ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτήρια του εντερικού συστήματος υγιών νεογνών

ΤΣΑΠΑΤΟΥ ΑΝΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου

Αθήνα, 2014

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και διήρκησε από το 2010 έως το 2013.

<u>Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή</u>

Α) Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου (Επιβλέπουσα), Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Β) Γεώργιος Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γ) Δημήτριος Χατζηνικολάου, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Με αφορμή το πέρας αυτής της Διπλωματικής Εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου κ. Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου, εν πρώτοις, για την ευκαιρία που μου έδωσε με την επιλογή μου στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία». Οι γνώσεις και η εμπειρία που απέκτησα συμμετέχοντας στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα είναι ανεκτίμητης αξίας. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το προσωπικό ενδιαφέρον και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της παρούσης εργασίας αλλά και κατά τη διαμόρφωση του τελικού κειμένου. Οι επιστημονικές της συμβουλές υπήρξαν καθοριστικές στην επιστημονική μου αυτή προσπάθεια.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Διαλλινά, ευχαριστώ για τη μετάγγιση πολύτιμης γνώσης κατά τη διεξαγωγή του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου για το σύνολο της συμβολής του καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κ. Αδαμαντίνη Κυριακού, στο εργαστήριο της οποίας έγινε η διεξαγωγή όλης της πειραματικής διαδικασίας της παρούσης εργασίας. Την ευχαριστώ και την ευγνωμονώ για τη μεγάλη αγκαλιά που μου πρόσφερε καλωσορίζοντας με ως μέλος του εργαστηρίου της και της ερευνητικής της ομάδας. Η αγάπη της, η υπομονή της, το αμέριστο ενδιαφέρον της, οι εύστοχες και καίριες επιστημονικές της συμβουλές υπήρξαν καθοριστικές για την επιστημονική μου εξέλιξη. Θα με συντροφεύουν πάντα στην προσωπική μου πορεία.

Μέσα από την καρδιά μου θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κ. Ευδοκία Μήτσου. Η επισημότητα του κειμένου δε μου επιτρέπει να εκφράσω την ευγνωμοσύνη που νιώθω. Ήταν παρούσα ως άνθρωπος και ως επιστήμονας στις δύσκολες στιγμές που προέκυψαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσης διπλωματικής εργασίας. Το καθημερινό χαμόγελο της, η έμπρακτη στήριξη της, η ατέλειωτη συμπαράσταση της αλλά και η επιστημονική της εμπειρία αποτέλεσαν τον ακρογωνιαίο λίθο της ερευνητικής μου προσπάθειας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω και στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κ. Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την ανεκτίμητη συμβολή της στη βιοχημική επεξεργασία των δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά και τη Δρ. Παρασκευή Πραματευτάκη για την πολύτιμη βοήθεια της στη μοριακή επεξεργασία των δειγμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος Ε.Ε.Δ.Ι.Π του Χαροκοπείου Πανεπιστήμιου κ. Μαρία Κώτσου για τη βοήθεια της στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου και στον Δρ. Ευστάθιο Κατσίφα για τη συμβολή του στη διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας.

Ανεξάντλητη πηγή δύναμης και αγάπης για την ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας ήταν οι γονείς μου. Τους ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου για την αληθινή και ατέλειωτη αγάπη και στήριξη τους.
Τέλος, ευχαριστώ το σύντροφο μου στη ζωή για την αγάπη του και την υπομονή του. Ήταν πάντα εκεί…

Με τιμή,
Άννη Τσάπατου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γαστρεντερική οδός είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, το οποίο φιλοξενεί τόσο ωφέλιμα, όσο και επιβλαβή βακτήρια. Στις δύσκολες ισορροπίες που αναπτύσσονται θεωρείται ότι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* επηρεάζουν θετικά την υγεία του ξενιστή. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στη μελέτη των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (βακτηριοσίνες) που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της εν δυνάμει χρήσης τους ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για τη βελτίωση της ασφάλειας των προϊόντων διατροφής. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα βακτηριοσινών από βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από κόπρανα υγιών νεογνών.

Η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης έγινε με τη χρήση των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ («διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ»). Συνολικά εξετάσθηκαν 50 στελέχη του γένους *Lactobacillus* και 22 του γένους *Bifidobacterium* ως προς 12 Gram θετικούς μικροοργανισμούς δείκτες: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* CIP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689. Από αυτά τα στελέχη μόνο ένα εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση στο *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 και με τις δύο μεθοδολογίες, το οποίο και ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus gasseri* με αλληλούχιση του 16S rDNA γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας με την επίδραση υδρολυτικών ενζύμων και καταλάσης. Ακολούθησε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίας, αλλά και παρουσία διαφόρων αντιδραστηρίων. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι η αντιμικροβιακή δράση του *Lactobacillus gasseri* οφείλεται σε μόριο πρωτεϊνικής φύσης (βακτηριοσίνη), με περιορισμένο φάσμα δράσης, σταθερό σε διακυμάνσεις pH και ιδιαίτερα θερμοανθεκτικό. Η παραγωγή της βακτηριοσίνης ξεκινούσε στην εκθετική φάση ανάπτυξης του *L. gasseri* και έφτανε το μέγιστο της δραστικότητας της (12.800 AU/ml) στην αρχή της στατικής φάσης του

κύκλου αύξησης του. Από τα πειράματα κινητικής θανάτωσης προέκυψε πως η δράση της βακτηριοσίνης έναντι του *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081 είναι πιθανά βακτηριολυτική, χωρίς όμως να διαπιστωθεί απόλυτα ο ακριβής μηχανισμός της.

Τέλος, έγινε απομόνωση και καθαρισμός της βακτηριοσίνης με κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Ακολούθησαν δοκιμές ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφία με σκοπό την εύρεση του μοριακού βάρους της βακτηριοσίνης. Όλες οι δοκιμές που έλαβαν χώρα δεν παρουσίασαν ακριβή αποτελέσματα καθώς φάνηκε πως η βακτηριοσίνη βρίσκεται σε σύμπλοκο μαζί με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες, γεγονός που υπέδειξε την ανάγκη επεξεργασίας με επιπλέον τεχνικές χρωματογραφίας.

ABSTRACT

The intestinal tract is a complex ecosystem, that harbors both beneficial (e.g. lactobacilli, bifidobacteria) and harmful bacteria. Recently an increasing interest for the study of antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria has been noted, due to their potential use as food additives for safety reasons. Taking under consideration the above, the present study aimed to investigate the production of antimicrobial compounds, particularly bacteriocins, from bacterial strains isolated from the faecal microbiota of healthy, full-term neonates.

A total of 50 *Lactobacillus spp.* strains and 22 *Bifidobacterium spp.* strains were tested for the production of antimicrobial compounds by the "agar spot test" and the "agar well diffusion assay" against 12 Gram – positive indicator strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* CIP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* ATCC 9689. Only one isolate, identified as *Lactobacillus gasseri* by 16S rDNA sequence amplification, exhibited antimicrobial activity against *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 by both assays. Effect of hydrolytic enzymes, catalase, pH, temperature and detergents on antibacterial activity were examined. The antimicrobial peptide from *Lactobacillus gasseri* had a narrow spectrum of activity and was extremely stable at pH and temperature ranges. The production began in early logarithmic phase and maximum activity (12.800 AU/mL) was reached in early stationary phase. The mode of action was determined to be probably bacteriolytical against *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 by killing kinetics experiments. Further investigation is needed to ascertain the lytic mechanism.

Finally, purification of the peptide from *Lactobacillus gasseri* was performed by ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography. In order to determine molecular mass of bacteriocin-like molecule, electrophoresis assays of protein extracts obtained from chromatography, have taken place. None of these assays showed accurate results, as it was appeared that bacteriocin is in complex with

other proteinaceous factors. This result indicated the necessity to develop additional methods of chromatography for bacteriocin purification and isolation.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ……. 14

1.1. **Εντερικός Μικροβιακός Πληθυσμός**…….. 15

1.1.1. Χαρακτηριστικά εντερικού μικροβιακού πληθυσμού …….. 15
1.1.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια του εντερικού συστήματος…… 17
1.1.2.1. Το γένος *Lactobacillus*…….. 18
1.1.2.2. Το γένος *Bifidobacterium*…….. 19
1.1.3 Αναλογία των εντερικών παθογόνων μικροβίων στο σύνολο του μικροβιακού φορτίου του εντερικού συστήματος 20
1.2. Βακτηριοσίνες…….. 22

1.2.1. Ταξινόμηση βακτηριοσινών…… 24
Α) Πρώτο σύστημα ταξινόμησης…….. 24
Β) Δεύτερο σύστημα ταξινόμησης…… 26
1.2.2. Γενετική των βακτηριοσινών…….. 29
1.2.3. Βιοσύνθεση βακτηριοσινών…… 29
1.2.3.1. Σχηματισμός πρόδρομου μορίου των βακτηριοσινών 29
1.2.3.2. Αλληλουχία οδηγός του πρόδρομου μορίου των βακτηριοσινών…… 30
1.2.3.3. Σχηματισμός και απελευθέρωση των βιολογικά ενεργών βακτηριοσινών……... 31
1.2.3.4. Ρύθμιση της παραγωγής των βακτηριοσινών……... 32
1.2.4. Ανοσία……. 34
1.2.5. Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών…… 36
1.2.5.1 Τάξη Ι βακτηριοσίνες……... 36
1.2.5.2. Τάξη ΙΙ βακτηριοσίνες…… 38
1.2.6. Βακτηριοσίνες του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού……..... 41

1.3 Σκοπός εργασίας…… 45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ…… 47

2.1 Βακτηριακά στελέχη……..... 48

2.1.1 *Lactobacillus* spp. …… 48
2.1.2 *Bifidobacterium* spp. …… 48
2.1.3 Μικροοργανισμοί δείκτες……. 48
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα…… 49

2.2.1 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth ……... 49
2.2.2 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar……. 50
2.2.3 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth, mMRS broth (modified MRS broth)…….. 50
2.2.4 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ, mMRS άγαρ (modified MRS άγαρ)…… 50
2.2.5 Θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth, BHI broth……. 50
2.2.6 Θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Agar, BHI agar……... 51
2.2.7 Θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth Yeast Extact, TSBYE…….. 51
2.2.8 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI Broth, mBHI …….. 51
2.2.9 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα Columbia Blood Agar, mCBA… 51

2.2.10 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar low glucose (mMRS, 0,2% glucose)…… 51
2.2.11 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα mMRS agar low glucose (mMRS, 0,2% glucose)……. 52
2.2.12 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS soft agar …… 52
2.2.13 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS soft agar, mMRS soft agar (modified)…….. 52
2.2.14 Θρεπτικό υπόστρωμα BHI soft agar……... 52
2.2.15 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI soft agar, mBHI soft agar (modified)……... 53
2.3 Διαλύματα……... 53
2.3.1 Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων (Lysis buffer)…… 53
2.3.2 Υλικό χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Sephadex G-25……... 54
2.3.3 Υλικό χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Sephadex G-100 (Sephadex G100-120, Sigma)…… 54
2.3.4 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1 x... 54
2.3.5 Ρυθμιστικό διάλυμα (6x) φόρτωσης δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης… 54
2.3.6 Διάλυμα PPS……. 54
2.3.7 Πρότυπο stock διάλυμα της πρωτεΐνης αλβουμίνης βοδινού ορού BSA, τελικής συγκέντρωσης 100 μg/ml…… 54
2.3.8 Αραιωμένο διάλυμα BSA 25 μg/ml…… 55
2.3.9 Stock διάλυμα Bradford…… 55
2.3.10 Αραιωμένο διάλυμα Bradford για τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης……... 55
2.3.11 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS pH 6,5)…… 55
2.3.12 Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου (30% T, 2,67% C)…… 55
2.3.13 Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 M Tris-HCl pH 6,8…….. 56
2.3.14 Ρυθμιστικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl pH 8,8…….. 56
2.3.15 Διάλυμα 10% (w/v) SDS…… 56
2.3.16 Διάλυμα 0,05% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)…… 56
2.3.17 Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w/v) (ammonium persulfate, APS)……... 56
2.3.18 Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)……... 56
2.3.19 Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης…….. 56
2.3.20 Διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας 10-230 KDa……. 56
2.3.21 Διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας 2,5-20 KDa…….. 57
2.3.22 Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης……... 57
2.3.23 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5x) για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης……... 57
2.3.24 Ρυθμιστικό διάλυμα 2 M Tris-HCl pH 6,8……. 57
2.3.25 Διάλυμα 100 mM 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS……. 57
2.3.26 Διάλυμα 0,11% (w/v) της χρωστικής κυανούν της βρωμοφαινόλης….. 57
2.3.27 Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα *Native*-PAGE…….. 57

2.3.28 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5x) για πήκτωμα *Native*-PAGE. 58
2.3.29 Coomasie Brilliant Blue R-250……... 58
2.3.30 Διάλυμα χρωστικής για την ανίχνευση πρωτεϊνών με Coomasie Brilliant Blue R-250……... 58
2.3.31 Διάλυμα αποχρωματισμού μετά από χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Coomasie Brilliant Blue R-250……... 58
2.3.32 Διάλυμα συντήρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Coomasie Brilliant Blue R-250……. 58
2.3.33 Διάλυμα μονιμοποίησης…….. 58
2.3.34 Διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)…… 58
2.3.35 Διάλυμα νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$)…….. 58
2.3.36 Διάλυμα ανάπτυξης……... 58
2.3.37 Διαλύματα αιθανόλης 50% και 30%..... 59

2.4 Υγρές κυτταρικές καλλιέργειες βακτηριακών απομονώσεων……... 59

2.5 Συντήρηση Μικροοργανισμών……. 59

2.6 «Ενεργοποιημένες καλλιέργειες»…….. 59

2.7 Βιοδοκιμή ελέγχου της ευαισθησίας των παθογόνων έναντι αντιμικροβιακών ουσιών..... 59

Α) Διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ (agar spot assay) ……... 60
Β) Διάχυση σε πηγάδι από άγαρ (agar well diffusion assay)……. 60

2.8 Εκχύλιση βακτηριακού DNA……..... 62
2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR, για την ενίσχυση της 16S rDNA αλληλουχίας βακτηριακού στελέχους..... 64
2.10 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, καθαρισμός και αλληλούχιση…….. 66

2.11 Προσδιορισμός της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας που παράγεται στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους *Lactobacillus gasseri*……... 67

2.11.1 Επίδραση υδρολυτικών ενζύμων και καταλάσης στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας……... 67
2.11.2 Προσδιορισμός των παραμέτρων pH, θερμοκρασίας και διαφόρων αντιδραστηρίων στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας……. 68
2.12 Καλλιέργεια του παραγωγού στελέχους *Lactobacillus gasseri* σε κλειστό σύστημα αύξησης και προσδιορισμός της ποσότητας της παραγόμενης αντιμικροβιακής ουσίας…….. 69

2.12.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας σε εναιώρημα καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους με παράμετρο την Οπτική Πυκνότητα…….. 69

2.12.2 Προσδιορισμός της μονάδας δραστικότητας της παραγόμενης αντιμικροβιακής ουσίας……. 70

2.13 Καλλιέργεια σε κλειστό σύστημα αύξησης του ευαίσθητου στελέχους *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 και προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας..... 70

2.14 Προσδιορισμός του τρόπου δράσης της αντιμικροβιακής ουσίας έναντι του μικροοργανισμού δείκτη *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081…….. 71

Α) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας σε εναιώρημα καλλιέργειας του ευαίσθητου στελέχους με παράμετρο την Οπτική Πυκνότητα..... 72

Β) Εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων αναπαραγωγικών κυττάρων σε εναιώρημα καλλιέργειας του ευαίσθητου στελέχους……. 72

2.15 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford……... 73

2.16 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας…….. 74

2.16.1 Παραλαβή βακτηριοσίνης στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας, στελέχους λακτοβακίλλου…….. 74

2.16.2 Κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο της αντιμικροβιακής ουσίας στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας, στελέχους λακτοβακίλλου…… 75

2.16.3 Πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ουσίας……. 76

Α) Καθαρισμός πρωτεϊνικού μορίου με υγρή χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25 και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)……. 76

Β) Καθαρισμός πρωτεϊνικού μορίου με υγρή χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25 και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native-PAGE)…… 79

Γ) Καθαρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας με χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G- 100 και ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες …… 81

Δ)Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες με διαβάθμιση 10-20% (gradient native-PAGE)…… 82

Ε)Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες με διαβάθμιση 4-12% (gradient native-PAGE)…… 83

2.16.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση Coomasie Brilliant Blue R-250…….. 83

2.16.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου……... 84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ…… 85

3.1 Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων βακτηρίων…….. 86

Α) Γένος *Lactobacillus*……..... 86

Β) Γένος *Bifidobacterium*…….. 91

3.2 Μοριακή ταυτοποίηση του Bac$^+$ στελέχους *Lactobacillus* spp..... 93

3.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής ουσίας…… 94

3.3.1 Επίδραση με υδρολυτικά ένζυμα και καταλάση στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας……. 94

3.3.2 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας……. 95

3.3.3 Επίδραση διαφόρων αντιδραστηρίων στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας…… 95
3.4 Μελέτη του κλειστού κύκλου αύξησης του *Lactobacillus gasseri* και παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας…… 97
3.5 Προσδιορισμός της δράσης της αντιμικροβιακής ουσίας έναντι του μικροοργανισμού δείκτη *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081……... 98
3.6 Χαρακτηρισμός αντιμικροβιακής ουσίας…… 102
3.6.1 Πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ουσίας…….. 102
Πρωτόκολλο Α…….. 102
Πρωτόκολλο Β……... 104
Πρωτόκολλο Γ……... 105
Πρωτόκολλο Δ…….. 106
Πρωτόκολλο Ε…….. 106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ…… 109
4.1 Ανίχνευση Bac$^+$ στελεχών εντερικού μικροβιακού πληθυσμού……. 110
4.2 Χαρακτηριστικά αντιμικροβιακής δράσης……. 114
4.3 Παραγωγή βακτηριοσίνης και τρόπος δράσης…… 116
4.4 Καθαρισμός βακτηριοσίνης…….. 118
4.5 Γενικά συμπεράσματα…… 119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ…….. 120
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ……..... 136

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Εντερικός Μικροβιακός Πληθυσμός

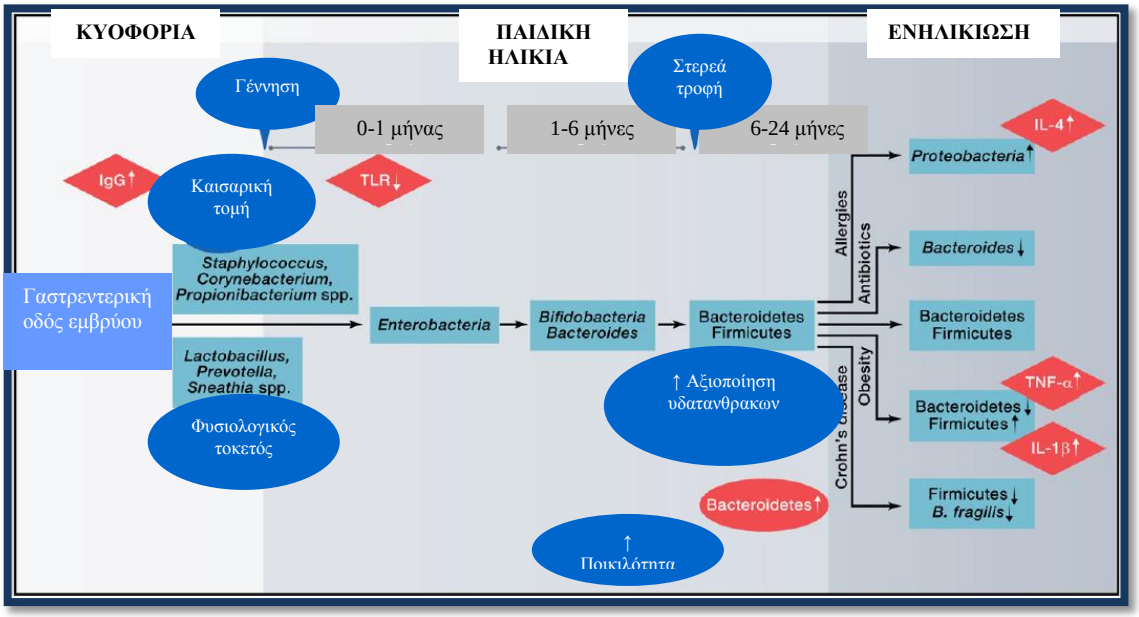
Ο όρος «ανθρώπινο μικροβιακό φορτίο» αναφέρεται στην ποικιλότητα των μικροοργανισμών που αποικούν στο ανθρώπινο σώμα και η οποία αριθμεί περίπου σε σε 10^{14} μικροβιακά κύτταρα. Μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών το σημαντικότερο ρόλο παίζουν τα βακτήρια και για αυτό οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν σε αυτά (Kunz *et al*. 2009, Neish *et al*. 2009, Hattori and Taylor 2009, Sekirov *et al*. 2010, Clemente *et al*. 2012, Matamoros *et al*. 2013).

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο φέρει τουλάχιστον 10 διαφορετικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι αποικίζουν το ανθρώπινο δέρμα, την ουροποιογεννητική οδό, την αναπνευστική οδό και τέλος τη γαστρεντερική οδό. Η μεγαλύτερη μικροβιακή κοινότητα του ανθρώπινου σώματος τοποθετείται στη γαστρεντερική οδό. Το έντερο και μόνο, υπολογίζεται ότι κατέχει το 70% όλων των μικροοργανισμών του ανθρώπινου σώματος καθώς έχει μία εκτιμώμενη επιφάνεια μεγέθους ενός γηπέδου «αντισφαίρισης», γεγονός που το αναδεικνύει ως το καταλληλότερο περιβάλλον για μικροβιακή αποίκιση. Επίσης, ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της γαστρεντερικής οδού που της παρέχει ένα πλεονέκτημα έναντι όλων των άλλων περιοχών αποίκισης είναι ότι είναι πλούσια σε χημικές ουσίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικά συστατικά από τους μικροοργανισμούς (Sekirov *et al*., 2010).

