Product Reports*, 21, 105-121.
- Sandmann A., Sasse F. and Müller R. (2004) Identification and analysis of the core biosynthetic machinery of tubulysin, a potent cytotoxin with potential anticancer activity. *Chemistry and Biology*, 11, 1071-1079.
- Sandmann A., Dickschat J., Jenke-Kodama H., Kunze B., Dittmann E. and Müller R. (2007) A Type II polyketide synthase from the gram-negative Bacterium *Stigmatella aurantiaca* is involved in Aurachin alkaloid biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 46, 15, 2712-2716.
- Santelli C.M., Orcutt B.N., Banning E., Bach W., Moyer C.L., Sogin M.L., Staudigel H. and Edwards K.J. (2008) Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature*, 453, 653–656.
- Saracli S., Dogan N. and Dogan I. (2013) Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. *Journal of Inequalities and Applications*, 1, 203.
- Sass A.M., Sass H., Coolen M., Cypionka H. and Overmann J. (2001) Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 12, 5392-5402.

- Schloss P.D. and Handelsman J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3, 1501-1506.
- Schmidt C., Vuillemin R., Le Gall C., Gaill F. and Le Bris N. (2008) Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Marine Chemistry*, 108, 18-31.
- Schneider M. and De Bruijn F.J. (1996) Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 163-174.
- Schrenk M.O., Kelley D.S., Delaney J.R. and Baross J.A. (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3580–3592.
- Schrenk M.O., Huber J.A. and Edwards K.J. (2010) Microbial provinces in the seafloor. *Annual Review of Marine Science*, 2, 279–304.
- Schroeder F.C., Gibson D.M., Churchill A.C., Sojikul P., Wursthorn E.J. and Krasnoff S.B. (2007) Differential analysis of 2D NMR spectra: new natural products from a pilot-scale fungal extract library. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 901–904.
- Schwarzer D. and Marahiel M.A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88, 93–101.
- Schwarzer D., Firking R. and Marahiel M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports*, 20, 275–287.
- Schweizer E. and Hofmann J. (2004) Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 68, 501–517.
- Scott M. and Hwa T. (2011) Bacterial growth laws and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 559-565.
- Sessitsch A., Hardoim P., Döring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T., Mitter B., Hauberg-Lotte L., Friedrich F., Rahalkar M., Hurek T., Sarkar A., Bodrossy L., van Overbeek L., Brar D., van Elsas J.D. and Reinhold-Hurek B. (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as

- revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1, 28-36.
- Shank E.A. and Kolter R. (2009) New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 2, 205-214.
- Sieg R.D., Poulson-Ellestad K.L. and Kubanek J. (2011) Chemical ecology of the marine plankton. *Natural Product Reports*, 25, 388–99.
- Sievert S.M., Kuever J. and Muyzer G. (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos island (Greece). *Applied and Environmental Microbiology*, 3102–3109.
- Sievert S.M. and Vetriani C. (2012) Chemoautotrophy at deep-sea vents: past, present, and future. *Oceanography*, 25, 1, 218–233.
- Sigurdsson H., Carey S., Alexandri M., Vougioukalakis G., Croff Bell K., Roman C., Sakellariou D., Anagnostou C., Rousakis G., Ioakim C., Gogou A., Ballas D., Misaridis T. and Nomikou P. (2006β) High-Temperature Hydrothermal Vent Field of Kolumbo Submarine Volcano, Aegean Sea: Site of Active Kuroko-Type Mineralization. *AGU*, 87, 52, Fall Meeting OS, 34A-03.
- Silberhorn A.M., Thiel V. and Imhoff J.F. (2008) Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55, 94-106.
- Simunovic V., Gherardini F.C. and Shimkets L.J. (2003) Membrane localization of motility, signaling, and polyketide synthase proteins in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 17, 185, 5066-5075.
- Smit E., Leeftang P. and Wernars K. (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 249–261.
- Smith S. and Tsai S.C. (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports*, 24, 5, 1041-1072.
- Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M. and Herndl G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the

- underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 103, 12115–12120.
- Stachelhaus T., Mootz H.D., Bergendahl V. and Marahiel M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. Journal of Biological Chemistry, 273, 22773–22781.
- Stachelhaus T., Mootz H.D. and Marahiel M.A. (1999) The specificity conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chemical Biology, 6, 493-505.
- Stark T. and Hofmann T. (2005) Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7222–7231.
- Stein T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56, 845–857.
- Takai K. and Horikoshi K. (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics, 152, 1285–1297.
- Takai K., Inoue A. and Horikoshi K. (2002) *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 4, 1089-95.
- Takai K. and Fujiwara Y. (2002) Hydrothermal vents: biodiversity in deep-sea hydrothermal vents. In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Bitton G. (Eds), Wiley, New York, 1604–1617.
- Takai K., Oida H., Suzuki Y., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., Inagaki F., Nealson K.H. and Horikoshi K. (2004) Spatial distribution of marine crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems. Applied and Environmental Microbiology, 70, 2404–2413.
- Takai K., Hirayama H., Nakagawa S., Suzuki Y. and Nealson K.H. (2005) *Lebetimonas acidiphila* gen. nov, sp. nov, a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria, isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70, 2404-2413.

- Takai K., Naganuma T., Reysenbach A.L. and Hoek J. (2006) Microbial Ecology of Mid-Ocean Ridges and Back-Arc Basins. *Geophysical Monograph*, 166, 185–213.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013) Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Tanaka M., Ueno A., Kawasaki K., Yumoto I. and Ohgiya S. (1999) Isolation of clustered genes that are notably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio marinus* strain MP-1. *Biotechnology Letters*, 21, 939–945.
- Tao M., Wang L., Wendt-Pienkowski E., George N.P., Galm U., Zhang G., Coughlin J.M. and Shen B. (2007) The tallysomyacin biosynthetic gene cluster from *Streptoalloteichus hindustanus* E465-94 ATCC 31158 unveiling new insights into the biosynthesis of the bleomycin family of antitumor antibiotics. *Molecular BioSystems*, 3, 60-74.
- Tarasov V.G., Gebruk A.V., Mironov A.N. and Moskalev L.I. (2005) Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chemical Geology*, 224, 5–39.
- Tendulkar S.R., Saikumari Y.K., Patel V., Raghotama S., Munshi T.K., Balaram P. and Chattoo B.B. (2007) Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2331–2339.
- Teske A., Hinrichs K.-U., Edgcomb V., de Vera Gomez A., Kysela D., Sylva S.P., Sogin M.L. and Jannasch H.W. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1994–2007.
- Thies J.E. (2007) Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 579–591.
- Thrane C., Olsson S., Nielsen T.H. and Sørensen J. (1999) Vital fluorescent stains for

- detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. FEMS Microbiology Ecology 30, 11–23.
- Thornburg C.C., Zabriskie T.M. and McPhail K.L. (2010) Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery? Journal of Natural Products, 40, 30, 1-10.
- Troskie A.M., Rautenbach M., Delattin N., Vosloo J.A., Dathe M., Cammue B.P.A. and Thevissen K. (2014) Synergistic activity of the tyrocidines, antimicrobial cyclodecapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*, with amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 10, 1128-1168.
- Tran H., Ficke A., Asiimwe T., Höfte M. and Raaijmakers J.M. (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. New Phytology, 175, 731–742.
- Tseng C.C., Bruner S.D., Kohli R.M., Marahiel M.A., Walsh C.T. and Sieber S.A. (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. Biochemistry, 41, 13350–13359.
- Van Belkum A., Scherer S., van Alphen L. and Verbrugh H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 2, 275-293.
- Van Dover C.L. and Fry B. (1994) Microorganisms as food resources at deep-sea hydrothermal vents. Limnology and Oceanography, 39, 51–57.
- Van Dover C.L. (2000) The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton University Press: Princeton, NJ.
- Van Dover C.L., German C.R., Speer K.G., Parson L.M. and Vrijenhoek R.C. (2002) Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. Science, 295, 1253–1257.
- Vauterin L. and Vauterin P. (1992) Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. European Journal of Clinical Microbiology, 1, 37-41.

- Ver Eeche H.C., Butterfield D.A., Huber J.A., Lilley M.D., Olson E.J., Roe K.K., Evans L.J., Merkel A.Y., Cantin H.V. and Holden J.F. (2012) Hydrogen-limited growth of hyperthermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 34, 13674-13679.
- Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R.M. and Pauli G. (1997 α) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25, 289–297.
- Vollenbroich D., Pauli G., Ozel M. and Vater J. (1997 β) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 44–49.
- Von Döhren H., Keller U., Vater J. and Zocher R. (1997) Multifunctional peptide synthetases. *Chemical Reviews*, 97, 2675–2706.
- Wagenaar M.M. (2008) Pre-fractionated microbial samples-the second generation natural products library at Wyeth. *Molecules*, 13, 1406–1426.
- Wagner-Dobler I., Rheims H., Felske A., El-Ghezal A., Flade-Schroder D., Laatsch H., Lang S., Pukall R. and Tindall B.J. (2004) *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea *alpha* proteobacterium that produces bioactive metabolites. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 54, 1177–1184.
- Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N. and Arp D.J. (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 107, 8818–8823.
- Walsh C.T., Chen H., Keating T.A., Hubbard B.K., Losey H.C., Luo L., Marshall G., Miller D.A. and Patel H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 525-534.
- Walsh C. (2003) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. ASM, Washington.
- Walsh C., Freel Meyers C.L. and Losey H.C. (2003) Antibiotic glycosyl-transferases: antibiotic maturation and prospects for reprogramming. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 3425–3436.
- Wang L., Zheng C.D., Li X.J., Gao J.M., Zhang X.C. and Wei G.H. (2012) Cyclo

- (Pro-Tyr) from an endophytic rhizobium isolated from *Glycyrrhiza uralensis*. Chemistry of Natural Compounds, 47, 1040-1042.
- Wang W., Cai B. and Shao Z. (2014) Oil degradation and biosurfactant production by the deep-sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. Frontiers in Microbiology, 5, 711-728.
- Weissman K.J. and Leadlay P.F. (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. Nature Reviews Microbiology, 3, 925-936.
- Wellington E.M.H. and Williams S.T. (1978) Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. Microbios Letters, 6, 151-157.
- Wellington E.M.H., Cresswell N. and Saunders V.A. (1990) Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and non-sterile soil. Applied and Environmental Microbiology, 56, 5, 1413-1419.
- Wery N., Cambon-Bonavita M.A., Lesongeur F. and Barbier G. (2002) Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. FEMS Microbiology Ecology, 41, 105-114.
- Wilkinson B. and Micklefield J. (2007) Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. Nature Chemical Biology, 3, 7, 379-386.
- Woodhouse J.N., Fan L., Brown M.V., Thomas T. and Neilan B.A. (2013) Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. International Society for Microbial Ecology, 7, 9, 1842-1851.
- Xie W., Wang F., Guo L., Chen Z., Sievert S.M., Meng J., Huang G., Li Y., Yan Q., Wu S., Wang X., Chen S., He G., Xiao X. and Xu A. (2011) Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. International Society for Microbial Ecology, 5, 414-426.
- Xiong Y.Q., Mukhopadhyay K., Yeaman M.R., Adier-Moore J. and Bayer A.S. (2005) Functional interrelationships between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 3114-3121.
- Xu M., Miao L., Li X.C., Xiao X. and Qian P.Y. (2007) Antibacterial and antilarval activity of deep-sea bacteria from sediments of the West Pacific Ocean.

- Biofouling, 23, 131–137.
- Yan L., Boyd K.G., Adams D.R. and Burgess J.G. (2003) Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in *Bacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7, 3719—3727.
- Yu D., Xu F., Zeng J. and Zhang J. (2012) Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 64, 4, 285-295.
- Zhang W., Zhang F., Li Z., Miao X., Meng Q. and Zhang X. (2008) Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 567-575.
- Zhang W., Li Z., Miao X. and Zhang F. (2009) The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes from South China Sea sponges. *Marine Biotechnology*, 11, 346-355.
- Zheng L., Han X.T., Chen H.M., Lin W. and Yan X.J. (2005) Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*, 55, 119–124.
- Zuber P. (2009) Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annual Review of Microbiology*, 63, 575–597.
- Καραγκούνη Α.Δ. (2001) Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Γενικής Μικροβιολογίας, Εκδόσεις Σταμούλης.