1.1.1 Χαρακτηριστικά εντερικού μικροβιακού πληθυσμού

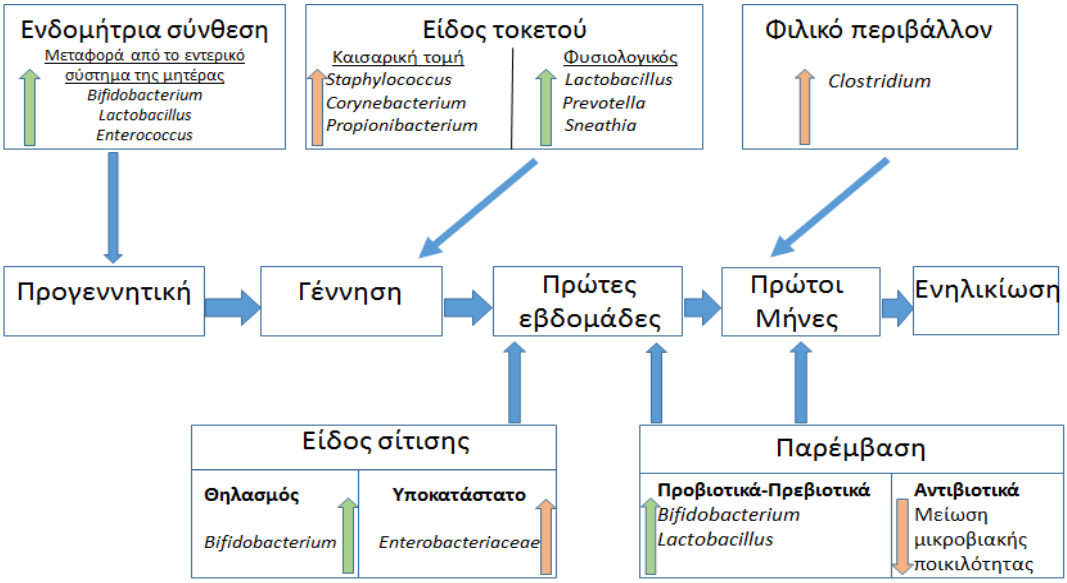
Η αποίκιση της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου αποτελεί μία εξαιρετικά δυναμική διαδικασία (Εικόνα 1.1). Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν αυτή τη μικροβιακή αποίκιση είναι ποικίλοι όπως η διάρκεια της κύησης (πρόωρος ή τελειόμηνος τοκετός), ο τρόπος τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή), η χρήση αντιβιοτικών, η γεωγραφική ζώνη ακόμα και το είδος σίτισης (μητρικό γάλα ή υποκατάστατο μητρικού γάλακτος) (Ross *et al*., 2010). Ως εκ τούτου, η μικροβιακή αποίκιση της γαστρεντερικής οδού δεν είναι τυχαία αλλά γίνεται κάτω από εξελικτικές πιέσεις, οι οποίες τελικά διαμορφώνουν ένα εντερικό μικροβιακό φορτίο που σύμφωνα με πολυάριθμες πρόσφατες μελέτες περιέχει ως επί το πλείστον δύο φύλα βακτηριών, τα Bacteroidetes (*Bacteroides* και *Prevotella*) και τα Firmicutes (*Clostridium, Faecalibacterium, Blautia, Ruminococcus* και *Lactobacillus*). Σε λιγότερο ποσοστό απαντώνται τα φύλα Actinobacteria (*Bifidobacterium*),

Proteobacteria (*Gammaproteobacteria* και *Enterobacteriaceae*) και Verrucomicrobia (*Akkermansia*) (Matamoros *et al*., 2013) (Εικόνα 1.2). Η μικροβιακή αυτή κοινότητα είναι εξαιρετικά δυναμική, με κάποια μέλη αυτής να λειτουργούν ως αυτόχθονοι μικροοργανισμοί και άλλοι ως αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, που προέρχονται δηλαδή από φαγητό προς πέψη, από το νερό και άλλα συστατικά του περιβάλλοντος μας (Ley *et al*., 2006).



Εικόνα 1.1: Ανάπτυξη του εντερικού μικροβιακού φορτίου της γαστρεντερικής οδού στην πάροδο του χρόνου. (Προσαρμοσμένο από Clemente *et al*., 2012)

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η σύνθεση του ανθρώπινου εντερικού συστήματος στο επίπεδο της συνομοταξίας είναι σταθερή, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολυάριθμοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση. Σε όλα τα άτομα, τα δύο φύλα τα οποία κυριαρχούν είναι αυτά που προαναφέρθηκαν, με τη διαφορά ανάμεσα τους να έγκειται στις διαφορετικές αναλογίες που αυτά απαντώνται. Διαφορές επίσης καταγράφονται σε επίπεδο γένους και είδους μέσα στα δύο φύλα. Λόγω αυτών των δεδομένων, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως αν και λαμβάνει χώρα εξελικτική πίεση όσον αφορά στην επικράτηση συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων, η αφθονία των λειτουργιών που αυτά επιτελούν, τους επιτρέπει τη διακύμανση της σύνθεσή τους μεταξύ των ατόμων, χωρίς όμως να διακυβεύεται η σωστή λειτουργία της γαστρεντερικής οδού (Sekirov *et al*., 2010).



Εικόνα 1.2: Επίδραση εξωτερικών παραγόντων στο εντερικό μικροβιακό φορτίο νεογνού. Τα πράσινα βέλη απεικονίζουν ωφέλιμες επιδράσεις, ενώ τα κόκκινα βέλη απεικονίζουν επιδράσεις που θεωρούνται αρνητικές για την υγεία. (Προσαρμοσμένο από Matamoros *et al*., 2013)

Το σύνολο των μικροοργανισμών που συνθέτουν το εντερικό μικροβιακό φορτίο του ανθρώπου, βακτήρια, ιοί, ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και τουλάχιστον ένα είδος Αρχαίου Προκαρυωτικού Οργανισμού αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το ξενιστή, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την ανθρώπινη υγεία και φυσιολογία (Sekirov *et al*., 2010). Ξεχωριστή θέση σε αυτόν τον συνεχή αγώνα προάσπισης της ανθρώπινης υγείας κατέχουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* (Mitsou *et al*., 2008).

1.1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια του εντερικού συστήματος

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία διαφοροποιημένη ομάδα Gram$^+$ βακίλλων και κόκκων, ανθεκτικά σε οξέα που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια και είναι αρνητικά στην αντίδραση της καταλάσης. Σχετίζονται μεταξύ τους από τα κοινά μεταβολικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά. Αποτελούν χημειοργανοτροφικούς μικροοργανισμούς και μεγαλώνουν μόνο σε πολύπλοκα θρεπτικά υποστρώματα. Είναι ευρέως κατανεμημένα σε διάφορα οικοσυστήματα και συνήθως απαντώνται σε τρόφιμα, σε απόβλητα, σε φυτά αλλά και στον γεννητικό, τον αναπνευστικό και τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι πως παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης των σακχάρων (Carr *et al*., 2002). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούνται από γένη με χαμηλό

ποσοστό G+C όπως τα γένη *Lactobacillus, Carnobacterium, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* και *Streptococcus* και σε χαμηλότερο ποσοστό από τα γένη *Enterococcus, Oenococcus, Sporolactobacillus, Tetragenococcus, Vagococcus* και *Weisella*. Πολλές φορές στην ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων συγκαταλέγονται και τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*, τα οποία αν και έχουν υψηλό ποσοστό G+C παράγουν και αυτά γαλακτικό οξύ ως προϊόν του μεταβολισμού τους. Από το σύνολο των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυτά που απαντώνται στη γαστρεντερική οδό του ανθρώπου είναι τα γένη *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* και *Bifidobacterium* (Savadogo *et al*., 2006).

Α) Το γένος Lactobacillus

Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus,* όπως προαναφέρθηκε ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια αφού το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των σακχάρων είναι το γαλακτικό οξύ και απαιτούν για την ανάπτυξη τους αναερόβιες συνθήκες επώασης. Ταξινομικά, το γένος *Lactobacillus* ανήκει στο φύλο *Firmicutes*, στην ομοταξία *Bacilli*, στην τάξη των *Lactobacillales* και τέλος στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Εμφανίζουν σύνθετες τροφικές ανάγκες και απαιτούν πλούσια θρεπτικά υποστρώματα για την αύξηση τους (υδατάνθρακες, αμινοξέα, πεπτίδια, εστέρες λιπαρών οξέων, άλατα, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων και βιταμίνες) (Claesson *et al*., 2007).

Τα βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus* spp. απαντώνται πάρα πολύ συχνά στον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό του ανθρώπου και το ποσοστό τους διαφοροποιείται από ποικίλους παράγοντες όπως η ηλικία του ανθρώπου. Ο διαχωρισμός των αυτόχθονων από τους αλλόχθονους λακτοβακίλλους ή ακόμα και από τους εφήμερους λακτοβακίλλους που προέρχονται από ζυμωμένα τρόφιμα είναι αρκετά περίπλοκος μέσα στο πολύπλοκο οικοσύστημα του εντερικού μικροβιακού συστήματος. Στα ενήλικα άτομα τα στελέχη των λακτοβακίλλων απαντώνται σε μικρές μόνο ποσότητες (0,01% έως 0,6%). Τα στελέχη *L. gasseri, L. reuteri, L. crispatus, L. salivarius* και *L. ruminis* αποτελούν τα κυρίαρχα αυτόχθονα μέλη της κοινότητας των λακτοβακίλλων στον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό. Επίσης στο ίδιο οικοσύστημα απαντώνται και τα στελέχη *L. acidophilus, L.fermentum, L. casei, L. rhamnosus, L. johnsonii, L. plantarum, L. brevis, L. delbrueckii, L. curvatus* και *L. sakei* (Heilig *et al*. 2002, Walter 2005).

Σε αντίθεση με τον ενήλικο εντερικό μικροβιακό πληθυσμό, το μικροβιακό φορτίο των νεογνών είναι πολύ ασταθές στη σύσταση του, όμως και αυτή περιλαμβάνει στελέχη του γένους *Lactobacillus*. Στα νεογνά ο αριθμός των λακτοβακίλλων βρέθηκε να είναι 10^5 cfu/g κοπράνων, ενώ στα βρέφη ηλικίας ενός μήνα και άνω οι μετρήσεις φτάνουν τα 10^6 – 10^8 cfu/g κοπράνων (Leeber *et al*., 2008).

Β) Το γένος Bifidobacterium

Τα στελέχη *Bifidobacterium* spp. είναι Gram θετικά, αναερόβια, αρνητικά στην καταλάση βακτήρια που δε σχηματίζουν ενδοσπόρια, δεν παράγουν αέριο και φέρουν υψηλό ποσοστό G+C (55-67%) (Ventura *et al*. 2004, Klijn *et al*. 2005). Η μορφολογία τους γενικά αναφέρεται ως δισχιδής με εικόνα που μοιάζει με ακανόνιστο σχήμα βακίλλου, ενώ συχνά σχηματίζουν βακίλλους με σχήμα που μοιάζει με το γράμμα Y. Η ακριβής αιτία για αυτό το ακανόνιστο σχήμα των *Bifidobacterium* spp. δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρη. Πάρα ταύτα, αρκετές μελέτες αναφέρουν πως η απουσία ή οι χαμηλές συγκεντρώσεις N- ακετυλάμινο-σακχάρου, ιόντων Ca^{2+} ή αμινοξέων (αλανίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμικό οξύ και σερίνη) στα θρεπτικά υποστρώματα αύξησης είναι οι παράγοντες που επάγουν τη δισχιδή μορφολογία των *Bifidobacterium* spp. (Cheikyoussef *et al*., 2008).

Ταξινομικά τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* ανήκουν στην οικογένεια *Bifidobacteriaceae*, στην τάξη *Bifidobacteriales* και τέλος στο φύλο *Actinobacteria*. Το φύλο *Actinobacteria* είναι ένα από τα μεγαλύτερα φύλα των Βακτηρίων, με 5 ομοταξίες, 6 τάξεις και 14 υποτάξεις. Όλα τα στελέχη του συγκεκριμένου φύλου εμφανίζουν υψηλό ποσοστό G+C (εκτός από το *Tropheryma whipplei*) και αποτελούν Gram θετικά βακτήρια (Eckburg *et al*. 2005, Ventura *et al*. 2007).

Τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από κόπρανα θηλαζόντων νεογνών από τον Henry Tissier το 1899 και καταχωρήθηκαν ως *Bacillus bifidus*, λόγω της δισχιδούς μορφολογίας τους. Μολονότι η Orla-Jensen είχε προτείνει την ορολογία *Bifidobacterium* το 1924, μόλις το 1973 στην όγδοη έκδοση του Bergey's Manual ανακατατάχθηκαν σε ξεχωριστή ταξινομική μονάδα και καθορίστηκαν ως γένος *Bifidobacterium*, το οποίο αποτελούνταν από 11 είδη. Ο Scardovi το 1986 ανέδειξε τα είδη σε 24, ενώ με βάση τις τελευταίες απομονώσεις βακτηριακών στελεχών του γένους *Bifidobacterium* από έντερο ανθρώπων, ζώων,

εντόμων, από γάλα αγελάδος και από τη στοματική κοιλότητα ανθρώπων ο αριθμός των διαφορετικών ειδών έχει ανέλθει στα 31 (Lee *et al*., 2010).

Τα *Bifidobacterium* spp. αποτελούν σημαντικά μέλη του ανθρώπινου εντερικού μικροβιακού φορτίου, όπου ο πληθυσμός τους ανέρχεται στα 10^{11} cfu/g κοπράνων, αντιπροσωπεύοντας κατά αυτόν τον τρόπο το 91% του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού σε βρέφη που τρέφονται με μητρικό γάλα. Η παρουσία τους στο εντερικό μικροβιακό σύστημα έχει συνδεθεί με ευεργετικές επιδράσεις (Margolles *et al*., 2006). Ο πληθυσμός αυτών των οργανισμών μειώνεται σταδιακά σε αριθμό, από τη στιγμή του απογαλακτισμού και υπολογίζεται ότι φτάνει το 25% του συνολικού ανθρώπινου εντερικού μικροβιακού φορτίου σε υγιείς ενήλικες (Kheadr *et al*., 2007)

1.1.3 Αναλογία των εντερικών παθογόνων μικροβίων στο σύνολο του μικροβιακού φορτίου του εντερικού συστήματος

Το ανθρώπινο εντερικό σύστημα αποτελείται από ένα πλήθος ωφέλιμων και επιβλαβών μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι είτε αυτόχθονοι, είτε αλλόχθονοι, να εισέρχονται δηλαδή στο εντερικό σύστημα μέσω της τροφής, του νερού και της αναπνοής. Μέσα σε αυτό το πολύπλοκο οικοσύστημα που δημιουργείται, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* θεωρούνται ότι σχηματίζουν μία ασπίδα προστασίας στην είσοδο και την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Ορισμένοι από τους μηχανισμούς δράσης που έχουν αναπτύξει οι μικροοργανισμοί του εντερικού συστήματος για την αντιμετώπιση των εισερχόμενων παθογόνων αποτελούν ένα είδος συναγωνιστικού αποκλεισμού, όπως είναι η κατάληψη των περιοχών προσκόλλησης των παθογόνων, η κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών καθώς και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (Corr, Hill and Cahan, Advances in Food and Nutrition Research, 2009).

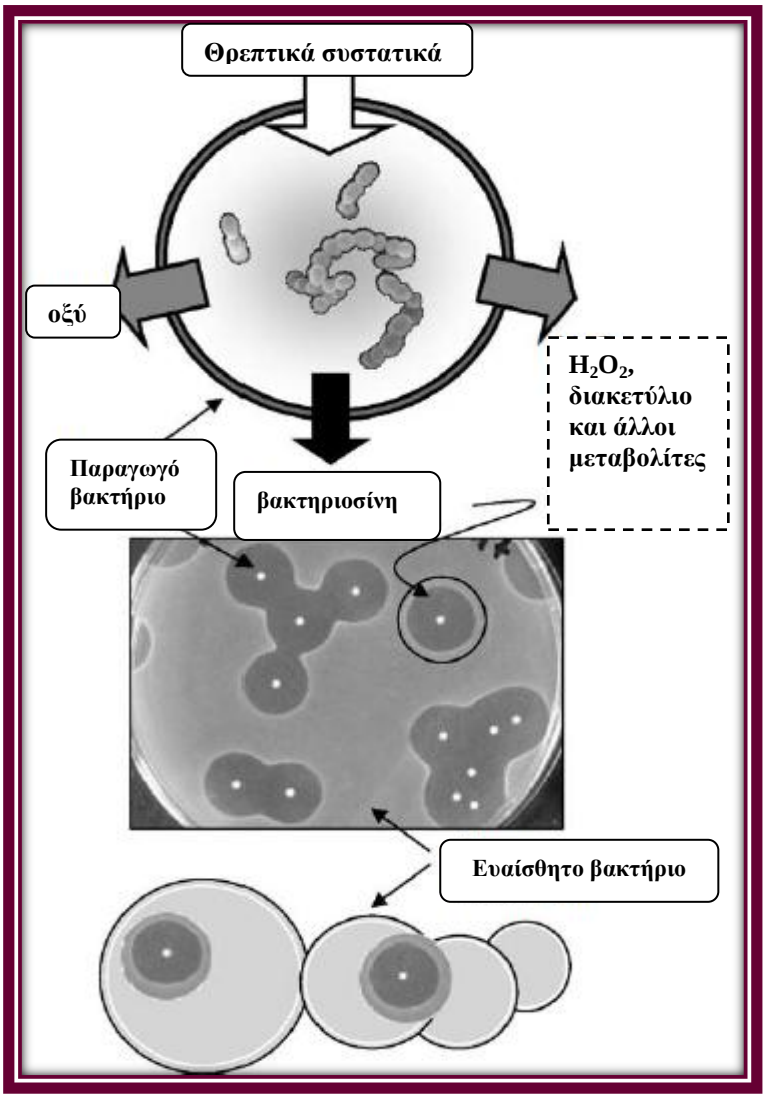
Οι δύο πρώτοι μηχανισμοί εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα δράσης, ενώ ο τρίτος μηχανισμός παρουσιάζει εξειδικευμένη και μη εξειδικευμένη δράση. Στη μη εξειδικευμένη δράση συγκαταλέγεται η έκκριση μη ειδικών αντιμικροβιακών ουσιών, όπως τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η έκκριση τοξινών όπως οι βακτηριοσίνες, οι βακτηριοσίνες - like αντιμικροβιακές ουσίες και οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν περιορισμένο και στοχευμένο φάσμα δράσης (Eschenbach *et al*. 1989, Carr *et al*. 2002, Smith *et al*. 2007).

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας όπως το προπιονικό, το οξικό, το φορμικό, το βουτυρικό και το γαλακτικό οξύ παράγονται κατά τη διάρκεια του αναερόβιου μεταβολισμού των υδατανθράκων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του pH. Η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών αυτών οξέων έγκειται στη διαμόρφωση δυσμενών συνθηκών για την επιβίωση των παθογόνων, καθώς μπορούν και διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να φτάνουν μέχρι το κυτταρόπλασμα μειώνοντας και εκεί σημαντικά το pH (Gillor *et al*., 2008). Το 2005 ο Walker και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως τα βακτήρια του γένους *Bacteroides* επικρατούσαν έναντι άλλων ειδών βακτηρίων σε υψηλά pH, ενώ σε επικείμενη μείωση της τιμής του pH λόγω παρουσίας οργανικών οξέων η μικροβιακή σύνθεση άλλαζε και τα βακτήρια τα οποία επικρατούσαν ήταν τα *Roseburia* και το *Eubacterium rectal*. Πέραν όμως της αντιμικροβιακής δράσης που παρατηρείται λόγω της παρουσίας οργανικών οξέων, η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου πιθανολογείται επίσης να αναστέλλει, μη ειδικά, την ανάπτυξη των παθογόνων στη γαστρεντερική οδό καθώς έχει παρατηρηθεί σε πολυάριθμες μελέτες πως βακτήρια του γένους *Lactobacillus* του μικροβιακού πληθυσμού της ουροποιογεννητικής οδού γυναικών αναστέλλουν την ανάπτυξη κολπικών παθογόνων με την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Falagas *et al*., 2007).

Στην περίπτωση της εξειδικευμένης αντιμικροβιακής δράσης, οι βακτηριοφάγοι εμφανίζονται να δρουν ενάντια ενός μόνο είδους βακτηρίων και για αυτόν τον λόγο προτάθηκε η χρήση τους για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων βακτηριακών εισβολέων. Η πρόταση αυτή αν και αρχικά αποτέλεσε πηγή ανησυχίας, έκτοτε πολυάριθμες επιστημονικές έρευνες έχουν μελετήσει την *in vivo* χρήση των βακτηριοφάγων έναντι παθογόνων βακτηριακών στελεχών (Andreatti Filho *et al*. 2007, Rivas *et al*. 2010).

Σε αντίθεση με τους βακτηριοφάγους οι βακτηριοσίνες με τον εξειδικευμένο τρόπο δράσης έχουν βρεθεί να είναι ασφαλείς στην ανθρώπινη κατανάλωση από τη 'Food and Drug Administration' (Gillor *et al*., 2008). Τη μεγαλύτερη συμβολή σε αυτήν την προστασία από τα παθογόνα που εισέρχονται στη γαστρεντερική οδό την παρέχουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Εικόνα 1.3), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πλήθος αντιμικροβιακών ουσιών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. & *Pediococcus* spp.) μαζί με τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* αποτελούν τους κύριους παραγωγούς βακτηριοσινών, ένα χαρακτηριστικό που τους αποδίδει ένα σημαντικό βιολογικό ρόλο που διατηρήθηκε

κατά τη διάρκεια πολλών γενεών, ενώ η ακριβής φύση αυτών των αντιμικροβιακών ουσιών αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης επιστημονικής μελέτης τα τελευταία χρόνια.



Εικόνα 1.3: Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν έναν μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών ουσιών, αλλά οι βακτηριοσίνες αποτελούν τους πιο ισχυρούς αναστολείς συγγενών βακτηρίων. Ένα βακτηριακό στέλεχος που παράγει βακτηριοσίνη μπορεί να ταυτοποιηθεί με την παρατήρηση των ζωνών αναστολής που δημιουργούνται σε μία επιφάνεια με τον μικροοργανισμό που εμφανίζει ευαισθησία στη συγκεκριμένη βακτηριοσίνη (μικροοργανισμός δείκτης). (Προσαρμοσμένο από Deegan *et al*., 2006)

1.2 Βακτηριοσίνες

Η πρώτη βακτηριοσίνη ταυτοποιήθηκε πριν από περίπου 100 χρόνια, όταν ο Gratia το 1925 απέδειξε ότι το στέλεχος *Escherichia coli V* παρήγαγε μέσα σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα μία διαλυτή, θερμοσταθερή ουσία με τοξική δράση ενάντια στην *E.*

coli ϕ, η οποία αργότερα ονομάστηκε κολισίνη (colicin V). Ακολούθησε μία περίοδος όπου μελετήθηκαν όλες οι κολισίνες που παράγονταν από στελέχη *E. coli* και από άλλα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae.* Μέσω αυτής της εκτεταμένης μελέτης, προέκυψε το συμπέρασμα πως η ασυνήθιστα μικρού μεγέθους, θερμοσταθερή colicin V διαφοροποιούνταν από τις υπόλοιπες κολισίνες, γεγονός που οδήγησε στην μετέπειτα κατάταξη της ως μικροσίνη (microcin) (Faith *et al*., 1992). Η παρατήρηση ότι αντιμικροβιακές ουσίες τύπου κολισίνης παράγονταν και από άλλα είδη βακτηρίων εκτός από τα κολίμορφα οδήγησε το Jacob το 1953 να τις ονομάσει «βακτηριοσίνες». Οι βακτηριοσίνες ορίστηκαν ως αντιβιοτικά-πρωτεΐνες τύπου κολισίνης, συμβολίζοντας υπό αυτήν την έννοια μόρια που φέρανε τα εξής χαρακτηριστικά: θνησιγόνα βιοσύνθεση, θανατηφόρα δράση μεταξύ κυρίαρχων στελεχών του ίδιου είδους και προσρόφηση σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των ευαίσθητων στη βακτηριοσίνη κυττάρων (James *et al*., 1992). Μολονότι μέχρι τότε ο ερευνητικός κόσμος είχε εστιάσει στην ανίχνευση βακτηριοσινών που παράγονται από Gram αρνητικά βακτήρια, το 1976 δημοσιεύεται μία μελέτη ανασκόπησης η οποία προβλέπει μία αλλαγή κατεύθυνσης της έρευνας στις βακτηριοσίνες από Gram θετικά βακτήρια (Tagg *et al*., 1976). Πράγματι, οι περισσότερες έρευνες από τότε άρχισαν να προσανατολίζονται στις βακτηριοσίνες από Gram θετικά βακτήρια, καθώς φάνηκε πως αυτά τα μόρια μπορούσαν να έχουν πρακτική εφαρμογή είτε στη συντήρηση των τροφίμων είτε στην πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Έκτοτε, βακτηριοσίνες έχουν βρεθεί σε όλη σχεδόν την επικράτεια των Βακτηρίων και πρόσφατα και σε ορισμένα μέλη της επικράτειας των Αρχαίων Προκαρυωτικών Οργανισμών (Shand and Leyva 2008). Σύμφωνα με τον Klaenhammer (1988), το 99% όλων των βακτηρίων παράγουν το λιγότερο μία βακτηριοσίνη και ο μόνος λόγος που αυτές δεν έχουν απομονωθεί είναι γιατί μόνο λίγοι ερευνητές έχουν εξετάσει για αυτές.

Σήμερα, οι βακτηριοσίνες ορίζονται ως μικρά, εξωκυτταρικά πεπτίδια που συντίθενται στο ριβόσωμα και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων βακτηρίων αλλά και βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στις τροφές (Brandao *et al.*, 2010). Τα μόρια των βακτηριοσινών εμφανίζουν σταθερότητα στη θερμότητα, σε χαμηλό pH, σε ασθενή οργανικά οξέα, σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης, σε άλατα και ένζυμα και ως εκ τούτου είναι πιθανοί παράγοντες για εφαρμογή στα συστήματα

συντήρησης τροφίμων (De Souza *et al*., 2005). Ο μικροοργανισμός που τις παράγει φέρει συγγενές σύστημα ανοσίας για την αυτοπροστασία του (O'Shea *et al*., 2011). Η ειδοποιός διαφορά των βακτηριοσινών σε σχέση με τα αντιβιοτικά, τα οποία αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι ότι συντίθενται στο ριβόσωμα. Επίσης, παρουσιάζουν περιορισμένο φάσμα δράσης, ενώ τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τους και το σύστημα ανοσίας συνήθως οργανώνονται σε οπερόνια (Gillor *et al*., 2008). Οι περισσότερες βακτηριοσίνες εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι συγγενών ειδών βακτηρίων ως προς το παραγωγό στέλεχος και αυτός είναι ο λόγος που εικάζεται πως αυτά τα πεπτίδια βοηθούν τα στελέχη που τα παράγουν στον συναγωνισμό για την επιβίωση τους μέσα στην οικολογική τους θέση. Πάρα ταύτα υπάρχουν και βακτηριοσίνες με ευρύτερο φάσμα δράσης, όπως η νισίνη που παράγεται από το *Lactococcus lactis*, η οποία είναι δραστική έναντι πολυάριθμων $Gram^+$ μικροοργανισμών δεικτών.

Ο όρος βακτηριοσίνες-like ενώσεις (BLIS=bacteriocin-like inhibitory substances) αναφέρεται σε πρωτεϊνικές ενώσεις με ανταγωνιστική δράση, οι οποίες είτε δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως, είτε δεν εμφανίζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των βακτηριοσινών. Οι συγκεκριμένες ενώσεις τείνουν να εμφανίζουν ένα ευρύτερο φάσμα δράσης (Cheikyoussef *et al*., 2008).

1.2.1 Ταξινόμηση βακτηριοσινών

Α) Πρώτο σύστημα ταξινόμησης

Το σύστημα ταξινομήσης των βακτηριοσινών που ίσχυε τα τελευταία χρόνια προσομοιάζει εκείνο που πρότεινε ο Klaenhammer το 1993. Η ταξινόμηση αυτή αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια αλλά πλέον έχει διευρυνθεί η χρήση της για όλα τα βακτήρια. Η ταξινόμηση αυτή διαχωρίζει τα μόρια αυτά σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ανάλογα με την πρωτοταγή, την τεταρτοταγή δομή τους και το μοριακό τους βάρος.

Τάξη Ι: Στην τάξη αυτή περιλαμβάνονται μικρά, ριβοσωμικά πεπτίδια που υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και χαρακτηρίζονται από την παρουσία τροποποιημένων αμινοξέων όπως λανθειονίνη, μεθυλολανθειονίνη, δεϋδροβουτυρίνη και δεϋδροαλανίνη. Η ομάδα αυτή υποδιαιρείται σε δύο υποομάδες. Η ομάδα Ια περιλαμβάνει επιμηκυμένα, αμφιπαθικά αντιβιοτικά που σχηματίζουν πόρους στις μεμβράνες των κυττάρων στόχων και παράγονται από βακτήρια που ζυμώνουν το

γαλακτικό οξύ (οξυγαλακτικά βακτήρια) και η ομάδα Ιβ αντιπροσωπεύεται από άκαμπτα και σφαιρικά αντιμικροβιακά πεπτίδια χωρίς καθαρό αρνητικό ή θετικό φορτίο. Γενικά τα πεπτίδια της τάξης αυτής αποτελούνται από 19 μέχρι και 50 αμινοξέα. Στην ομάδα Ια αντιστοιχεί και η ευρέως γνωστή βακτηριοσίνη, νισίνη (Milette *et al*., 2008).

Τάξη ΙΙ: Η τάξη αυτή περιλαμβάνει μεμβραβοενεργά, μη τροποποιημένα πεπτίδια και χωρίζεται σε τρεις υποομάδες:

- Η τάξη ΙΙα περιλαμβάνει πεδιοσίνη – like βακτηριοσίνες με αντιλιστεριακή δράση που φέρουν μία Ν-τελική αλληλουχία με ένα συναινετικό μοτίβο αμινοξέων Tyr-Gly-Asn-Gly-Val- καθώς και δύο υπολείμματα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου.
- Η τάξη ΙΙβ περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που η αντιμικροβιακή τους δράση οφείλεται στη συνεργιστική δράση δύο πεπτιδίων. Για την πλήρη δραστικότητα αυτών των βακτηριοσινών απαιτείται η παρουσία και των δύο πεπτιδίων. Τα δύο πεπτίδια φέρουν διαφορετική πρωτοταγή δομή και κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια. Σε αυτήν την υποομάδα ανήκουν η λακτοκοκκίνη Μ και η λακτασίνη F.
- Η τάξη ΙΙγ περιλαμβάνει άλλες κυκλικές βακτηριοσίνες.

Τάξη ΙΙΙ: Η τάξη αυτή περιλαμβάνει θερμοασταθείς βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους (> 30 KDa) και ως εκ τούτου δε θεωρούνται πεπτίδια αλλά πρωτεΐνες. Κύριοι αντιπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι η λακτασίνη Α, η λακτασίνη Β και η ελβετισίνη J.

Τάξη IV: Στην τάξη αυτή περιλαμβάνονται πολύπλοκες βακτηριοσίνες όπως λιποπρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν έχει απομονωθεί και καθαριστεί πλήρως καμία τέτοια βακτηριοσίνη και για αυτόν τον λόγο θεωρείται πως αυτός ο τύπος είναι ένα φαινομενικό αποτέλεσμα που οφείλεται στις κατιονικές και υδρόφοβες ιδιότητες των βακτηριοσινών, που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπλόκου με άλλα μόρια όπως λιπίδια ή υδατάνθρακες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της πλανταρισίνης S, η οποία αρχικά θεωρήθηκε ως ένα μεγάλο σύμπλοκο μόριο και στην πορεία διαπιστώθηκε μέσω του καθαρισμού της ότι πρόκειται για ένα μικρό πεπτίδιο καθώς ο διαχωρισμός

του συμπλόκου δεν οδήγησε στην απώλεια της δραστικότητας του μορίου (Jimenez-Diaz *et al*., 1995).

Β) Δεύτερο σύστημα ταξινόμησης

Λόγω του ότι υπήρχαν μεγάλες αδυναμίες κατάταξης των βακτηριοσινών με βάση τα κριτήρια που έθεσε ο Klaenhammer, σήμερα θεωρείται πιο αποδεκτός ένας άλλος τρόπος κατάταξής τους σύμφωνα με τον οποίο οι βακτηριοσίνες χωρίζονται σε δύο τάξεις. Η τάξη Ι περιλαμβάνει τα λαντιβιοτικά, τα πεπτίδια δηλαδή που φέρουν το τροποποιημένο αμινοξύ λανθειονίνη και η τάξη ΙΙ περιλαμβάνει όλες τις υπόλοιπες βακτηριοσίνες (Cotter *et al*. 2005, Nishie *et al*. 2012). Η κάθε τάξη υποδιαιρείται σε ομάδες οι οποίες έχουν ως εξής:

Τάξη Ι: Στην τάξη αυτή περιλαμβάνονται όλα τα λαντιβιοτικά τα οποία διαχωρίζονται σε υποομάδες με βάση τον τρόπο ωρίμανσης του πρόδρομου μορίου που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της βακτηριοσίνης. Όλα τα λαντιβιοτικά είναι μικρά πεπτίδια με μικρό μοριακό βάρος (19 έως 38 αμινοξέα). Χωρίζονται στις εξής δύο υποομάδες (Willey and van der Donk 2007):

- Στην τάξη Ια περιλαμβάνονται τα λαντιβιοτικά, των οποίων τα πρόδρομα μόρια διαφοροποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια τα Lan B και Lan C.
- Στην τάξη Ιβ περιλαμβάνονται τα λαντιβιοτικά των οποίων το πρόδρομο μόριο διαφοροποιείται από το γονίδιο Lan M.

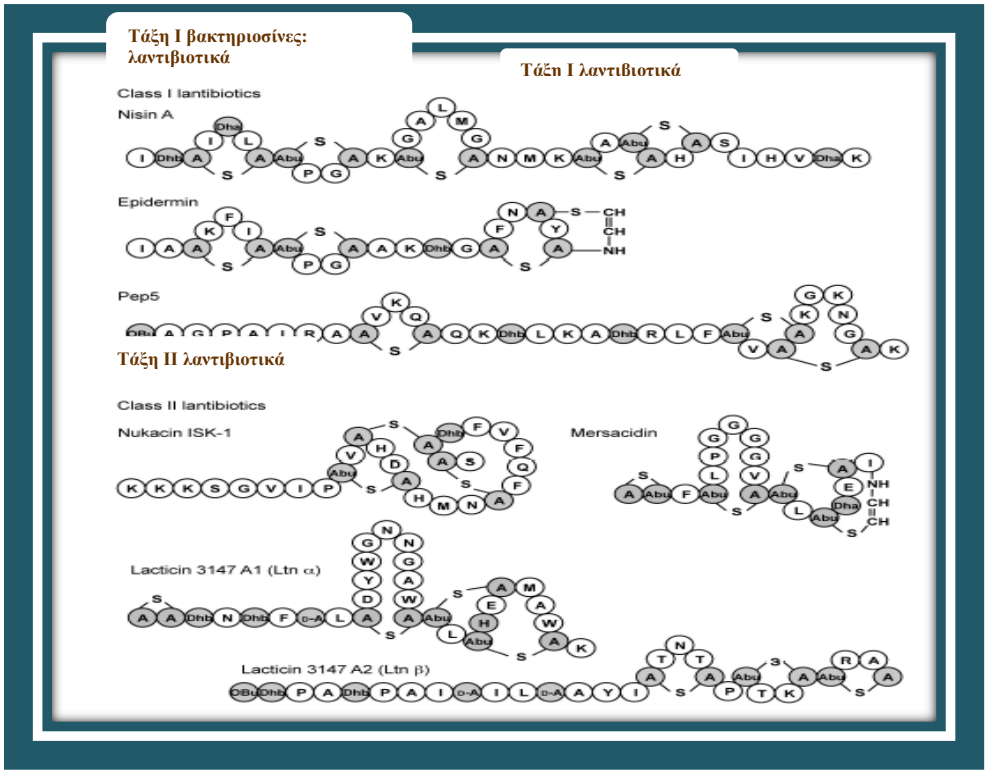
Τάξη ΙΙ: περιλαμβάνει τις βακτηριοσίνες που δεν αποτελούν λαντιβιοτικά και χωρίζονται σε τέσσερις υποομάδες.

- Στην τάξη ΙΙα περιλαμβάνονται τα πεδιοσίνη–like πεπτίδια με έντονη αντιλιστεριακή δράση. Τα πεπτίδια αυτά, όπως προαναφέρθηκε, φέρουν ένα χαρακτηριστικό συναινετικό μοτίβο στο αμινοτελικό τους άκρο YGNGVXC.

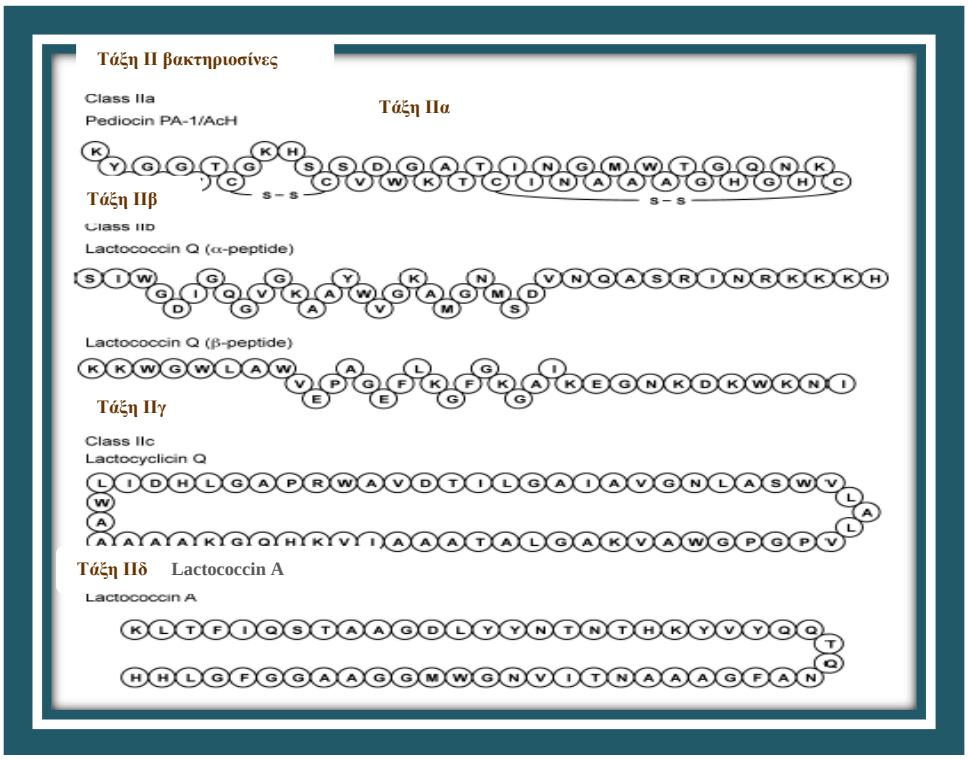
Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση βακτηριοσινών βάση του συστήματος που πρότειναν ο Cotter και οι συνεργάτες (2005)

Τάξη	Χαρακτηριστικά	Παραδείγματα
Τάξη Ι	Λαντιβιοτικά-Βακτηριοσίνες που περιέχουν λανθιονίνη	
Ια	Τροποποιημένα αμινοξέα που εισάγονται από Lan B και Lan C	Νισίνη, Σουμπτιλίνη, Επιδερμίνη, Pep5
Ιβ	Τροποποιημένα αμινοξέα που εισάγονται από Lan M	Λακτισίνη 481, Νουκασίνη KS-1, Μερσασιδίνη, Λακτισίνη 3147
Τάξη ΙΙ	Βακτηριοσίνες χωρίς λανθιονίνη	
ΙΙα	πεδιοσίνη-like βακτηριοσίνες, εξειδικευμένη αντιλιστεριακή δράση	Πεδιοσίνη PA-1/AcH, Λευκοσίνη A
ΙΙβ	βακτηριοσίνες 2 πεπτιδίων	Λακτοκοκκίνη G, Λακτοκοκκίνη Q
ΙΙγ	κυκλικές βακτηριοσίνες	Εντεροσίνη AS-48, Γκασερισίνη A, Λακτοκυκλίνη Q
ΙΙδ	μονοπεπτιδικές, μη πεδιοσίνη-like, γραμμικές βακτηριοσίνες	Λακτοκοκκίνη A, Λακτισίνη Q

- Στην τάξη ΙΙβ περιλαμβάνονται οι βακτηριοσίνες που αποτελούνται από δύο πεπτίδια, τα οποία είναι εξίσου απαραίτητα για τη δραστικότητα του μορίου. Τα δύο πεπτίδια κωδικοποιούνται από δύο παρακείμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και μεταγράφονται και συντίθενται μαζί..
- Στην τάξη ΙΙγ περιλαμβάνονται τα κυκλικά μόρια βακτηριοσινών, των οποίων το N- και το C- τελικό άκρο τους ενώνονται ομοιοπολικά μέσω πεπτιδικού δεσμού.
- Στην τάξη ΙΙδ ανήκουν όλες οι μονοπεπτιδικές γραμμικές βακτηριοσίνες που δεν εμφανίζουν κάποια ομολογία αλληλουχίας με τις υπόλοιπες. Ορισμένοι ερευνητές ισχυρίζονται πως αυτή η κατηγορία θα μπορούσε να διακριθεί περαιτέρω βάσει της αλληλουχίας του πεπτιδίου οδηγού τους. Οι αλληλουχίες του πεπτιδίου οδηγού σε ορισμένες βακτηριοσίνες φέρουν ένα σημείο διαχωρισμού, το οποίο μετέπειτα θα λειτουργήσει ως μονό πεπτίδιο και θα εισέλθει στο *sec* εκκριτικό μονοπάτι. Αντίθετα υπάρχουν βακτηριοσίνες που δε φέρουν καθόλου N-τελική αλληλουχία οδηγό



Εικόνα 1.4: Δομή των βακτηριοσινών της τάξης Ι. Η ταξινόμηση έγινε βάση του μονοπατιού βιοσύνθεσης του πρόδρομου μορίου της βακτηριοσίνης. (Προσαρμοσμένο από Nishie *et al*., 2012)



Εικόνα 1.5: Δομή βακτηριοσινών τάξης ΙΙ (Προσαρμοσμένο από Nishie *et al*., 2012)

1.2.2 Γενετική των βακτηριοσινών

Ο γενετικός τόπος των βακτηριοσινών μπορεί να είναι είτε σε πλασμίδιο, είτε σε χρωμόσωμα και πολλές φορές σχετίζονται με μεταθετά στοιχεία. Ανεξαρτήτως όμως του γενετικού τόπου, για την παραγωγή των βακτηριοσινών απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερα γονίδια τα οποία οργανώνονται σε οπερόνιο με συγκεκριμένη σειρά (Ennahar *et al*., 2000):

- Το δομικό γονίδιο, που κωδικοποιεί το πρόδρομο μόριο βακτηριοσίνης
- Το γονίδιο ανοσίας, που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ανοσίας που προστατεύει τον παραγωγό της βακτηριοσίνης από την ίδια τη βακτηριοσίνη του
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC-μεταφορέα, που είναι απαραίτητος για την έκκριση του μορίου
- Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία βοηθητική πρωτεΐνη, άγνωστης λειτουργίας (πιθανώς βοηθάει στην εξωτερίκευση του μορίου)

Οι βακτηριοσίνες που υπόκεινται σε μεταγραφική ρύθμιση προϋποθέτουν την παρουσία επιπρόσθετων ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης σε γειτνίαση με το δομικό γονίδιο με ακριβή σειρά. Τα γονίδια αυτά σχηματίζουν μία τριών συστατικών αυτορυθμιζόμενη κασέτα μεταγωγής σήματος και κωδικοποιούν ένα πιθανό επαγωγικό παράγοντα (IF), συνήθως είναι ένα πεπτίδιο φερομόνης, μία πρωτεΐνη κινάση της ιστιδίνης (HPK) και ένα ρυθμιστή απόκρισης (RR). Στην περίπτωση των αυτοεπαγόμενων συστημάτων η κασέτα μεταγωγή σήματος περιλαμβάνει μόνο το ρυθμιστή απόκρισης και την κινάση της ιστιδίνης, τα οποία επίσης οργανώνονται σε οπερόνια, ενώ η επαγωγή μπορεί να γίνεται από το ίδιο το μόριο της βακτηριοσίνης.

1.2.3 Βιοσύνθεση βακτηριοσινών

1.2.3.1 Σχηματισμός του πρόδρομου μορίου των βακτηριοσινών

Από τη μετάφραση του mRNA του δομικού γονιδίου των βακτηριοσινών προκύπτει η σύνθεση ενός πρόδρομου μορίου βακτηριοσίνης. Αυτό το πρόδρομο μόριο της βακτηριοσίνης είναι βιολογικά ανενεργό και περιέχει μία C-τελική περιοχή που ονομάζεται προ-πεπτίδιο (propeptide), το οποίο ενίοτε, μετά από ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποκόπτεται από τη N-τελική «αλληλουχία οδηγό»

προκειμένου να μετατραπεί στην ώριμη μορφή του αντιμικροβιακού μορίου. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, δηλαδή οι χημικές μεταβολές τις οποίες υφίστανται οι πρωτεΐνες, γίνονται αμέσως μετά την έξοδο των πρωτεϊνικών μορίων από το ριβόσωμα. Η τροποποίηση των αμινοξέων γίνεται μέσω ενζύμων, των οποίων τα γονίδια που τα κωδικοποιούν βρίσκονται πλησίον του δομικού μορίου της βακτηριοσίνης (Savadogo *et al*., 2006).

Στις εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα λαντιβιοτικά περιλαμβάνεται ο σχηματισμός πολλών ασυνήθιστων αμινοξέων. Ο Ingram το 1970 πρότεινε πως τα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνη και θρεονίνη μετατρέπονται σε δεΰδροαλανίνη και δεΰδρομεθυλοανανίνη αντίστοιχα, τα οποία έπειτα με τη σειρά τους μετατρέπονται σε λανθειονίνη και μεθυλολανθειονίνη με την προσθήκη θειολικών ομάδων κυστεΐνης.

Το πρόδρομο μόριο των μη λαντιβιοτικών βακτηριοσινών υφίσταται τροποποιήσεις με την αποκοπή της αρχικής ακολουθίας, κάτι που όπως φάνηκε είναι απαραίτητο για την έκκριση τους και τη μεταφορά τους διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Ennahar *et al*., 1999).

1.2.3.2 Αλληλουχία οδηγός του πρόδρομου μορίου των βακτηριοσινών

Μετά από εκτεταμένες μελέτες ανάλυσης της Ν-τελικής αλληλουχίας ώριμων μορίων βακτηριοσίνης, μέσω της μεθόδου αποικοδόμησης κατά Edman και αλληλούχισης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, προέκυψε μία σημαντική παρατήρηση. Οι αλληλουχίες οδηγοί των διαφόρων μορίων βακτηριοσίνης που παράγονται από βακτηριακά στελέχη του ίδιου είδους παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας, γεγονός που υποδεικνύει πως αυτές οι αλληλουχίες είναι υψηλά συντηρημένες. Εάν μάλιστα, αυτή η παρατήρηση αποδοθεί στην υδροφοβικότητα και στο φορτίο καθενός από τα κατάλοιπα αμινοξέος που απαρτίζουν την αλληλουχία, τότε φαίνεται πως έχει λάβει χώρα μία αξιοσημείωτη σταθερή συντήρηση αυτών των χαρακτηριστικών στις αντίστοιχες θέσεις μέσα στις αλληλουχίες οδηγούς αυτών των βακτηριοσινών. Μολονότι η ακριβής λειτουργία αυτών των πεπτιδίων οδηγών δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί, είναι σαφές πως διαφέρουν στη χημική τους δομή και λειτουργία από τα τυπικά πεπτίδια οδηγούς που κατευθύνουν τα πολυπεπτίδια στα *sec*- εξαρτώμενα μονοπάτια έκκρισης. Οι πιθανές λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στα πεπτίδια οδηγούς των πρόδρομων μορίων βακτηριοσίνης είναι οι εξής (Jack *et al*., 1995):

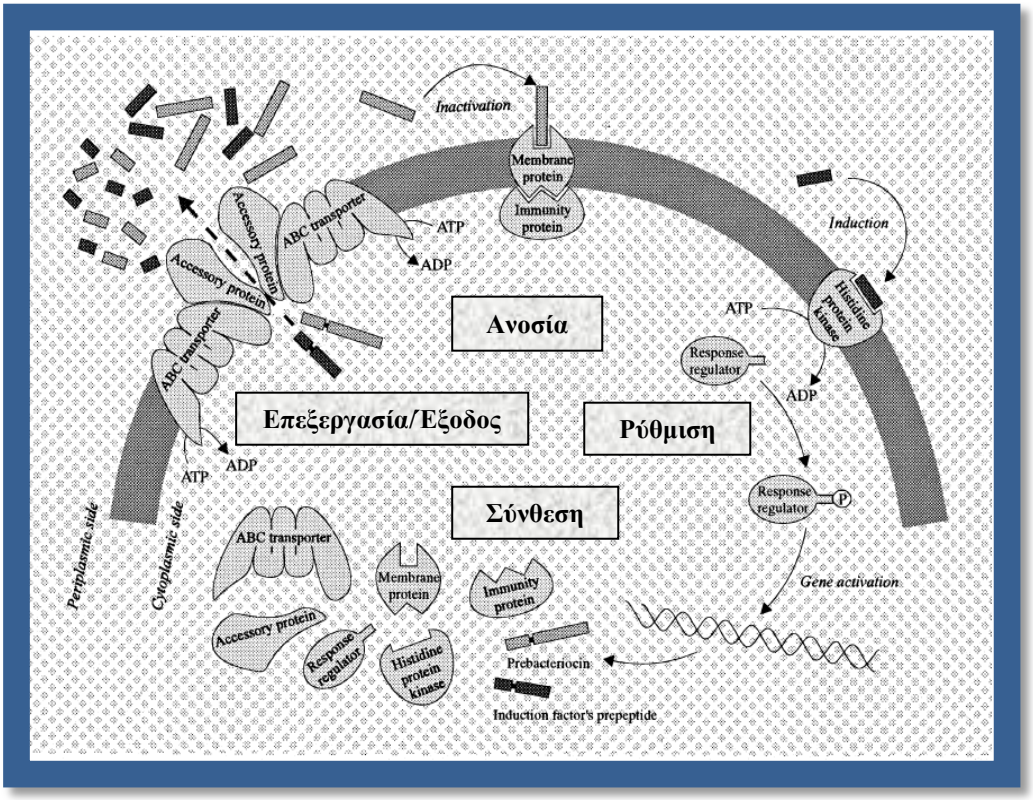
- Σταθεροποιούν το μόριο κατά τη διάρκεια της μετάφρασης
- Διατηρούν το μόριο ανενεργό έναντι της κυτταρικής μεμβράνης
- Διατηρούν τη στερεοδομή του προ-πεπτιδίου κατά τη διάρκεια των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων
- Βοηθούν στη μετακίνηση των πρόδρομων μορίων από ειδικά συστήματα μεταφοράς

1.2.3.3 Σχηματισμός και απελευθέρωση των βιολογικά ενεργών βακτηριοσινών

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες των τάξεων I και II μεταφέρονται έξω από τον κυτταρικό χώρο με μία οικογένεια πρωτεϊνών μεταφορέων, τις ABC transporters (ATP-binding cassette transporters). Η οικογένεια αυτή των πρωτεϊνών αποτελείται από δύο επικράτειες (C-τελική και N-τελική επικράτεια) στην κυτοσολική πλευρά, οι οποίες είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη με μία παρεμβαλλόμενη διαμεμβρανική περιοχή (Drider *et al*., 2006).

Η C-τελική κυτοσολική επικράτεια περιέχει την ATP-binding cassette, η οποία μετά από υδρόλυση του μορίου ATP ενεργοποιεί την έκκριση του πεπτιδίου έξω από το κύτταρο, ενώ η N-τελική πρωτεϊνική περιοχή φέρει την πρωτεολυτική δραστικότητα που είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό και την ωρίμανση του πρόδρομου μορίου της βακτηριοσίνης (Franke *et al*.,1999). Το πρόδρομο μόριο αποκόπτεται στη C-τελική περιοχή του που φέρει συνήθως ένα διπλό μοτίβο Gly-Gly, απελευθερώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την ώριμη βακτηριοσίνη. Για τη μετακίνηση της ώριμης βακτηριοσίνης διαμέσου της μεμβράνης θεωρείται ότι χρησιμεύουν η διαμεμβρανική περιοχή του ABC μεταφορέα και η βοηθητική πρωτεΐνη (Ennahar *et al*., 2000). Δεδομένου του γεγονότος, πως τη στιγμή εκείνη μέσα στο κύτταρο ενδεχομένως να υπάρχουν πολλοί ABC μεταφορείς (Davidson *et al*., 2004), απαιτείται ένα σημάδι αναγνώρισης προκειμένου να εξασφαλιστεί η έξοδος της βακτηριοσίνης από το σωστό εξαγωγέα. Έχει προταθεί πως η αναγνώριση του προδρόμου μορίου της βακτηριοσίνης από τη N-τελική πρωτεολυτική επικράτεια του σωστού ABC μεταφορέα επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ υδροφοβικών καταλοίπων στην αμφιφιλική α-έλικα της πρόδρομης αλληλουχίας και υδροφοβικών καταλοίπων στην καταλυτική πλευρά στη N-τελική πρωτεολυτική περιοχή της πρωτεΐνης του ABC μεταφορέα (Aucher *et al*., 2005).

Ένα ακόμη αποδεικτικό στοιχείο αυτής της υπόθεσης είναι το γεγονός πως οι βακτηριοσίνες που βασίζονται σε *sec*-εξαρτώμενους μεταφορείς εμφανίζουν πολύ διαφορετικές N-τελικές πρόδρομες αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται από τους ABC μεταφορείς βακτηριοσινών. Στις συγκεκριμένες πρόδρομες αλληλουχίες απουσιάζει και το διπλό μοτίβο Gly-Gly που φέρει το πρόδρομο μόριο (Nes *et al*., 2002).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού παραγωγής των βακτηριοσινών: ρυθμιστικό σύστημα τριών συστατικών, σύνθεση, επεξεργασία, έξοδος και ανοσία. (Προσαρμοσμένο από Ennahar *et al*., 2000)

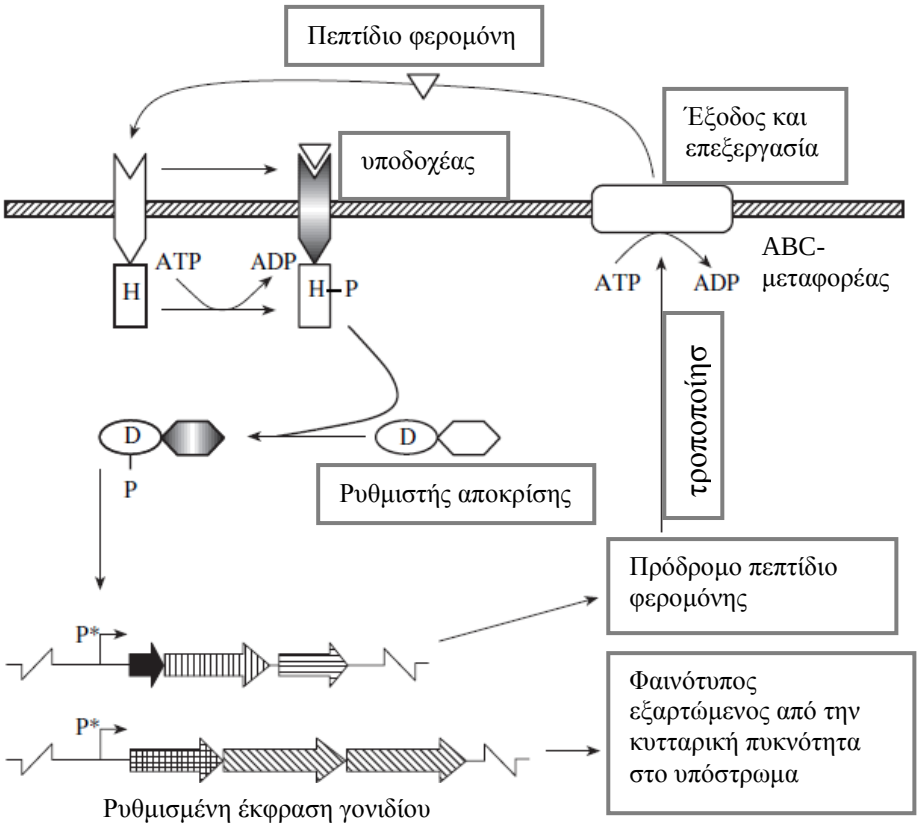
1.2.3.4 Ρύθμιση της παραγωγής των βακτηριοσινών

Γενικά, η παραγωγή των βακτηριοσινών έχει παρατηρηθεί κυρίως κατά την όψιμη εκθετική φάση ανάπτυξης ή κατά την πρώιμη φάση στασιμότητας του μικροοργανισμού παραγωγού και συχνά επηρεάζεται από σήματα του μηχανισμού «αίσθησης απαρτίας» (quorum sensing). Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί ως εξής: ένα επαγωγικό μόριο (φερομόνη) εκκρίνεται με αργό αλλά σταθερό ρυθμό από όλα τα κύτταρα μέσα στο βακτηριακό πληθυσμό. Συνεπώς η συγκέντρωση της φερομόνης αντικατοπτρίζει την κυτταρική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε συγκεκριμένη συγκέντρωση φερομόνης (και άρα κυτταρικής πυκνότητας), το ρυθμιστικό σύστημα που εξαρτάται από αυτή ενεργοποιείται και οι κυτταρικές

επεξεργασίες ξεκινούν. Το σύστημα της αίσθησης απαρτίας που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση των βακτηριοσινών αποτελείται από τα τρία συστατικά που προαναφέρθηκαν. Ένα πεπτίδιο επαγωγέα (πεπτίδιο φερομόνης), μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη κινάση της ιστιδίνης (υποδοχέας φερομόνης) και τον κυτοσολικό ρυθμιστή απόκρισης.

Το πεπτίδιο επαγωγέας συντίθεται ριβοσωμικά σε χαμηλά επίπεδα ως πρόδρομο μόριο και εκκρίνεται μέσω ενός εξειδικευμένου ABC-μεταφορέα βακτηριοσίνης. Όταν η συγκέντρωση του πρόδρομου μορίου φτάσει ένα συγκεκριμένο όριο, η διαμεμβρανική κινάση της ιστιδίνης ενεργοποιείται και αυτό οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση συντηρημένων καταλοίπων ιστιδίνης στην κυτοσολική πλευρά της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη κινάση της ιστιδίνης αλληλεπιδρά με τον αντίστοιχο ρυθμιστή απόκρισης μέσω τρανσφωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, η φωσφορική ομάδα του καταλοίπου της ιστιδίνης από την ενεργοποιημένη κινάση της ιστιδίνης μεταφέρεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Asp του ρυθμιστή απόκρισης. Ο φωσφορυλιωμένος και άρα ενεργοποιημένος πλέον ρυθμιστής απόκρισης λειτουργεί ως ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής, ο οποίος προσδένεται σε εξειδικευμένους για γονίδια βακτηριοσινών υποκινητές και επάγει τη μεταγραφή τους. Ο ρυθμιστής απόκρισης επίσης, ενεργοποιεί και των τριών συστατικών σύστημα μεταγωγής σήματος και έτσι λαμβάνει χώρα μία θετική ανατροφοδότηση του σηματοδοτικού συστήματος.

Σε αυτά τα συστήματα ρύθμισης τις περισσότερες φορές το επαγωγικό πεπτίδιο είναι το ίδιο το μόριο της βακτηριοσίνης, όπως στην περίπτωση της νισίνης, ενώ σε κάποιες άλλες όπως στην καρνοβακτηριοσίνη A και στην εντεροσίνη A, η παραγωγή των βακτηριοσινών ελέγχεται από άλλα επαγωγικά μόρια (Quadri *et al*. 1994, Saucier *et al*. 1995, O'Keeffe *et al*. 1999). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα πεπτίδια των φερομονών είναι παρόμοια στη δομή με τα τάξης II αντιμικροβιακά πεπτίδια, γιατί το σημείο αποκοπής με το διπλό μοτίβο Gly–Gly πολύ συχνά απαντάται και στα επαγωγικά μόρια (Kotelnikova and Gelfand 2002).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού προτύπου του συστήματος αίσθησης απαρτίας. (Προσαρμοσμένο από Kotelnikova and Gelfand, 2002)

1.2.4 Ανοσία

Ο μικροοργανισμός παραγωγός της εκάστοτε βακτηριοσίνης προστατεύεται από την τοξική δράση της με τη βοήθεια πρωτεϊνών ανοσίας. Οι πρωτεΐνες ανοσίας είναι ισχυρά φορτισμένες, με τις περισσότερες από αυτές να φέρουν 25-35% φορτισμένα κατάλοιπα στο μόριο τους. Πρόκειται για κυτοσολικές πρωτεΐνες, με ένα μικρό κομμάτι της κυτταρικής δεξαμενής να είναι πιθανώς ελαφρά συνδεδεμένο με το εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης (Dayem *et al*. 1996, Drider *et al*. 2006). Όταν οι πρωτεΐνες ανοσίας εκφράζονται σε ευαίσθητα κύτταρα, τα προστατεύουν σθεναρά από εξωτερικά προστιθέμενες βακτηριοσίνες. Αν όμως τόσο οι πρωτεΐνες ανοσίας όσο και οι σχετιζόμενες με αυτές βακτηριοσίνες προστεθούν εξωκυτταρικά, τότε δεν παρατηρείται καμία προστασία (Quadri *et al*. 1995, Fimland *et al*. 2002, Sprules *et al*. 2004). Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί τόσο στις τάξη IIα βακτηριοσίνες, όσο και σε άλλης τάξης βακτηριοσίνες, όπως η λακτοκοκκίνη A (Nissen-Meyer *et al*. 1993, Venema *et al*. 1994).

Οι πρωτεΐνες ανοσίας παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση με τις βακτηριοσίνες με τις οποίες σχετίζονται. Ο συγκεκριμένος ισχυρισμός αποδείχθηκε μέσω μίας έρευνας, κατά την οποία μελετήθηκαν οι εξειδικεύσεις εφτά γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ανοσίας μέσω έκφρασης τους σε τρία διαφορετικά, ευαίσθητα στις συγκεκριμένες βακτηριοσίνες, στελέχη και μετέπειτα έλεγχο για το αν τα στελέχη αυτά απέκτησαν ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ανέδειξαν πως οι πρωτεΐνες ανοσίας προστάτευαν από τις σχετιζόμενες με αυτές βακτηριοσίνες και σε ένα πολύ αυστηρά περιορισμένο βαθμό από συγγενικά είδη βακτηριοσινών (διασταυρούμενη προστασία=cross protection) (Fimland *et al*., 2002).

Ο ακριβής μηχανισμός που παρέχει αυτήν την εξειδίκευση μεταξύ πρωτεϊνών ανοσίας και βακτηριοσινών δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Διάφορες μελέτες προτείνουν ένα πρότυπο κατά το οποίο η C-τελική επικράτεια της βακτηριοσίνης που επικοινωνεί με τη μεμβράνη και φέρει τη δομή φουρκέτας αναγνωρίζεται από το C-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης ανοσίας (Johnsen *et al*., 2005). Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και ως εκ τούτου είναι αδύνατο να λαμβάνει χώρα άμεση επαφή μεταξύ των δύο μορίων. Ο τρόπος με τον οποίο οι δύο πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή μπορεί να ερμηνευθεί με βάση την περίπτωση της λακτοκοκκίνης Α. Για τη συγκεκριμένη βακτηριοσίνη έχει προταθεί πως η πρωτεΐνη ανοσίας αντιδρά με έναν υποδοχέα και με αυτόν τον τρόπο άμεσα ή έμμεσα αναστέλλει τη λειτουργία της είτε αλλάζοντας τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα είτε κρύβοντας το σημείο πρόσδεσης της βακτηριοσίνης. Στην περίπτωση των βακτηριοσινών τάξης ΙΙ αυτός ο υποδοχέας έχει προταθεί πως είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη (mannose permease). Η αναγνώριση όμως ενός μόνο υποδοχέα από όλες τις βακτηριοσίνες της τάξης ΙΙ δε μπορεί να εξηγήσει την εξειδίκευση των πρωτεϊνών ανοσίας (Dalet *et al*., 2001).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως λόγω του ότι τα γονίδια των βακτηριοσινών και των αντίστοιχων πρωτεϊνών ανοσίας τους βρίσκονται στο ίδιο οπερόνιο και εκφράζονται ταυτόχρονα, η επίδραση της ανοσίας στο φυσικό γενετικό περιβάλλον μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί εκεί όπου η παραγωγή της βακτηριοσίνης ρυθμίζεται από τον μηχανισμό αίσθησης απαρτίας. Το δεδομένο αυτό υποστηρίζεται από μελέτες κατά τις οποίες έχει φανεί πως η ευαισθησία ενός στελέχους σε βακτηριοσίνη μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το αν βρίσκεται σε κατάσταση παραγωγής ή όχι της

βακτηριοσίνης. Όπως για παράδειγμα, το στέλεχος *Lactobacillus sakei* LTH673 που παράγει τη σακακίνη P, είναι πολύ πιο ευαίσθητο σε διάφορες βακτηριοσίνες της τάξης IIα, συμπεριλαμβανομένης και της σακακίνης P, όταν βρίσκεται στη φάση μη παραγωγής βακτηριοσίνης (Bac^-) από ότι στη φάση παραγωγής (Bac^+) (Drider *et al*., 2006).

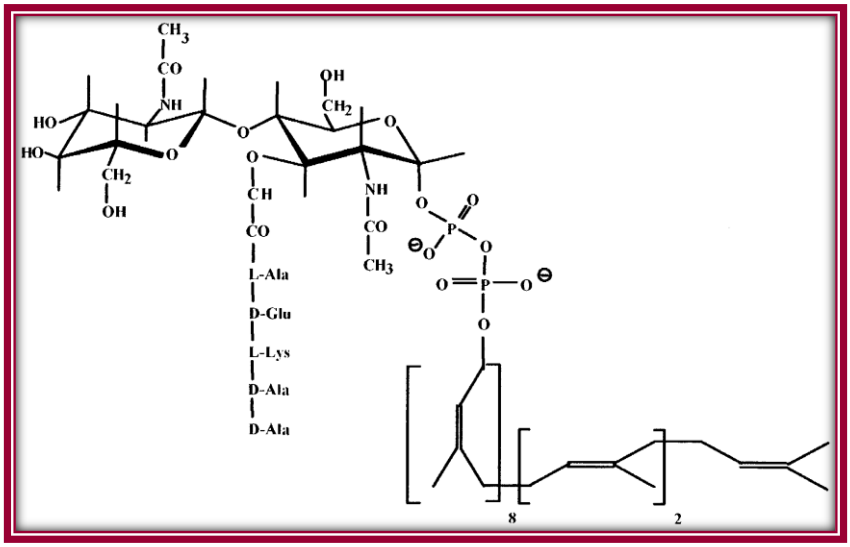
1.2.5 Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών

Οι μηχανισμοί δράσης των βακτηριοσινών που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα είναι ποικίλοι, με τα μόρια των βακτηριοσινών που ανήκουν σε ξεχωριστές τάξεις να εμφανίζουν κάποιες διαφορές. Πάρα ταύτα όμως, ο στόχος είναι πάντα ο κυτταρικός χάρτης του μικροοργανισμού δείκτη.

1.2.5.1 Τάξη I βακτηριοσίνες

Όσον αφορά στις τάξη I βακτηριοσίνες, η πρώτη αναφορά για τον τρόπο δράσης της νισίνης ήταν το 1953 από τον Ramseier, ο οποίος περιέγραψε ένα μηχανισμό διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτώμενος από κάποιο μόριο τύπου απορρυπαντικού, βασιζόμενος στην παρατήρηση πως βακτηριακά κύτταρα επεξεργασμένα με νισίνη εμφάνιζαν γρήγορη διαρροή κυτταρικού υλικού το οποίο είχε απορροφήσει ακτινοβολία UV (όπως νουκλεοτίδια). Ως επιβεβαίωση αυτής της αρχικής πρότασης αποτέλεσαν μετέπειτα μελέτες, οι οποίες απέδειξαν μία ανασταλτική δράση της νισίνης στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες στη συνέχεια αποδόθηκαν στην αλληλεπίδραση των λαντιβιοτικών με τα μεμβρανοσυνδεόμενα πρόδρομα μόρια πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος λιπίδιο I και λιπίδιο II (Hechard and Sahl, 2002).

Πάρα ταύτα, ακόλουθες επιστημονικές μελέτες ανέδειξαν ότι ένας μεγάλος πληθυσμός κυττάρων θανατώνονταν ταχέως μαζί με παράλληλη αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, διαχωρισμό κυτταρικού υλικού και ολοκληρωτική διακοπή των βιοσυνθετικών διεργασιών. Όλες αυτές οι φαινομενικές ασυμφωνίες στο μηχανισμό της δράσης της νισίνης πρόσφατα ξεκαθαρίστηκαν με την ανάδειξη ενός κοινού μοντέλου τρόπου δράσης (Brotz *et al*. 1998, Breukink *et al*. 1999, Wiedemann *et al*. 2001).



Εικόνα 1.8: Δομή του τελικού μεμβρανοσυνδεόμενου πρόδρομου μορίου κυτταρικού τοιχώματος λιπίδιο ΙΙ, undecaprenylpyrophosphoryl-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc (Προσαρμοσμένο από Hechard and Sahl, 2002).

Το μόριο της νισίνης μετά από την πρόσδεση με το πρόδρομο μόριο πεπτιδογλυκάνης λιπίδιο ΙΙ εμφανίζει δύο μηχανισμούς: αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του μικροοργανισμού δείκτη. Η παρουσία του λιπιδίου ΙΙ στα λιποσώματα μειώνει δραματικά την απαιτούμενη συγκέντρωση νισίνης για την αύξηση της διαπερατότητας των λιποσωμάτων. Το δεδομένο αυτό εξηγεί και το γεγονός πως για την αύξηση της διαπερατότητας κυττταρικών μεμβρανών απαιτούνται κάποια nM νισίνης, ενώ για τεχνητές μεμβράνες απαιτούνται μM. Η πρόσδεση με το λιπίδιο ΙΙ επάγει ένα διαμεμβρανικό προσανατολισμό της νισίνης, με τα δύο μόρια να σχηματίζουν έναν υβριδικό πόρο, ο οποίος αποτελείται από οκτώ μόρια νισίνης και τέσσερα μόρια λιπιδίου ΙΙ (Hasper *et al.* 2004, Lubelski *et al*. 2008). Η αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος προκύπτει από την εξαρτώμενη από τη νισίνη μετατόπιση του λιπιδίου ΙΙ από τη μεμβράνη (Hasper *et al*. 2006, Lubelski *et al*. 2008).

Η πλειοψηφία των μελετημένων μορίων λαντιβιοτικών σχηματίζουν πόρους αλλά δεν παρεμβαίνουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στους ευαίσθητους σε αυτά μικροοργανισμούς. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν η λακτισίνη 3147, η Pep 5, η σουμπτιλίνη και η επιδερμίνη. Αντίθετα, η μερσασιδίνη ενώ προσδένεται στο πρόδρομο μόριο λιπίδιο ΙΙ, σε διαφορετική θέση όμως από αυτή της νισίνης, δεν παρουσιάζει παράλληλα τον σχηματισμό πόρων ως μηχανισμό δράσης (Deegan *et al*., 2006).

1.2.5.2 Τάξη ΙΙ βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες τάξης ΙΙ θανατώνουν τα κύτταρα στόχους κυρίως μέσω σχηματισμών πόρων, προκαλώντας διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης, ενδοκυτταρική απώλεια μορίων ATP και διαρροή αμινοξέων και ιόντων (Deegan *et al.*, 2006).

Ο υποδοχέας των βακτηριοσινών τάξης ΙΙ στα ευαίσθητα κύτταρα στόχους έχει αποδειχθεί πως είναι πρωτεΐνες του μεταφορέα σακχάρων του συστήματος φωσφοτρανσφερασών μαννόζης (mannose phosphotransferase system: Man-PTS). Αυτές οι περμεάσες σακχάρων ανήκουν σε μία ομάδα συστήματος μεταφορέων, που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να ενώνουν την είσοδο και τη φωσφορυλίωση των εισερχόμενων σακχάρων (Postma *et al.*, 1993). Επιπροσθέτως, των γενικών ενζύμων I (EI) και HPr των συστήματος φωσφοτρανσφερασών, τα οποία χρησιμεύουν ως δότες φωσφορικών ομάδων για διαφορετικές PTS περμεάσες, το σύστημα φωσφοτρανσφερασών για περμεάσες μαννόζης περιέχει ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με εξειδίκευση στους διάφορους υδατάνθρακες (carbohydrate-specific), το οποίο αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες: IIA, IIB, IIC και IID. Οι υπομονάδες IIA και IIB, οι οποίες πολλές φορές βρίσκονται μαζί στην ίδια πρωτεΐνη, τοποθετούνται στο κυτταρόπλασμα μαζί με τις γενικές πρωτεΐνες EI και HPr, ενώ οι υπομονάδες IIC και IID είναι ξεχωριστές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μαζί σχηματίζουν ένα κανάλι μετατόπισης εξειδικευμένο για υδατάνθρακες. Οι μεταφορείς σακχάρων του συστήματος φωσφοτρανσφερασών μαννόζης εμφανίζουν μία ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος για υδατάνθρακες και τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν πολλές φορές αναφερθεί πως εισάγουν και φωσφορυλιώνουν μία ποικιλία εξοζών, όπως γλυκόζη, μαννόζη, γλυκοζαμίνη, φρουκτόζη, γαλακτοζαμίνη και *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (Saier *et al*., 2005).

Πολυάριθμες εμπεριστατωμένες μελέτες σε ανθεκτικά σε βακτηριοσίνη μεταλλαγμένα στελέχη *Listeria monocytogenes* και *Enterococcus faecalis* ανέδειξαν ότι το Man-PTS δρα ως υποδοχέας για τις τάξη ΙΙ βακτηριοσίνες. Το 2000 ο Ramnath και οι συνεργάτες του, πραγματοποίησαν ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων προκειμένου να συγκριθεί το πρωτεϊνικό περιεχόμενο βακτηριακών απομονώσεων *L. monocytogenes* που ήταν ευαίσθητες σε βακτηριοσίνη και απομονώσεων που ήταν

ανθεκτικές. Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν την απουσία της πρωτεΐνης IIA του Man-PTS στις ανθεκτικές απομονώσεις.

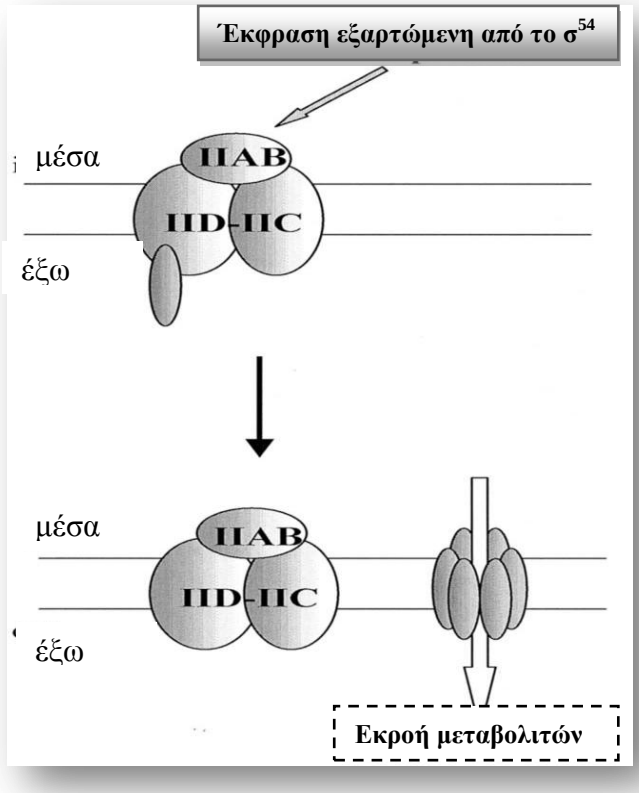
Μελέτες μεταλλαξιγένεσης τρανσποζονίων συνδέουν την ανθεκτικότητα στις τάξη IIα βακτηριοσίνες με το ρυθμιστικό γονίδιο *rpoN* στη *L. monocytogenes* και στον *E. faecalis*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για τον εναλλακτικό παράγοντα σ^{54}, ο οποίος συμμετέχει στη ρύθμιση του οπερονίου *mptACD,* το οπερόνιο δηλαδή που κωδικοποιεί το Man-PTS στη *L. monocytogenes* και στον *E. faecalis.* Αντίστοιχα, απενεργοποίηση των *mpt* γονιδίων οδηγεί σε ανθεκτικότητα στις τάξη IIα βακτηριοσίνες και στα δύο βακτηριακά στελέχη. Επίσης, δοκιμές συγκαθαρισμού ανέδειξαν ότι οι βακτηριοσίνες σχηματίζουν σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες του Man-PTS και την πρωτεΐνη ανοσίας της βακτηριοσίνης στα κύτταρα ανοσίας, γεγονός που αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη ότι οι βακτηριοσίνες τάξης II προσδένονται φυσιολογικά στις πρωτεΐνες του Man-PTS στα κύτταρα στόχους (Kjos *et al*., 2011).

Η οικογένεια των Man-PTS είναι σχετικά μεγάλη, με μέλη τους να βρίσκονται στα γονιδιώματα πολλών βακτηριακών γενών που ανήκουν στα Gram$^-$ *γ*-Πρωτεοβακτήρια και στα Gram$^+$ Firmicutes. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως Man-PTSs δεν υπάρχουν στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και για αυτό το λόγο μπορούν να αποτελέσουν υποδοχείς φαρμάκων για τη στόχευση και θανάτωση βακτηριακών παθογόνων στον άνθρωπο.

Συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες τάξης IIα στοχεύουν μόνο φυλογενετικά καθορισμένες υποομάδες Man-PTSs και αυτές περιλαμβάνουν μέλη του φύλου Firmicutes ευαίσθητα σε βακτηριοσίνη (π.χ. *Listeria, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Carnobacterium, Clostridium, Pediococcus* και *Streptococcus*) (Kjos M. *et al*., 2009).

Από μελέτες απαλοιφής και προσθήκης αποδείχθηκε πως οι πρωτεΐνες IIC και IID που βρίσκονται στη μεμβράνη συνδυάζονται και σχηματίζουν τον υποδοχέα βακτηριοσίνης, ενώ η υπομονάδα IIA είναι περιττή για τη λειτουργία του υποδοχέα. Η υπομονάδα IIC έχει παρατηρηθεί πως συμμετέχει στην εξειδικευμένη, σε είδος μικροοργανισμού, στόχευση μέσω ενός N-τελικού εξωκυτταρικού βρόγχου που περιέχει 40 αμινοξέα και λειτουργεί ως περιοχή αλληλεπίδρασης με τις βακτηριοσίνες τάξης II. Μολονότι η υπομονάδα IID είναι μέρος του συμπλέγματος που σχηματίζει τον υποδοχέα βακτηριοσίνης, ο ακριβής ρόλος της δεν έχει διασαφηνιστεί. Έχει προταθεί πως ενδεχομένως να συμμετέχει σε μη ειδικές-αλληλεπιδράσεις με τη

βακτηριοσίνη κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των πόρων στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, ή κατέχει μία πιο δομική λειτουργία σε αυτό το σύμπλεγμα (π.χ. να βοηθάει την πρωτεΐνη IIC να αναδιπλωθεί σωστά στη μεμβράνη) (Kjos *et al*., 2010).



Εικόνα 1.9: Πρότυπο του τρόπου δράσης των βακτηριοσινών της τάξης IIα. Οι συμβολισμοί IIAB, IID και IIC αντιπροσωπεύουν τις υπομονάδες του συστήματος φωσφοτρανσφερασών περμεασών μαννόζης (Man-PTS). Η βακτηριοσίνη αναγνωρίζει την περμεάση και στη συνέχεια σχηματίζει πόρους στην κυτοπλασμική μεμβράνη (Προσαρμοσμένο από Hechard and Sahl, 2002)

Όπως έχει προαναφερθεί, οι τάξη II βακτηριοσίνες αποτελούνται από μία υψηλά συντηρημένη συναινετική αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο και μία μεταβλητή C-τελική αλληλουχία. Σύμφωνα με μελέτες κατά τις οποίες βακτηριοσίνες τάξης II με παρόμοια N-τελική αλληλουχία αλλά διαφορετική C-τελική αλληλουχία εμφάνισαν εξειδίκευση σε βακτηριακούς κλώνους με διαφορετικούς υβριδικούς υποδοχείς, προκύπτει το συμπέρασμα πως η συντηρημένη N-τελική συναινετική αλληλουχία είναι αυτή που πιθανά να εμπλέκεται στην εξειδικευμένη αναγνώριση του υποδοχέα (Kjos *et al*., 2010). Αντίθετα, μία διαφορετική μελέτη κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν υβριδικά μόρια τάξης II βακτηριοσινών στα οποία έγινε συνδυασμός συντηρημένης N-τελικής αλληλουχίας και μεταβλητής C-τελικής από διαφορετικές βακτηριοσίνες ανέδειξε ότι η C-τελική περιοχή είναι πιθανότερο ότι

συμμετέχει στην εξειδικευμένη αναγνώριση του κυτταρικού στόχου (Johnsen *et al*., 2005).

Οι τελευταίες επιστημονικές μελέτες, με αυτά τα φαινομενικά αντικρουόμενα αποτελέσματα, υποδεικνύουν πως για την αναγνώριση του στόχου συμμετέχουν διαφορετικές περιοχές των βακτηριοσινών σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια της αναγνώρισης και του επακόλουθου σχηματισμού των πόρων. Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να προταθεί πως αρχικά η συντηρημένη N-τελική *β*-πτυχωτή επιφάνεια που περιέχει μέρος των τάξης II βακτηριοσινών αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική περιοχή βρόγχου της πρωτεΐνης IIC του Man-PTS, γεγονός που στη συνέχεια επιτρέπει στο C-τελικό τμήμα της βακτηριοσίνης να εισέλθει στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου και μέσω αλληλεπιδράσεων (έλικας-έλικας) να συνδεθεί με τα διαμεμβρανικά τμήματα IIC και IID. Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις μπορούν να επιβάλλουν δομικές αλλαγές στο σύστημα φωσφοτρανσφερασών, οι οποίες διαμορφώνουν τις περμεάσες ανοιχτές σαν πόρους, προκαλώντας έτσι τη διαρροή διαλυτών ουσιών, τη διατάραξη της ακεραιότητας της μεμβράνης και τελικά την κυτταρική θανάτωση του στόχου (Kjos *et al*., 2011).

1.2.6 Βακτηριοσίνες του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού

Το ανθρώπινο εντερικό μικροβιακό φορτίο έχει ταυτοποιηθεί ως μία πλούσια πηγή εν δυνάμει προβιοτικών βακτηρίων τα οποία μπορούν και παράγουν καινούριες αντιμικροβιακές βακτηριοσίνες. Οι κολισίνες και οι μικροσίνες είναι αυτές οι βακτηριοσίνες που απαντώνται σε μεγαλύτερες συχνότητες σε απομονώσεις από κόπρανα ανθρώπινης προέλευσης (Gillor *et al*. 2008, Smajs *et al.* 2010).

Από όλες τις μελέτες ανίχνευσης παραγωγής βακτηριοσινών από βακτηριακές απομονώσεις του εντερικού μικροβιακού συστήματος συχνά προκύπτει ένα μοναδικό παραγωγό στέλεχος, είτε ένας αριθμός γενετικά διακριτών στελεχών ή ακόμα και ειδών μέσα στο ίδιο δείγμα, στην ίδια οικολογική θέση ή στον ίδιο ξενιστή που παράγουν όλα την ίδια βακτηριοσίνη (Arakawa *et al*., 2010). Ως επιβεβαίωση αυτής της παρατήρησης ήρθαν τα αποτελέσματα μίας μελέτης που πραγματοποίησε ο O'Shea και οι συνεργάτες του το 2009 κατά την οποία, από ένα σύνολο 84 οξυγαλακτικών βακτηρίων με αντιμικροβιακή δράση απομονωμένα από εντερικό σύστημα, ταυτοποίηθηκαν μόνο 24 διαφορετικά στελέχη. Από αυτές τις διαφορετικές απομονώσεις οι 9 αποτελούσαν *Streptococcus bovis*, που αν και ήταν γενετικά

διακριτές εμφάνισαν ομοιότητες στο φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης και στην ευαισθησία σε πρωτεάση των αντιμικροβιακών ουσιών που παρήγαγαν.

Αυτή η πληθώρα αντιμικροβιακής δράσης από πολυάριθμα βακτηριακά στελέχη του εντερικού μικροβιακού φορτίου έχει κατά καιρούς αποδοθεί στη δυνατότητα που παρέχουν οι τεχνικές καλλιέργειας των μικροοργανισμών σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και υπό την παρουσία διαφόρων μικροοργανισμών δεικτών. Σήμερα θεωρείται εγκυρότερη η αντίληψη πως σε αυτή την αφθονία συνεισφέρει το συναγωνιστικό πλεονέκτημα που παρέχει η παραγωγή των βακτηριοσινών στα αντίστοιχα παραγωγά τους στελέχη (O'Shea *et al*., 2011).

Στους Πίνακες 1.2 και 1.3 που ακολουθούν παρουσιάζεται ένα μέρος των βακτηριοσινών που έχουν βρεθεί πως παράγονται από βακτήρια του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού, τα οποία έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα κόπρανα. Όπως σχηματικά απεικονίζεται, η κατηγορία των $Gram^+$ βακτηρίων που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση αντιπροσωπεύεται κυρίως από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria = LAB). Ένα μεγάλο ποσοστό βακτηριοσινών έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και πολλές από αυτές πιθανολογούνται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες βάσει της ικανότητας τους να αναστέλλουν πολλά ευκαιριακά παθογόνα και αλλοιογόνα τροφίμων. Δεσπόζουσα θέση στην παραγωγή βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά βακτήρια κατέχουν τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και του γένους *Bifidobacterium*. Τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη έχει αποδειχθεί πως μπορούν να παράγουν βακτηριοσίνες *in vitro*.

Τα στελέχη των λακτοβακίλλων αριθμούν πολλές αναφορές για την παραγωγή βακτηριοσινών, καθώς έχει φανεί ότι για τα περισσότερα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων η παραγωγή βακτηριοσινών είναι ένα σύνηθες φαινόμενο ανταγωνιστικότητας εντός της οικοθέσης τους, πέρα από την παραγωγή οξυγαλακτικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Πίνακας 1.2: Βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram$^-$ βακτήρια του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού

Ταξινόμηση	Βακτηριοσίνη	Μικροοργανισμός παραγωγός	Προέλευση
Κολισίνες			
Ομάδα Α	Κολισίνη E1-E9	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη K	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη N	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη S4	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη U	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη Y	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
Ομάδα Β	Κολισίνη B	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη Ia	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη Ib	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη M	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Κολισίνη 5	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
Μη ταξινομημένη	Κολισίνη Js	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
Μικροσίνες			
Τάξη Ι	Μικροσίνη B17	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	ΜικροσίνηC7/C51	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη B17	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη J25	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη 15m	*Escherichia coli* LP15	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη 15n	*Escherichia coli* LP15	ανθρώπινα κόπρανα
Τάξη ΙΙα	Μικροσίνη V	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη L	*Escherichia coli*	ανθρώπινα κόπρανα
Τάξη ΙΙβ	Μικροσίνη E492	*Klebsiella pneumoniae* RYC 492	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη H47	*Escherichia coli* H47	ανθρώπινα κόπρανα
	Μικροσίνη M	*Escherichia coli* H48	ανθρώπινα κόπρανα

Τα στελέχη *Bifidobacterium* spp. εμφανίζουν και αυτά αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε διάφορους ψυχότροφους μικροοργανισμούς, όπως στα *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*, *Yersinia* και *Listeria*. Η ικανότητά τους αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς αυτοί οι ψυχότροφοι μικροοργανισμοί, ακόμα και αν βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στα τρόφιμα προκαλούν σημαντικές αλλοιώσεις και αποτελούν απειλή για τη δημόσια υγεία (Cheikyoussef *et al*. 2008, Martinez *et al*. 2013).

Πίνακας 1.3: Βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram^{+} βακτήρια του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού

Ταξινόμηση	Βακτηριοσίνη	Μικροοργανισμός παραγωγός	Προέλευση
Τάξη Ι (τροποποιημένες)			
Τάξη Ια λαντιβιοτικά	Κυτολυσίνη	*Enterococcus faecalis*	ανθρώπινα κόπρανα
	Νισίνη Z	*Lactococcus lactis* MM19	ανθρώπινα κόπρανα
	Ρουμινοκοκκίνη A	*Clostridium nexile, Ruminococcus gnavus* E1, *Ruminococcus hansenni*	ανθρώπινα κόπρανα
	Στρεπτίνη	*Bifidobacterium longum*	ανθρώπινα κόπρανα
Τάξη Ιβ	Θουρασίνη CD	*Bacillus thuringiensis* DPC6431	υγιή ανθρώπινα κόπρανα
Τάξη ΙΙ (μη τροποποιημένες)			
Τάξη ΙΙα αντιλιστεριακές πεδιοσίνη -like	Αβισίνη A	*Enterococcus avium* 208/XA83	κόπρανα νεογνού
	Βακτηριοσίνη RC714	*Enterococcus faecium* RC714	ανθρώπινα κόπρανα
	Βακτηριοσίνη GM-1	*Enterococcus faecium* GM-1	κόπρανα νεογνού
	Μπιφιδοσίνη B	*Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454	κόπρανα νηπίου
	Εντεροσίνη A	*Enterococcus faecium* DPC6482	κόπρανα νεογνού
	Πεδιοσίνη PA-1	*Pediococcus acilactici* UVA1	κόπρανα από θηλάζον βρέφος
Τάξη ΙΙβ (δύο συστατικών)	Λακτασίνη F	*Lactobacillus johnsonii* NCC 533	ανθρώπινα κόπρανα
	Σαλιβαρισίνη T	*Lactobacillus salivarius* DPC6488	κόπρανα νεογνού
Τάξη ΙΙγ (κυκλικές)	Γκασερισίνη A	*Lactobacillus gasseri* LA39	κόπρανα από θηλάζον βρέφος
	Ρεουτερισίνη 6	*Lactobacillus reuteri* LA6	κόπρανα από θηλάζον βρέφος
Τάξη ΙΙδ	Εντεροσίνη SL5	*Enterococcus faecalis* SL-5	ανθρώπινα κόπρανα
	Γκασερισίνη T	*Lactobacillus gasseri* SBT2055	υγιή ανθρώπινα κόπρανα
	Γκασερισίνη KT7	*Lactobacillus gasseri* KT7	κόπρανα από θηλάζον βρέφος
	Ασιδοσίνη LF221A/LF221B	*Lactobacillus gasseri* LF221A	κόπρανα παιδιού
	Ασιδοφιλουσίνη A	*Lactobacillus acidophilus* LAPT1060	κόπρανα από θηλάζον βρέφος

Όσον αφορά στην παραγωγή βακτηριοσινών από τα στελέχη *Bifidobacterium* spp. έχουν δημοσιευθεί περιορισμένες μελέτες που επιβεβαιώνουν αυτήν την παρατήρηση καθώς οι περισσότερες έχουν αποτύχει στο στάδιο του καθαρισμού του πρωτεϊνικού μορίου και για αυτό δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί ή αναφέρονται ως βακτηριοσίνες-like ενώσεις. Σύμφωνα με τους Cheikyoussef και συνεργάτες (2009) έχουν

χαρακτηριστεί πλήρως και ταυτοποιηθεί οι εξής βακτηριοσίνες: η Bifidin (*B. Bifidum* 1452), η Biflong (*B. longum*), η Bifidocin B (*B. bifidum* NCFB 1454), η Bifilact Bb-12 (*B. lactis* Bb-12) και η Biflong Bb-46 (*B. longum* Bb-46). Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί δύο βακτηριοσίνες-like ενώσεις, η μία εκ των οποίων προέρχεται από το μικροοργανισμό *B. infantis* BCRC 14602 και μετέπειτα ταυτοποιήθηκε ως Bifidin I και η άλλη από τον *B. thermophilus* subsp. *infantis*, η οποία ονομάστηκε thermophlicin B67. Τέλος, έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ένα λαντιβιοτικό, μία Bisin, που παράγεται από το μικροοργανισμό *B.longum* DJO104 (Cheikyoussef *et al*. 2009, Cheikyoussef *et al*. 2010, Lee *et al*. 2011, Martinez *et al*. 2013) και πρόσφατα ταυτοποίηθηκε μία ακόμα βακτηριοσίνη η bificin C6165 από το *B. animalis* subsp. *animalis* CICC 6165 (Pei *et al.*, 2013).

Γενικά, οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα βακτήρια του εντερικού μικροβιακού συστήματος εμφανίζουν περιορισμένο φάσμα δράσης και υποστηρίζεται πως εμπλέκονται σε δύο βασικούς μηχανισμούς, στην αποίκιση και στην προστασία από εισερχόμενα παθογόνα. Η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα βακτηριοσινών από τα βακτήρια του εντερικού μικροβιακού φορτίου έχει αρχίσει να κερδίζει έδαφος, καθώς θεωρείται ότι προσδίδει στους μικροοργανισμούς που τις παράγουν, εξελικτικό πλεονέκτημα μέσω της επικράτησης τους σε αυτό το πολύπλοκο οικοσύστημα (Ross *et al*., 2010). Ως εκ τούτου, το εντερικό σύστημα αποτελεί συχνά αντικείμενο μελέτης με απώτερο στόχο την ταυτοποίηση καινούριων βακτηριοσινών που να παράγονται από βακτήρια του ανθρώπινου εντερικού συστήματος.

1.3 Σκοπός εργασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την ανίχνευση για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp., τα οποία είχαν απομονωθεί από το εντερικό σύστημα υγιών νεογνών με την προοπτική της εύρεσης ενός καινούριου μορίου βακτηριοσίνης.

Ο εντερικός μικροβιακός πληθυσμός των νεογνών είναι πλούσιος σε πιθανά προβιοτικά στελέχη και η ικανότητα αυτή μέχρι τώρα αποδίδεται κυρίως στα οξυγαλακτικά βακτήρια και συγκεκριμένα στα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium.* Ανάμεσα στους προβιοτικούς μηχανισμούς που κατά καιρούς έχουν αναλυθεί ανήκει και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα

βακτηριοσινών. Τα δύο αυτά γένη βακτηρίων θεωρούνται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία που επικρατεί μέσα σε ένα τόσο πολύπλοκο οικοσύστημα, όπως αυτό της γαστρεντερικής οδού. Η επίτευξη αυτής της εσωτερικής ισορροπίας έχει ως συνέπεια την ισορροπία της υγείας του ανθρώπου-ξενιστή.

Η αρχική επιλογή των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών με τις κλασσικές μεθόδους ανίχνευσης αντιμικροβιακών ουσιών είχε ως σκοπό την ανάδειξη και σύγκριση αυτών των μεθόδων όσον αφορά στην ικανότητα παρατήρησης αντιμικροβιακής δράσης. Οι μετέπειτα τεχνικές που ακολούθησαν έγιναν με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της αρχικής επιλογής. Μετά την πραγματοποίηση των ανωτέρω μεθόδων ακολούθησε η βιοχημική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση μεθόδων χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών δειγμάτων, με απώτερο σκοπό τον χαρακτηρισμό της πρωτεϊνικής ουσίας που έφερε την αντιμικροβιακή δράση.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Lactobacillus* και 22 του γένους *Bifidobacterium* από κόπρανα υγιών νεογνών. Η ταυτοποίηση όλων των βακτηριακών απομονώσεων πριν από κάθε πειραματική επεξεργασία έγινε με φαινοτυπικα χαρακτηριστικά, όπως χρώση κατά Gram και αντίδραση καταλάσης.

2.1.1 Lactobacillus *spp*.

Η καλλιέργεια των απομονώσεων *Lactobacillus* spp. έγινε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ *(παρ. 2.2.2)*. Η επώαση των βακτηριακών απομονώσεων του γένους *Lactobacillus* έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες, στους 37 ^{o}C για 48 ώρες. Ορισμένα από αυτά τα στελέχη είχαν ταυτοποιηθεί, σε προηγούμενη μελέτη (Μήτσου Ε., 2005), με τη χρήση βιοχημικής μεθόδου (API 50 CHL Kit, με ανάλυση των αποτελεσμάτων στη βάση δεδομένων Biomereux με τη χρήση του λογισμικού APILAB, έκδοση 5.0).

2.1.2 Bifidobacterium *spp.*

Η καλλιέργεια των απομονώσεων του γένους *Bifidobacterium* έγινε με τη χρήση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος modified MRS άγαρ (mMRS) *(παρ. 2.2.4)*. Η επώαση και η επεξεργασία των βακτηριακών απομονώσεων έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες, στους 37 ^{o}C για 72 ώρες.

2.1.3 Μικροοργανισμοί δείκτες

Η ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης των βακτηριακών απομονώσεων έγινε ως προς 12 Gram θετικούς μικροοργανισμούς δείκτες, η επιλογή των οποίων έγινε με βάση τη βιβλιογραφία (Cheikhyoussef *et al*. 2008 & Ahmed *et al*. 2010). Τα πρότυπα βακτηριακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί δείκτες καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας τους φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Όλοι οι μικροοργανισμοί της παρούσης μελέτης προέρχονται από τη συλλογή μικροβιακών στελεχών του Εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οι αναερόβιες συνθήκες έλαβαν χώρα με τη βοήθεια του αναερόβιου επωαστικού θαλάμου (Bactron ™ 1.5, Anaerobic/Environmental Chamber, Shel Lab).

Πίνακας 2.1: Μικροοργανισμοί δείκτες και συνθήκες καλλιέργειας τους

ΑΑ	Μικροοργανισμοί δείκτες	Θρεπτικό υπόστρωμα	Συνθήκες καλλιέργειας
1.	*Enterococcus faecalis* ATCC 51299	TSBYE[β]	αερόβια, 37 °C,24 ώρες
2.	*Enterococcus hirae* CIP 5855	BHI[γ]	αερόβια, 37 °C,24 ώρες
3.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538	TSBYE	αερόβια, 37 °C,24 ώρες
4.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923	TSBYE	αερόβια, 37 °C, 24 ώρες
5.	*Listeria monocytogenes* DSM 12464	TSBYE	αερόβια, 37 °C, 24 ώρες
6.	*Clostridium perfringens*	mBHI[δ]	αναερόβια, 37 °C, 24 ώρες
7.	*Clostridium difficile* ATCC 9689	mBHI	αναερόβια, 37 °C, 24 ώρες
8.	*Lactobacillus casei* DSMZ 20011	MRS[ε]	αναερόβια, 37 °C, 48 ώρες
9.	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081	MRS	αναερόβια, 37 °C, 48 ώρες
10.	*Lactobacillus rhamnosus* WAV	MRS	αναερόβια, 37 °C, 72 ώρες
11.	*Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 [α]	mMRS[στ]	αναερόβια, 37 °C, 72 ώρες
12.	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140 [α]	mMRS	αναερόβια, 37 °C, 72 ώρες

[α] Τα δύο πρότυπα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί δείκτες μόνο για τα είκοσι δύο υπό εξέταση στελέχη *Bifidobacterium* spp.

[β,γ,δ,ε,στ] Η σύσταση των συγκεκριμένων θρεπτικών υποστρωμάτων αναλύεται στις ενότητες 2.2.1 έως 2.2.8 του παρόντος κεφαλαίου

2.2 Θρεπτικά Υποστρώματα

2.2.1 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth, (De Man *et al*., 1960).

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του γένους *Lactobacillus*.

Σύσταση (g/l): μίγμα πεπτονών (10,0), γλυκόζη (20,0), εκχύλισμα από μοσχάρι (10,0) και ζύμη (5,0), διφωσφορικό κάλιο (2,0), θειικό μαγνήσιο (0,2), θειικό μαγγάνιο (0,05), κιτρικό αμμώνιο (2,0), οξικό νάτριο (5,0) και Tween® 80 (1,08), pH 6,4 ± 0,2. Σε ένα λίτρο νερού διαλύονταν 55 g υλικού και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.

2.2.2 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar, (De Man *et al*., 1960).

Χρησιμοποιήθηκε για την αναβίωση, ανάπτυξη και μορφολογική μελέτη των μικροοργανισμών του γένους *Lactobacillus*.

Σύσταση (g/l): μίγμα πεπτονών (10,0), γλυκόζη (20,0), εκχύλισμα από μοσχάρι (10,0) και ζύμη (5,0), διφωσφορικό κάλιο (2,0), θειικό μαγνήσιο (0,2), θειικό μαγγάνιο (0,05), κιτρικό αμμώνιο (2,0), οξικό νάτριο (5,0) και Tween® 80 (1,08) και άγαρ 15,0, pH 6,4 ± 0,2.

Σε ένα λίτρο νερού διαλύθηκαν 70 g υλικού και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά, με επακόλουθη διανομή του υλικού σε τρυβλία Petri (90 mm).

2.2.3 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth, mMRS broth (modified MRS broth) (Cheikhyoussef *et al.,* 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη των μικροοργανισμών του γένους *Bifidobacterium*.

Σύσταση: MRS 55 g/l και 0,05% L- υδροχλωρικής κυστεΐνης (1.023839.0025, MERCK). Το συγκεκριμένο αμινοξύ προστίθεται διότι μειώνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής, παρέχοντας έτσι καλύτερες αναερόβιες συνθήκες για την ανάπτυξη των *Bifidobacterium* spp. και παράλληλα θεωρείται ως κατάλληλη πηγή αζώτου στα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* (Handbook of Culture Media for Food Microbiology, 1999). Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.4 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ, mMRS άγαρ (modified MRS άγαρ) (Cheikhyoussef *et al.,* 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για την αναβίωση, ανάπτυξη και μορφολογική παρατήρηση των μικροοργανισμών του γένους *Bifidobacterium*.

Σύσταση: MRS άγαρ 70 g/l και 0,05% 0,05% L- υδροχλωρικής κυστεΐνης (1.023839.0025, MERCK). Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά και ακολούθησε διανομή σε τρυβλία Petri (90 mm).

2.2.5 Θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth, BHI broth (Himedia). (Corry et al., Handbook of Culture Media for Food Microbiology, 1999)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Enterococcus*, *Staphylococcus* και *Listeria*.

Σύσταση (g/l): έγχυμα από εγκέφαλο μοσχαριού 200.000, έγχυμα από καρδιά βοειού 250.000, πεπτόνη πρωτεόζης 10.000, δεξτρόζη 2.000, χλωριούχο νάτριο 5.000, διφωσφορικό νάτριο 2.500, pH 7,4 ± 0,2 στους 25 ^{o}C. Σε ένα λίτρο νερού διαλύθηκαν 37 g υλικού και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.6 Θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Agar, BHI agar (Himedia)

Χρησιμοποιήθηκε για την αναβίωση, ανάπτυξη και μορφολογική μελέτη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Enterococcus, Staphylococcus* και *Listeria*.

Σύσταση (g/l): BHI broth 37,0 και άγαρ 15,0, pH 7,4 ± 0,2 στους 25 ^{o}C.

Σε ένα λίτρο νερού διαλύθηκαν 52 g υλικού και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά και διανομή του υλικού σε τρυβλία Petri (90 mm).

2.2.7 Θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth Yeast Extact, TSBYE (U.S.P.)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Enterococcus, Staphylococcus* και *Listeria*.

Σύσταση Tryptone Soy Broth (Lab M) (g/l): τρυπτόνη 17,0, πεπτόνη σόγιας 3,0, χλωριούχο νάτριο 5,0, διφωσφορικό κάλιο 2,5, δεξτρόζη 2,5, pH 7,3 ± 0,2.

Σύσταση yeast extract granulated (Merck, 1037530500): 0,3%.

Σε 1 λίτρο νερού διαλύθηκαν 30 g Trypone Soy Broth και 3 g yeast extract με επακόλουθη αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.8 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI Broth, mBHI (modified BHI)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Clostridium*.

Σύσταση: BHI broth 37 g/l και 0,05% L- υδροχλωρικής κυστεΐνης.

Η αποστείρωση του υλικού γινόταν στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.9 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα Columbia Blood Agar, mCBA (Himedia) (Elner *et al*., 1966)

Χρησιμοποιήθηκε για την αναβίωση, ανάπτυξη και μορφολογική μελέτη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Clostridium*.

Σύσταση Columbia Agar Base (g/l): μίγμα πεπτόνων Columbia 23,0, άμυλο καλαμποκιού 1,0, χλωριούχο νάτριο 5,0 και άγαρ No. 2 12,0, pH 7,3 ± 0,2.

Σε 950 ml απιονισμένου νερού διαλύθηκαν 41 g Columbia agar base, 5 g άγαρ No.2 (LabM) και 0,05% L- υδροχλωρική κυστεΐνη με επακόλουθη αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά. Ακολούθησε ψύξη μέχρι τους 48 ^{o}C, προσθήκη 50 ml Horse Blood defibrinated (LabM) με τη βοήθεια αποστειρωμένου ογκομετρικού σωλήνα και διανομή του υλικού σε τρυβλία Petri (90 mm).

2.2.10 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar low glucose (mMRS, 0,2% glucose) (Schillinger and Lucke, 1989)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών *Lactobacillus* spp κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ».

Σύσταση (g/l): βακτηριολογική πεπτόνη (10,0), γλυκόζη (2,0), εκχύλισμα από μοσχάρι (8,0) και ζύμη (4,0), διφωσφορικό κάλιο (2,0), θειικό μαγνήσιο (0,2), θειικό μαγγάνιο (0,04), κιτρικό αμμώνιο (2,0), οξικό νάτριο (3,0) και Tween® 80 (1,0) και άγαρ 12,0. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,2 ± 0,2 με τη βοήθεια 4M NaOH .

Το υλικό μοιράστηκε σε ειδικά φιαλίδια ανά 45 ml, αποστειρώθηκε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά και ακολούθησε διανομή του σε τρυβλία Petri (145 mm).

2.2.11 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα mMRS agar low glucose (mMRS, 0,2% glucose) (Cheikhyoussef *et al.*, 2009)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών *Bifidobacterium* spp. κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ».

Σύσταση (g/l): mMRS άγαρ (0,2% γλυκόζη) και 0,05% L- υδροχλωρική κυστεΐνη.

Το υλικό μοιράστηκε σε ειδικά φιαλίδια ανά 45 ml, αποστειρώθηκε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά και ακολούθησε διανομή του σε τρυβλία Petri (145 mm).

2.2.12 Θρεπτικό υπόστρωμα MRS soft agar (Barefoot and Klaenhammer, 1983)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* κατά τη διεξαγωγή των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ καθώς και στη δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Σύσταση: MRS broth 55 (g/l) και άγαρ 0,7%.

Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.13 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS soft agar, mMRS soft agar (modified) (Cheikhyoussef *et al.*, 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* κατά τη διεξαγωγή των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ.

Σύσταση: MRS broth 55 g/l, 0,05% L- υδροχλωρικής κυστεΐνης και 0,7% άγαρ.

Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.2.14 Θρεπτικό υπόστρωμα BHI soft agar (Brandao *et al.*, 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Enterococcus*, *Staphylococcus* και *Listeria* κατά τη διεξαγωγή των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ.

Σύσταση: BHI broth 37 g/l και 0,7% άγαρ.

Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

2.1.15 Τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI soft agar, mBHI soft agar (modified)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων του γένους *Clostridium* κατά τη διεξαγωγή των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ.

Σύσταση: BHI broth 37 g/l, 0,05% L- υδροχλωρικής κυστεΐνης και 0,7% άγαρ.

Η αποστείρωση του υλικού έγινε στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά.

- ✓ Η διανομή όλων των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων σε τρυβλία Petri (90 mm) γινόταν σε θάλαμο νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες με αναλογία 20 ml θρεπτικού ανά τρυβλίο.

2.3 Διαλύματα

2.3.1 Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων (Lysis buffer)

Σύσταση: 15 % Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada), 1% Brij 58 (Sigma Chemical Company, Mississuga, Ontario, Canada) και 1% Tween® 20 (Bio-Rad).

Για την κατασκευή του διαλύματος λύσεως διαλύθηκαν 0,1 g Brij 58 και 90 μl Tween® 20 σε 10 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα παρέμεινε υπό ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια υπέστη διήθηση με βακτηριολογικό φίλτρο με διάμετρο πόρου 0,22 μm (Millipore GR). Κατόπιν προστέθηκε σε αυτό 1,5 g Chelex-100. Το διάλυμα απαιτούσε συνεχή ανάδευση διότι το Chelex-100 έχει την τάση να καθιζάνει.

Το *Chelex-100* είναι μία ρητίνη (chelating material) η οποία χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ενώσεων μέσω ιοντοανταλλαγής. Συχνά χρησιμοποιείται για την εκχύλιση DNA που προορίζεται να ενισχυθεί μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ο ακριβής του ρόλος δεν είναι γνωστός. Θεωρείται ότι δεσμέυει υδατοδιαλυτούς αναστολείς της αντίδρασης PCR, όπως δέσμευση κατιόντων μετάλλων που ενδέχεται να προκαλέσουν βλάβη στο DNA.

Το *Brij 58* είναι ένα μη-ιονικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται για την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς προκαλεί κυτταρική λύση.

Το *Tween® 20* είναι ένας πολυσορβικός επιφανειοδραστικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ως παράγοντας διαλυτοποίησης μεμβρανικών πρωτεϊνών.

2.3.2 Υλικό χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Sephadex G-25

Σύσταση: Διαλύθηκαν 5 g υλικού σε 30 ml PBS pH 6,5. Κατόπιν το διάλυμα επωάστηκε στους 90 ^{o}C για μία ώρα. Κατόπιν έγινε έκπλυση του διαλύματος 3-4 φορές με PBS pH 6,5 και φύλαξη στους 4 ^{o}C για μακρά αποθήκευση.

2.3.3 Υλικό χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Sephadex G-100 (Sephadex G100-120, Sigma)

Σύσταση: Διαλύθηκαν 2,5 g υλικού σε 150 ml PBS pH 6,5. Κατόπιν το διάλυμα επωάστηκε στους 90 ^{o}C για 5 ώρες. Στη συνέχεια έγινε έκπλυση του διαλύματος 3-4 φορές με PBS pH 6,5, διανομή σε falcon των 50 ml και φύλαξη στους 4 ^{o}C για μακρά αποθήκευση.

2.3.4 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1 x (Sambrook and Russell, 2001)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σύσταση: 0,04M Tris-acetate, 0,001 M EDTA

2.3.5 Ρυθμιστικό διάλυμα (6x) φόρτωσης δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (Sambrook and Russell, 2001)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σύσταση: 0,25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0,25% w/v xylene cyanol FF, 30% w/v γλυκερόλη σε νερό.

Η αναλογία 6 x χρωστικής προς δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης είναι 1: 5.

2.3.6 Διάλυμα PPS

Σύσταση: 0,1 % w/v βακτηριολογική πεπτόνη, 0,85 w/v χλωριούχο νάτριο και απιονισμένο H_2O.

Το διάλυμα κατασκευάστηκε και μοιράστηκε σε φιαλίδια Universal ανά 9 ml και ανά 9,9 ml. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

2.3.7 Πρότυπο stock διάλυμα της πρωτεΐνης αλβουμίνης βοδινού ορού BSA, τελικής συγκέντρωσης 100 μg/ml (Bradford, 1970).

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό πρωτεΐνης κατά Bradford για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, αφού αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml.

Σύσταση: Για το διάλυμα αυτό, 100 μg BSA διαλύθηκαν σε 1ml νερού. Το διάλυμα χωρίστηκε σε aliquots, τα οποία φυλάχθηκαν στους -20 ^{o}C.

2.3.8 Αραιωμένο διάλυμα BSA 25 μg/ml

Το αραιωμένο διάλυμα χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης στον προσδιορισμό πρωτεΐνης κατά Bradford.

Σύσταση: Σε 600 μl νερού προστέθηκαν 200 μl από το stock διάλυμα BSA (100 μg/ml).

2.3.9 Stock διάλυμα Bradford (Bradford, 1976).

Σύσταση: σε 50 ml μεθανόλης διαλύθηκαν 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε 100 ml διαλύματος 85% H_3PO_4 και αραιώθηκε μέχρι τον τελικό όγκο των 200 ml με νερό. Το τελικό διάλυμα έχει βαθύ κόκκινο χρώμα και τελικές συγκεντρώσεις 0,5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% μεθανόλη και 42,5% H_3PO_4. Το διάλυμα φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4 ^oC, παραμένοντας σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.3.10 Αραιωμένο διάλυμα Bradford για τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης

Σύσταση**:** Σε 1 ml από το stock διάλυμα προστέθηκαν 4 ml νερού.

Το αραιωμένο διάλυμα ήταν σκούρου καφέ χρώματος, με pH 1,1 και παρέμεινε σταθερό για εβδομάδες στους 4 ^oC και σε σκουρόχρωμη φιάλη.

2.3.11 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS pH 6,5)

Σύσταση: Σε ένα ποτήρι ζέσεως με απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 0,7240 g Na_2HPO_4, 0,18 g NaH_2PO_4 και 9 g NaCl. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,5 και ο όγκος συμπληρώθηκε στο 1 λίτρο σε ογκομετρική φιάλη. Κατόπιν το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121 ^oC για 15 λεπτά.

2.3.12 Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου (30% T, 2,67% C)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE).

Σύσταση: Διαλύθηκαν 14,6 g ακρυλαμιδίου και 0,8 g N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου σε απεσταγμένο νερό και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 50 ml σε ογκομετρική φιάλη. Το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί 30 ημέρες μετά την ημέρα παρασκευής του.

% T = [(g ακρυλαμιδίου + g N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου)/ολικός όγκος] x 100

% C = [g N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου / (g ακρυλαμιδίου + g N, N'-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου)] x 100

2.3.13 Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE).

Σύσταση: Διαλύθηκαν 3,0285 g Tris σε απεσταγμένου νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 6,8 με 4M HCl. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50 ml σε ογκομετρική φιάλη.

2.3.14 Ρυθμιστικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE).

Σύσταση: Διαλύθηκαν 9,0855 g Tris σε απεσταγμένου νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 8,8 με 4M HCl. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50 ml σε ογκομετρική φιάλη.

2.3.15 Διάλυμα 10% (w/v) SDS

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

Σύσταση: Σε 5 ml απεσταγμένου νερού διαλύθηκαν 0,5 g SDS.

2.3.16 Διάλυμα 0,05% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

Σύσταση: Σε 10 ml απεσταγμένου νερού διαλύθηκαν 0,005 g κυανούν της βρωμοφαινόλης.

2.3.17 Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w/v) (ammonium persulfate, APS)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE).

Σύσταση: Σε 100 μl απεσταγμένου νερού διαλύθηκαν 0,01 g υπερθειϊκού αμμωνίου. Το διάλυμα κατασκευάστηκε την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

2.3.18 Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE)

2.3.19 Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

2.3.20 Διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας 10-230 KDa (ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range 10-230 KDa, BioLab)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE και *Native* PAGE).

2.3.21 Διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας 2,5-20 KDa (Prestained Protein Ladder, Range 2,5-20 KDa, Genscript, USA)

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

2.3.22 Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης

Σύσταση: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,002 % (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης. Συγκεκριμένα, αναμίχθηκαν 3,88 ml νερού με 1 ml διαλύματος 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml γλυκερόλης, 1,6 ml διαλύματος 10% (w/v) SDS, 0,4 ml 2-μερκαπτοαιθανόλης και 0,2 ml διαλύματος 0,05% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης.

2.3.23 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5x) για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης

Σύσταση: 125 mM Tris, 960 mM γλυκίνη, 0,5% (w/v) SDS, pH 8,3. Συγκεκριμένα, διαλύθηκαν 15 g Tris, 72 g γλυκίνης και 5 g SDS σε απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώθηκε σε ογκομετρική φιάλη στο 1 λίτρο. Το pH ρυθμίστηκε με οξύ ή βάση. Πριν την ηλεκτροφόρηση, 60 ml από το 5 x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, αραιώθηκε με 240 ml ύδατος.

2.3.24 Ρυθμιστικό διάλυμα 2 M Tris-HCl pH 6,8.

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*Native*-PAGE).

Σύσταση: Διαλύθηκαν 12,114 g Tris σε απεσταγμένου νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 6,8 με 4M HCl. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50 ml σε ογκομετρική φιάλη.

2.3.25 Διάλυμα 100 mM 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS (Sigma).

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*Native*-PAGE).

2.3.26 Διάλυμα 0,11% (w/v) της χρωστικής κυανούν της βρωμοφαινόλης.

Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*Native*-PAGE).

2.3.27 Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα *Native*-PAGE.

Σύσταση: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% (w/v) γλυκερόλη, 0,008% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης. Αναμίχθηκαν 3,2 ml νερού με 1,0 ml διαλύματος 2 M Tris-HCl

pH 6,8, 3,2 ml γλυκερόλης και 0,6 ml διαλύματος 0,11% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης.

2.3.28 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5 x) για πήκτωμα *Native*-PAGE

Σύσταση: 125 mM Tris, 960 mM γλυκίνη, 2,5 mM CHAPS, pH 8,3. Συγκεκριμένα, διαλύθηκαν 3,75 g Tris, 18 g γλυκίνης και 0,3845 g CHAPS σε απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώθηκε σε ογκομετρική φιάλη στα 250 ml. Το pH ρυθμίστηκε με οξύ ή βάση. Πριν την ηλεκτροφόρηση, 60 ml από το 5 x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, αραιώθηκαν με 240 ml ύδατος.

2.3.29 Coomasie Brilliant Blue R-250 (Biorad)

Χρωστική για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

2.3.30 Διάλυμα χρωστικής για την ανίχνευση πρωτεϊνών με Coomasie Brilliant Blue R-250

Σύσταση: 0,25% Coomasie Brilliant Blue R-250, 40% v.v μεθανόλη και 10% v.v οξικό οξύ.

2.3.31 Διάλυμα αποχρωματισμού μετά από χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Coomasie Brilliant Blue R-250

Σύσταση: 40% v.v μεθανόλη και 10% v.v οξικό οξύ.

2.3.32 Διάλυμα συντήρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με Coomasie Brilliant Blue R-250

Σύσταση: 1% v.v οξικό οξύ, 5% v.v οξικό νάτριο και 10% v.v γλυκερόλη.

2.3.33 Διάλυμα μονιμοποίησης

Διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο χρώσης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

Σύσταση: 50% v.v μεθανόλη και 12% v.v οξικό οξύ.

2.3.34 Διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)

Χρησιμοποιήθηκε για χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

Σύσταση**:** 0,2 g/l

2.3.35 Διάλυμα νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$)

Χρησιμοποιήθηκε για χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

Σύσταση: 2 g/l, 0,75 ml από stock διάλυμα 37% φορμαλδεΰδης.

2.3.36 Διάλυμα ανάπτυξης

Χρησιμοποιήθηκε για χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

Σύσταση: Na_2CO_3, 60 g/l, 0,5 ml από stock διάλυμα 37% φορμαλδεΰδης, 4 mg/ml $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$.

2.3.37 Διαλύματα αιθανόλης 50% και 30%

Χρησιμοποιήθηκαν για χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο.

2.4 Υγρές κυτταρικές καλλιέργειες βακτηριακών απομονώσεων

Οι υγρές κυτταρικές καλλιέργειες των βακτηριακών απομονώσεων προέκυψαν από τον εμβολιασμό 1% (v/v) κυτταρικού εναιωρήματος έκαστου μικροοργανισμού στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα αύξησης του μέσα σε υγρό δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθησε η επώαση στις αντίστοιχες συνθήκες καλλιέργειας.

2.5 Συντήρηση Μικροοργανισμών

Όλες οι βακτηριακές απομονώσεις αποθηκεύτηκαν στους -80 ^{o}C, στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό τους υπόστρωμα με την προσθήκη γλυκερόλης (30%) για μακρά αποθήκευση. Η κωδικοποίηση όλων των βακτηριακών απομονώσεων καθώς και οι μορφολογικές, βιοχημικές τους ιδιότητες παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

2.6 «Ενεργοποιημένες καλλιέργειες»

Πριν από κάθε πειραματική διαδικασία, όλες οι βακτηριακές απομονώσεις υποβλήθηκαν σε διαδοχικές υγρές ανακαλλιέργειες προκειμένου να επιτευχθεί η ενεργοποίηση τους («ενεργοποιημένες καλλιέργειες») (Kotsou *et al*., 2008). Για τις βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Lactobacillus* πραγματοποιήθηκαν τρεις ανακαλλιέργειες των 48 ωρών, ενώ για τις απομονώσεις του γένους *Bifidobacterium* η ενεργοποίηση έλαβε χώρα με δύο διαδοχικές υγρές ανακαλλιέργειες καθότι αυτά τα βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία (μία ανακαλλιέργεια των 72 ωρών και μία των 48 ωρών). Η ενεργοποίηση έγινε στα ίδια θρεπτικά υποστρώματα στα οποία έγινε και η καλλιέργεια των στελεχών, στους 37 ^{o}C, υπό αναερόβιες συνθήκες.

2.7 Βιοδοκιμή ελέγχου της ευαισθησίας των παθογόνων έναντι αντιμικροβιακών ουσιών

Το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων (*Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp.) εξετάσθηκαν για την ικανότητα αναστολής αντιμικροβιακών δεικτών με τη

χρήση δύο **μεθόδων διάχυσης σε άγαρ : «*διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».***

Α) Διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ (agar spot assay)

Η μέθοδος αυτή έγινε σύμφωνα με τους Schillinger και Lucke (1989). Μικρή ποσότητα (3 μl) εναιωρήματος «ενεργοποιημένης» βακτηριακής καλλιέργειας από τις υπό εξέταση βακτηριακές απομονώσεις τοποθετήθηκαν με τη μορφή κηλίδας πάνω σε 45 ml τροποποιημένου MRS άγαρ (0,2% γλυκόζη) *(παρ. 2.2.10 & 2.2.11)*, το οποίο προηγουμένως είχε εγχυθεί σε τρυβλία Petri (150 mm) και στη συνέχεια επωάστηκαν αναερόβια, στους 37 ^{o}C για 20 - 24 ώρες. Το τροποποιημένο MRS άγαρ περιείχε μειωμένη ποσότητα γλυκόζης (0,2%) για την αποφυγή παραγωγής οξικού οξέος, το οποίο επίσης αποτελεί πιθανό αναστολέα της μικροβιακής αύξησης και το pH του ρυθμιζόταν στο 6,2 ± 0,2 προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της αναστολής λόγω παρουσίας οργανικών οξέων. Οι αναερόβιες συνθήκες ήταν απαραίτητες προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξικού οξέος. Ακολούθως, 300 μl εναιωρήματος από κάθε μικροοργανισμό δείκτη εμβολιάστηκαν σε 20 ml του αντίστοιχου θρεπτικού υποστρώματος, το οποίο περιείχε χαμηλή συγκέντρωση άγαρ (soft agar 0,7%) και το εμβολιασμένο πλέον θρεπτικό υπόστρωμα απλώθηκε στα τρυβλία Petri που περιείχαν τις καλλιέργειες (υπό τη μορφή κηλίδων) των 24 ωρών, των βακτηρίων. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε άγαρ είναι απαραίτητη καθώς έχει διαπιστωθεί πως στην περίπτωση των βακτηριοσινών, το άγαρ, όπως και κάθε άλλο πηκτικό μέσο, δυσκολεύει τη διάχυση του μορίου. Τα τρυβλία παρέμειναν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επωάστηκαν αναερόβια, στους 37 ^{o}C για 24 ώρες. Τα θρεπτικά υποστρώματα με χαμηλή συγκέντρωση άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μικροοργανισμό δείκτη προβάλλονται στον Πίνακα 2.2. Η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης έγινε με την παρατήρηση ζωνών αναστολής γύρω από τις αποικίες του στελέχους-παραγωγού και την καταγραφή των διαμέτρων τους. Ζώνες αναστολής θεωρήθηκαν μόνο οι διαυγείς ζώνες άνω των 2 mm.

Β) Διάχυση σε πηγάδι από άγαρ (agar well diffusion assay)

Όλες οι βακτηριακές απομονώσεις που ανιχνεύθηκαν για αντιμικροβιακή δράση μέσω της πρώτης μεθόδου, εξετάστηκαν ως προς το ίδιο χαρακτηριστικό, με τη

χρήση των ίδιων μικροοργανισμών δεικτών, με μία τροποποίηση της μεθόδου "διάχυση σε πηγάδι από άγαρ " που ακολούθησαν ο Brandao και συνεργάτες (2010). Στη μέθοδο αυτή, 45 ml θρεπτικού υποστρώματος (0,7% άγαρ) εμβολιασμένου με 700 μl από καλλιέργεια 24 ωρών από τον εκάστοτε μικροοργανισμό δείκτη (το θρεπτικό υπόστρωμα μεταβάλλεται ανάλογα με το μικροοργανισμό δείκτη και οι αντιστοιχίες φαίνονται στον Πίνακα 2.2) απλώθηκαν σε τρυβλία Petri (150 mm) τα οποία περιείχαν επιστρωμένο 20 ml άγαρ (1,2%). Τα τρυβλία παρέμειναν 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και 1 ώρα στους 4 ^{o}C για να πήξει πλήρως το υπόστρωμα και στη συνέχεια, με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, σχηματίστηκαν πάνω σε αυτό πηγάδια διαμέτρου 5 mm. Σε καθένα από αυτά εμβολιάστηκαν 40 μl από το υπερκείμενο καλλιέργειας 24 ωρών (*cell free supernatants* = υπερκείμενα ελεύθερα κυττάρων) από κάθε υποψήφιο βακτηριακό στέλεχος. Τα τρυβλία παρέμειναν 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει η διάχυση της βακτηριοσίνης και στη συνέχεια επωάστηκαν ανερόβια, στους 37 ^{o}C για 16 ώρες. Η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης έγινε, όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, λαμβάνοντας υπόψη τις ίδιες παραμέτρους.

- ✓ Λόγω του ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει την αντιμικροβιακή δράση στο υπερκείμενο της υγρής κυτταρικής καλλιέργειας του εκάστοτε υποψήφιου βακτηριακού στελέχους πριν από κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Όλες οι βακτηριακές «ενεργοποιημένες καλλιέργειες» των υπό εξέταση στελεχών υποβλήθηκαν σε μία τελευταία 24ώρη ανακαλλιέργεια. Συγκεκριμένα 300 μl της ενεργοποιημένης καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε 15 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος (MRS broth για *Lactobacillus* spp. και mMRS για *Bifidobacterium* spp.) και επωάστηκαν στους 37 ^{o}C, για 24 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες. Η παραλαβή των υπερκειμένων καλλιεργειών έγινε με φυγοκέντρηση στα 2.970 x *g* για 15 λεπτά στους 4 ^{o}C, ενώ στην περίπτωση που δεν είχε καταβυθιστεί πλήρως το κυτταρικό ίζημα, η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Ακολούθησε ρύθμιση του pH των υπερκειμένων στο 6,5 με τη χρήση διοξειδίου του νατρίου NaOH (NαOH 4M) και διήθηση με βακτηριολογικά φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,22 μm (Millipore GR) για την απομάκρυνση των κυττάρων (Gong H. S. *et al.*, 2010). Το pH των υπερκειμένων ρυθμίστηκε στο 6,5 καθότι οι ενεργοποιημένες βακτηριακές

καλλιέργειες, μετά την τελευταία ανακαλλιέργεια, εμφάνιζαν όξινο pH 4-4,5, λόγω ζύμωσης γαλακτικού οξέος, και αυτό θα μπορούσε να συντελέσει σε μη επιθυμητή αντιμικροβιακή δράση.

Πίνακας 2.2: Μικροοργανισμοί δείκτες και τα αντίστοιχα θρεπτικά τους υποστρώματα με 0,7% άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ.

ΑΑ	**Μικροοργανισμοί δείκτες**	**Θρεπτικά υποστρώματα**
1.	*Enterococcus faecalis* ATCC 51299	BHI soft agar[α]
2.	*Enterococcus hirae* CIP 5855	BHI soft agar
3.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538	BHI soft agar
4.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923	BHI soft agar
5.	*Listeria monocytogenes* DSM 12464	BHI soft agar
6.	*Clostridium perfringens*	mBHI soft agar[β]
7.	*Clostridium difficile* ATCC 9689	mBHI soft agar
8.	*Lactobacillus casei* DSMZ 20011	MRS soft agar[γ]
9.	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081	MRS soft agar
10.	*Lactobacillus rhamnosus* WAV	MRS soft agar
11.	*Bifidobacterium bifidum* DSM 20456	mMRS soft agar[δ]
12.	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140	mMRS soft agar

[α,β,γ,δ] Η σύσταση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων περιγράφεται στις ενότητες 2.2.12 έως 2.2.15

2.8 Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Η εκχύλιση γενωμικού DNA από το στέλεχος του γένους *Lactobacillus* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Tissue Kit (Macherey Nagel, Duren,Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας αλλά και με τη μέθοδο που πρότειναν οι Jayaratne και Rutherford το 1999. Οι κυτταρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο διαδικασίες προέκυψαν από την αναβίωση του βακτηριακού στελέχους, με τη μεταφορά 40 μl από τα stock γλυκερόλης του συγκεκριμένου στελέχους σε τρυβλία Petri (90 mm) με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar και επώαση στους 37 ^{o}C, για 48 ώρες, σε αναερόβιες συνθήκες.

Συγκεκριμένα, για την πρώτη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε υγρή κυτταρική καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους, η οποία προήλθε από την αναβίωση του στελέχους σε

στερεή καλλιέργεια. Η υγρή κυτταρική καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό MRS, στους 37 ^{o}C, υπό αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες. Ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων, δέσμευση και έκλουση υψηλά καθαρού DNA.

Αντίθετα, για τη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης βακτηριακού DNA χρησιμοποιήθηκε στερεή καλλιέργεια του υπό εξέταση στελέχους που προήλθε από την προηγούμενη αναβίωση του. Η στερεή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar, στους 37 ^{o}C, υπό αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες.

Αρχικό βήμα της μεθόδου αυτής ήταν η δημιουργία κυτταρικών εναιωρημάτων που αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένη τιμή πυκνότητας με βάση την κλίμακα McFarland. Η κλίμακα θολερότητας McFarland (Πίνακας 2.3) χρησιμοποιείται ως πρότυπο αναφοράς για τον υπολογισμό του αριθμού βακτηρίων σε ένα υγρό εναιώρημα. Η κλίμακα κατασκευάζεται με ανάμιξη συγκεκριμένης αναλογίας $BaCl_2$ (1,175%) και H_2SO_4 (1%). Με την ανάμιξη 11 διαφορετικών αναλογιών προκύπτουν οι 11 διαφορετικές τιμές της κλίμακας που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αριθμό βακτηρίων ανά ml εναιωρήματος. Για τον σκοπό αυτό γίνεται απομόνωση αποικιών από τη στερεή κυτταρική καλλιέργεια με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας και μεταφορά τους σε 0,5 ml φυσιολογικού ορού (0,5N) μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο θολερότητας σύμφωνα με το αντίστοιχο εναιώρημα της κλίμακας. Στην παρούσα εργασία δημιουργήθηκαν κυτταρικά εναιωρήματα πυκνότητας 3, 5 και 7 της κλίμακας McFarland τα οποία αντιστοιχούσαν σε 9 x 10^8, 15 x 10^8 και 21 x 10^8 αριθμό βακτηρίων ανά ml εναιωρήματος.

Πίνακας 2.3: Πρότυπα McFarland (Συσχέτιση με βακτηριακά εναιωρήματα)

McFarland Standard #	**$BaCl_2$ (1,175%) Vol (ml)**	**H_2SO_4 (1%) Vol (ml)**	**Αριθμός βακτηρίων/ml (x10^8)**
0.5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30

Στη συνέχεια, 50 μl από κάθε ένα από τα τρία εναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου eppendorf του 1,5 ml με 50 μl διαλύματος λύσεως *(παρ. 2.3.1)*. Έπειτα τα μίγματα επωάστηκαν στους 95 ^{o}C για 15 λεπτά με ακόλουθη φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 2 λεπτά. Τελικό στάδιο ήταν η μεταφορά 50 μl από την επιφάνεια του διαλύματος σε καινούριο σωλήνα τύπου eppendorf του 1,5 ml και φύλαξη στους -20 ^{o}C μέχρι το επόμενο βήμα αυτής της μοριακής μελέτης.

2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR, για την ενίσχυση της 16S rDNA αλληλουχίας βακτηριακού στελέχους

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction), μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές αλληλουχίες.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πέντε αντιδράσεις PCR, μία για κάθε DNA που απομονώθηκε και μία για αρνητικό μάρτυρα:

I. Μίγμα PCR με απομονωμένο DNA με τη μέθοδο Chelex-100 με πυκνότητα ίση την τιμή 3 της κλίμακας McFarland
II. Μίγμα PCR με απομονωμένο DNA με τη μέθοδο Chelex-100 με πυκνότητα ίση την τιμή 5 της κλίμακας McFarland
III. Μίγμα PCR με απομονωμένο DNA με τη μέθοδο Chelex-100 με πυκνότητα ίση την τιμή 7 της κλίμακας McFarland
IV. Μίγμα PCR με απομονωμένο DNA με το Nucleospin Tissue Kit (Macherey Nagel, Duren,Germany)
V. Μίγμα PCR που δεν περιείχε DNA (αρνητικός μάρτυρας)

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hot Start Taq DNA polymerase (5u/μl, BIORON, Ludwigshafen, Germany), το οποίο δεν οδηγεί σε μη ειδική πρόσδεση καθώς λειτουργεί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες.

Το γονίδιο το οποίο ενισχύθηκε για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους του στελέχους *Lactobacillus* spp. είναι το 16S rDNA (~1500 βάσεις), το οποίο περιέχει αρκετές περιοχές με εκτενώς συντηρημένες αλληλουχίες αλλά και περιοχές με έντονη μεταβλητότητα χρησιμεύοντας έτσι ως εξαιρετικό φυλογενετικό χρονόμετρο (Βιολογία των μικροοργανισμών, Brock, Τόμος Ι).

Για την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί εκκινητές P0 (**forward**) και P6 (**reverse**) οι οποίοι ενισχύουν 1400 βάσεις του 16S rDNA γονιδίου.

Οι αλληλουχίες τους είναι οι εξής:

P0 (**forward**): 5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTAG – 3'

P6 (**reverse**): 5' – CTACGGCTACCTTGTTACGA- 3'

Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 50 μl και περιείχε:

- 40 μl νερού
- 5 μl 10 x ρυθμιστικού διαλύματος
- 2 μl dNTPs (τελικός όγκος = 0.2 mM)
- 1 μl από το μίγμα εκκινητών (τελικός όγκος καθενός = 15 pmole)
- 2 units Hot start Taq DNA polymerase
- 2 μl DNA

Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας και δεν περιείχε DNA περιείχε 42 μl νερού. Στην αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το DNA που απομονώθηκε με το Nucleospin Tissue Kit, τα 2 μl προήλθαν από 1/10 αραίωση του αρχικού καθαρού DNA.

Οι αντιδράσεις πολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν σε ένα θερμικό κυκλοποιητή (PCR Primus 96 Plus, MWG AG, Biotech) και οι συνθήκες προσομοίαζαν σε Touchdown PCR (TD-PCR). Η Touchdown PCR αποτελεί έναν απλό και ταχύ τρόπο για τη βελτιστοποίηση των PCRs αυξάνοντας την ειδικότητα, την ευαισθησία και την απόδοση της συμβατικής PCR αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη για ενδεχόμενο επανασχεδιασμό εκκινητών. Η TD-PCR χρησιμοποιεί μία αρχική θερμοκρασία υβριδοποίησης υψηλότερη από την προβλεπόμενη θερμοκρασία τήξης (Tm) των εκκινητών που χρησιμοποιούνται και στη συνέχεια προοδευτικά μεταβαίνει σε μία χαμηλότερη, πιο ανεκτική θερμοκρασία υβριδοποίησης κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων, αποφεύγοντας έτσι τα παραπροϊόντα (Korbie & Mattick, 2008).

Στην παρούσα εργασία η θερμοκρασία υβριδοποίησης ξεκίνησε από 60 ^{o}C και σταδιακά μειώθηκε στους 55 ^{o}C και έπειτα στους 50 ^{o}C. Αναλυτικότερα οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Αρχική αποδιάταξη στους 95 ^{o}C για 4 min, 5 κύκλοι στους 95 ^{o}C για 40 sec (αποδιάταξη), 60 ^{o}C για 40 sec (υβριδοποίηση) και 72 ^{o}C για 1,5 min (πολυμερισμός), 5 κύκλοι στους 95 ^{o}C για 40 sec, 55 ^{o}C για 40 sec και 72 ^{o}C για 1,5 min, 25 κύκλοι στους 95 ^{o}C για 40 sec, 50 ^{o}C για 40 sec και 72 ^{o}C για 1,5 min. Ως τελικό στάδιο πολυμερισμού ήταν στους 72 ^{o}C για 5 min.

2.10 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, καθαρισμός και αλληλούχιση

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (1%) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE *(παρ. 2.3.4)* υπό σταθερή τάση στα 80 Volts. Για την κατασκευή του πηκτώματος 0,25 gr αγαρόζης προστέθηκαν σε 25 ml 1 x TAE. Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και στη συνέχεια παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, αφού προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί τα κατάλληλα χτενάκια για τον σχηματισμό των πηγαδιών. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφαιρέθηκαν τα χτενάκια. Φορτώθηκαν 5 μl από κάθε απομονωμένο DNA (4 προϊόντα PCR), 6,6 μl (250 ng/μl) από τον μάρτυρα λHindIII και 5 μl νερού ως αρνητικός μάρτυρας. Όλα τα δείγματα αναμίχθηκαν με 1 μl 6 x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης *(παρ. 2.3.5)*.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε διάλυμα EtBr 10 μg/ml για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια έγινε παρατήρηση των ζωνών υπό UV ακτινοβολία.

Επόμενο βήμα της διαδικασίας αυτής ήταν ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Duren, Γερμανία). Προκειμένου να γίνει ο καθαρισμός των ενισχυμένων προϊόντων της PCR με τη χρήση του Nucleospin Extract II, ενώθηκαν:

- 45 μl από το ενισχυμένο τμήμα DNA από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 3 της κλίμακας McFarland
- 45 μl από το ενισχυμένο τμήμα DNA από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 5 της κλίμακας McFarland
- 10 μl από το ενισχυμένο τμήμα DNA από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 7 της κλίμακας McFarland

Η ανάλυση της αλληλουχίας των ενισχυμένων περιοχών έγινε στην VBC Biotech (Vienna) και η σύγκριση αυτών με όλες τις αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στις τράπεζες δεδομένων με χρήση του λογισμικού Lasergene 6 (SeqMan).

2.11 Προσδιορισμός της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας που παράγεται στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του βακτηριακού στελέχους Lactobacillus gasseri

2.11.1 Επίδραση υδρολυτικών ενζύμων και καταλάσης στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ουσία που εκκρίνεται στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας βακτηριακού στελέχους και προκαλεί αντιμικροβιακή δράση αποτελεί πρωτεϊνικό μόριο (βακτηριοσίνη) έγινε επίδραση στο υπερκείμενο του στελέχους με πρωτεάση. Για την περαιτέρω ανάλυση της φύσης της ουσίας έγινε επίδραση στο υπερκείμενο του στελέχους με υδρολυτικά ένζυμα και καταλάση. Μετά από όλες τις δοκιμές, στα υπερκείμενα στα οποία έγιναν οι επιδράσεις, ακολούθησε ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης έναντι του ευαίσθητου στελέχους (*L. delbrueckii* DSMZ 20081) με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ». Δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με την ίδια μέθοδο έγινε και σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS, που είχε υποστεί τις ίδιες επιδράσεις. Ως θετικός μάρτυρας παρουσίας ζώνης αναστολής χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο του παραγωγού στελέχους.

Συγκεκριμένα σε 2 ml υπερκειμένου (cell free supernatant) ενεργοποιημένης βακτηριακής καλλιέργειας του υπό εξέταση στελέχους έγινε επίδραση με **υδρολυτικά ένζυμα**: πρωτεάση (0,5 mg/ml), α-αμυλάση (5 u/ml), λιπάση (5,28 u/ml) και με **καταλάση** (0,5 mg/ml). Μετά το πέρας της απαιτούμενης επώασης του υπερκειμένου σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια με κάθε ένζυμο, ακολούθησε απενεργοποίηση του στους 95 ^{o}C για 5-10 λεπτά (Gong *et al.*, 2010). Οι συνθήκες επώασης προβάλλονται στον Πίνακα 2.4. Όλα τα ένζυμα προήλθαν από την εταιρεία Sigma – Aldrich. Το μίγμα αναστολέων (Πίνακας 2.5) χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με την επίδραση με λιπάση, καθότι σύμφωνα με τις οδηγίες τις κατασκευάστριας εταιρείας το ένζυμο έφερε δραστικότητα α – αμυλάσης και πρωτεάσης.

Πίνακας 2.4: Συνθήκες επώασης με υδρολυτικά ένζυμα και καταλάση

Ένζυμα	Συνθήκες επώασης
Καταλάση	2 ώρες, 37 ^{o}C
Πρωτεάση	2 ώρες, 37 ^{o}C
α-Αμυλάση	1/2 ώρα, 30 ^{o}C
Λιπάση	3 ώρες, 37 ^{o}C
Λιπάση + αναστολείς πρωτεασών	3 ώρες, 37 ^{o}C

Πίνακας 2.5: Μίγμα αναστολέων πρωτεασών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επίδραση με λιπάση

Αναστολείς πρωτεασών	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα σε 2 ml SP ή MRS
Leupeptin	10 μg/ml	2 μl
Pepstatin	10 μg/ml	20 μl
Aprotinin	10 μg/ml	2,8 μl
PMSF	1 mM	20 μl
NaF	1 mM	2 μl
Na_3VO_4	1 mM	20 μl

2.11.2 Προσδιορισμός των παραμέτρων pH, θερμοκρασίας και διαφόρων αντιδραστηρίων στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας

Στο υπερκείμενο της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους έγινε τροποποίηση των συνθηκών pH και θερμοκρασίας καθώς και επίδραση με διάφορα αντιδραστήρια. Στην ίδια επεξεργασία υπεβλήθη μη εμβολιασμένο, θρεπτικό υπόστρωμα MRS (αρνητικός μάρτυρας). Η ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης έγινε με την παρατήρηση των ζωνών αναστολής μετά από τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» με μικροοργανισμό δείκτη τον *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Ως θετικός μάρτυρας παρουσίας ζώνης αναστολής χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο του παραγωγού στελέχους.

Συγκεκριμένα, σε 2 ml υπερκειμένου (cell free supernatant) ενεργοποιημένης βακτηριακής καλλιέργειας του υπό εξέταση στελέχους προστέθηκαν σε τελική συγκέντρωση 1% τα αντιδραστήρια Tween® 20, Tween® 80, Triton – X, SDS, EDTA και NaCl. Τα δείγματα επωάστηκαν για ½ ώρα στους 30 ^{o}C (Gong H. S. *et al*., 2010).

Η επίδραση του pH έγινε ρυθμίζοντας 2 ml υπερκειμένου ενεργοποιημένης βακτηριακής καλλιέργειας σε ένα εύρος τιμών pH (2, 4, 6, 8, 10) με τη βοήθεια υδροχλωρικού οξέος 1N και υδροξειδίου του νατρίου 1N. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 ^{o}C για 2 ώρες με ακόλουθη επαναφορά του pH στο 6,5.

Ο έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας έγινε θερμαίνοντας το υπερκείμενο της ενεργοποιημένης βακτηριακής καλλιέργειας (2 ml) για ½ ώρα στους 60 ^{o}C, 80 ^{o}C, 100 ^{o}C και στους 121 ^{o}C για 15 λεπτά. Επίσης, έγιναν επωάσεις στους 4 ^{o}C, -20 ^{o}C, -80 ^{o}C για 1, 2, 7 και 30 ημέρες (Hadji-Sfaxi I. *et al*., 2011) .

Μετά το πέρας όλων των δοκιμών, έγινε ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» σε τρεις επαναλήψεις.

2.12 Καλλιέργεια του παραγωγού στελέχους Lactobacillus gasseri *σε κλειστό σύστημα αύξησης και προσδιορισμός της ποσότητας της παραγόμενης αντιμικροβιακής ουσίας*

Η συγκεκριμένη πειραματική μελέτη βασίστηκε με κάποιες τροποποιήσεις στη μέθοδο που ακολούθησαν οι Hadji-Sfaxi και συνεργάτες (2011). Ενεργοποιημένη βακτηριακή καλλιέργεια 24 ωρών του υπό εξέταση βακτηριακού στελέχους, μετά από αναερόβια επώαση της στους 37 ^{o}C, εκπλύθηκε δύο φορές σε 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS (φυγοκέντρηση καλλιέργειας, απομάκρυνση υπερκειμένου και αναδιάλυση σε 5 ml MRS). Στη συνέχεια 3,5 ml του ξεπλυμένου κυτταρικού εναιωρήματος εμβολιάστηκαν σε 350 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS με επακόλουθη αναερόβια επώαση στους 37 ^{o}C. Κατά τη διάρκεια των πρώτων 48 ωρών παρελήφθησαν δείγματα των 12 ml σε τακτά χρονικά διαστήματα και ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας με θολομετρική μέτρηση της πυκνότητας του κυτταρικού εναιωρήματος και ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση της αντιμικροβιακής ουσίας στο υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας.

2.12.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας σε εναιώρημα καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους με παράμετρο την Οπτική Πυκνότητα

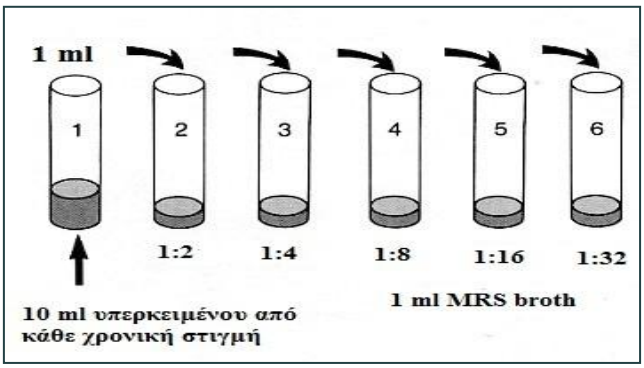
Η μέτρηση της πυκνότητας εναιωρήματος καλλιέργειας σε σπεκτροφωτόμετρο γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm και η βιομάζα εκφράζεται σε μονάδες Οπτικής Πυκνότητας (ΟΠ $_{600nm}$). Στην περίπτωση των μονοκύτταρων μικροοργανισμών η απορρόφηση στα 600 nm είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων του. Καθώς ο πληθυσμός και η θολερότητα του εναιωρήματος αυξάνουν, τόσο περισσότερο φως διαθλάται και η τιμή της απορρόφησης αυξάνει (Καραγκούνη-Κύρτσου, Γενική Μικροβιολογία, 2012) .

Στο παρόν πρωτόκολλο, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας έγινε σε

1 ml δείγματος από το κυτταρικό εναιώρημα καλλιέργειας του μικροβιακού στελέχους. Η μέτρηση της απορρόφησης έλαβε χώρα σε σπεκτροφωτόμετρο Novaspec ® II (Pharmacia Biotech).

2.12.2 Προσδιορισμός της μονάδας δραστικότητας της παραγόμενης αντιμικροβιακής ουσίας

Η ανίχνευση της παραγωγής βακτηριοσίνης έγινε ποσοτικά και ποιοτικά με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ», όπως αυτή έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.7-Β. Από τα εναπομείναντα 11 ml δείγματος, για κάθε χρονική στιγμή (16 χρονικές στιγμές), παρελήφθησαν τα υπερκείμενα ελεύθερα καλλιεργειών, στα οποία έγιναν πέντε διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις σε MRS broth και όλα τα προκύπτοντα δείγματα υποβλήθηκαν σε δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης (διάχυση σε πηγάδι από άγαρ) για τον υπολογισμό της μονάδας δραστικότητας της βακτηριοσίνης. Η μονάδα δραστικότητας εκφράστηκε σε AU (arbitrary unit= αυθαίρετη μονάδα) ανά ml υπερκειμένου και είναι ίση με το αντίστροφο της υψηλότερης αραίωσης που έδωσε διαυγή ζώνη αναστολής. Οι πέντε διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) έγιναν σε 1 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1: Πέντε διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις στα υπερκείμενα ελεύθερων καλλιεργειών από κάθε χρονική στιγμή. Από κάθε αραίωση, καθώς και από το αρχικό υπερκείμενο, παραλαμβάνονταν 40 μl για την δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης.

2.13 Καλλιέργεια σε κλειστό σύστημα αύξησης του ευαίσθητου στελέχους Lactobacillus delbrueckii *DSMZ 20081 και προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας*

Ενεργοποιημένη, υγρή καλλιέργεια του ευαίσθητου στελέχους *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, η οποία είχε επωαστεί για 24 ώρες στους

37 ^{o}C, σε αναερόβιες συνθήκες, εμβολιάστηκε (1% v/v) σε 150 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS. Ακολούθησε επώαση σε αναερόβιες συνθήκες, στους 37 ^{o}C για 24 ώρες και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνοταν δείγμα (1ml) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βιομάζας. Παράμετρος εκτίμησης της βιομάζας ήταν η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος στα 600 nm, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.12.1.

2.14 Προσδιορισμός του τρόπου δράσης της αντιμικροβιακής ουσίας έναντι του μικροοργανισμού δείκτη Lactobacillus delbrueckii *DSMZ 20081* *(Georgalaki* et al.*, 2002)*

Ο προσδιορισμός του τρόπου δράσης της αντιμικροβιακής ουσίας (βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατικός) στον κυτταρικό πληθυσμό του ευαίσθητου στελέχους έγινε με εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού δείκτη μετά από παρέμβαση σε αυτή με το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους. Στη συνέχεια ακολούθησε εκτίμηση της συγκέντρωσης της βιομάζας όσο και καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων της μικροβιακής καλλιέργειας του ευαίσθητου στελέχους.

Συγκεκριμένα, δύο κωνικές φιάλες με 150 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS broth, εμβολιάστηκαν η κάθε μία με 1,5 ml βακτηριακού εναιωρήματος του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081, προερχόμενο από την ίδια βακτηριακή καλλιέργεια και με συνθήκες πανομοιότυπες με αυτές της παραγράφου 2.13. Οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37 ^{o}C, για 48 ώρες, υπό αναερόβιες συνθήκες. Όταν ο πληθυσμός των δύο βακτηριακών καλλιεργειών έφτασε την εκθετική φάση αύξησης (ΟΠ$_{600nm}$=0,3 και βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες ~8 x 10^6 CFU/ml) προστέθηκαν στη μία καλλιέργεια 50 ml υπερκειμένου του ίδιου ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081 (καλλιέργεια α΄) και στην άλλη 50 ml υπερκειμένου του παραγωγού στελέχους *L. gasseri* (καλλιέργεια β΄). Η καλλιέργεια α΄ αποτελούσε το μάρτυρα της συγκεκριμένης δοκιμής. Το υπερκείμενο του παραγωγού στελέχους προήλθε από καλλιέργεια, της οποίας οι ώρες επώασης της αντιστοιχούσαν στο μέγιστο της παραγωγής της αντιμικροβιακής ουσίας με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου 2.12. Από τις δύο καλλιέργειες, ανά μισή ώρα (9 χρονικές στιγμές) παρελήφθησαν δείγματα του 1,5 ml στα οποία έγινε εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού με τις εξής μεθόδους:

Α) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας σε εναιώρημα καλλιέργειας του ευαίσθητου στελέχους με παράμετρο την Οπτική Πυκνότητα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας με εκτίμηση της πυκνότητας θολομετρικά, έγινε σε 1 ml δείγματος όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 2.12.1

Β) Εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε εναιώρημα καλλιέργειας του ευαίσθητου στελέχους

Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ενός πληθυσμού αναφέρεται σε εκείνον τον αριθμό των κυττάρων τα οποία είναι ικανά να διπλασιαστούν και να δώσουν νέα θυγατρικά κύτταρα. Επομένως, πρόκειται για εκείνο τον αριθμό των κυττάρων σε ένα δείγμα, τα οποία είναι ικανά να σχηματίσουν αποικίες στην επιφάνεια ενός στερεού θρεπτικού υποστρώματος. Η καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: α) με τη διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri και β) με την αραίωση του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο Petri. Το δείγμα που προορίζεται για καταμέτρηση προέρχεται από εναιώρημα μικροοργανισμών το οποίο έχει υποστεί τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων προκειμένου να είναι αξιόπιστη η καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε τρυβλίο (η επιθυμητή καταμέτρηση είναι από 30-300 αποικίες). Το αρχικό δείγμα είναι γνωστού όγκου, συνήθως από 0,1 έως 1 ml. Απαρίτητη προϋπόθεση για την αποφυγή μεγάλου στατιστικού σφάλματος είναι η δημιουργία πολλαπλών τρυβλίων στις επιθυμητές αραιώσεις. Τα αποτελέσματα των καταμετρήσεων εκφράζονται σε βιώσιμές μονάδες που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν αποικίες (Colony Forming Units = C.F.U.) ανά ml δείγματος (Καραγκούνη-Κύρτσου, Γενική Μικροβιολογία, 2012).

Στην παρούσα εργασία, η καταμέτρηση των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων έγινε με τη βοήθεια της αραίωσης του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ σε τρυβλίο Petri και των διαδοχικών αραιώσειων (10^0, 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) σε διάλυμα PPS. Όλες οι επωάσεις έγιναν υπό αναερόβιες συνθήκες, στους 37 ^oC.

Ο αρχικός όγκος του εναιωρήματος, από κάθε χρονική στιγμή, για τις διαδοχικές αραιώσεις ήταν 0,1 ml, τα οποία εμβολιάστηκαν σε φιαλίδιο με 9,9 ml PPS *(παρ. 2.3.6)* για να προκύψει η αραίωση 10^{-2}. Από το προκύπτον διάλυμα 100 μl εμβολιάστηκαν σε φιαλίδιο με 9,9 ml PPS για να προκύψει η αραίωση 10^{-4}. Από την τελευταία αναφερθείσα αραίωση, 1 ml εμβολιάστηκε σε 9 ml PPS (αραίωση 10^{-5}) και άλλα 100 μl εμβολιάστηκαν σε 9,9 ml PPS για την αραίωση 10^{-6}. Για την καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων, 100 μl από κάθε αραίωση (και από τη 10^0)

εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της αραίωσης του εμβολίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ σε τρυβλία Petri (90 mm), υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα τρυβλία παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επέλθει ο πολυμερισμός και στη συνέχεια επωάστηκαν αναερόβια, στους 37 ^{o}C για 48 ώρες. Όλες οι αραιώσεις έγιναν με τρεις επαναλήψεις τρυβλίων. Μετά το πέρας των 48 ωρών έγινε η καταμέτρηση των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων και η επεξεργασία τους σε φύλλο εργασίας Microsoft Excel (Microsoft Office, 2007).

2.15 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης με βάση τη μέθοδο Bradford γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του πρωτεϊνικού δείγματος στα 595 nm, με μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Πίνακας 2.6) που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης αλβουμίνης BSA *(παρ. 2.3.7 & 2.3.8)* με την απορρόφηση τους στα 595 nm (Bradford, 1976).

Στα υπό εξέταση δείγματα πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις με νερό (2/200 ή 4/200 ή 5/200 ή 10/200). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 200 μl. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 50 μl του αραιωμένου διαλύματος Bradford *(παρ. 2.3.9 & 2.3.10)* με τη βοήθεια πολυκάναλης αυτόματης πιπέττας. Τα δείγματα επωάστηκαν για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 595 nm.

Τόσο τα υπό εξέταση δείγματα, όσο και τα δείγματα από τα οποία θα προέκυπτε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA, τοποθετήθηκαν σε 96 microwell plates και η φωτομέτρηση γινόταν σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων (Power Wave XS2, BioTek Inc, USA). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε φύλλο εργασίας Microsoft Excel (Microsoft Office, 2007), όπου εκεί έγινε η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Πίνακας 2.6: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Συγκέντρωση (μg/ml)	Μάζα (μg)	Όγκος διαλύματος (μl) BSA (25 μg/ml)	Όγκος H_2O (μl)
0	0	-	200
0,625	0,125	5	195
1,25	0,25	10	190
2,5	0,5	20	180
5	1,0	40	160
7,5	1,5	60	140
10	2,0	80	120
15	3,0	120	80

2.16 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας

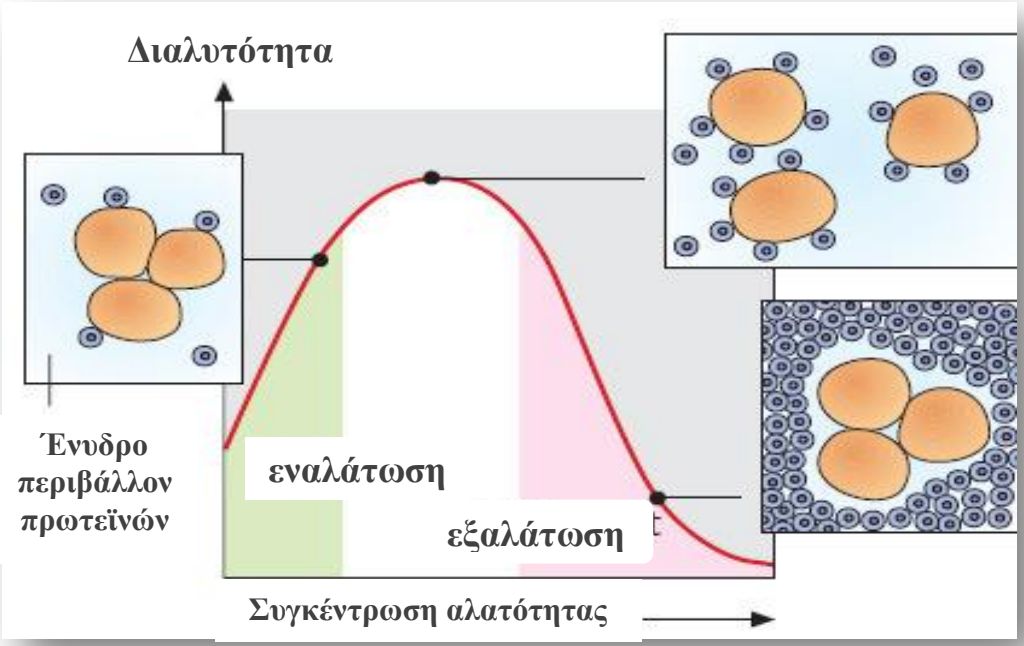
*Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πολλά και διαφορετικά πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ουσίας. Όλα τα πρωτόκολλα είχαν ως αρχικά στάδια την παραλαβή του υπερκειμένου από την υγρή βακτηριακή καλλιέργεια του παραγωγού στελέχους και την κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο όπως αυτά περιγράφονται παρακάτω (*παρ. 2.15.1 & παρ. 2.15.2).

2.16.1 Παραλαβή αντιμικροβιακής ουσίας στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας, στελέχους λακτοβακίλλου

Προκειμένου να γίνει η παραλαβή του υπερκειμένου στο οποίο εκκρίνεται η επιθυμητή πρωτεΐνη, 3,5 ml από ενεργοποιημένη βακτηριακή καλλιέργεια του παραγωγού στελέχους εμβολιάστηκαν σε 350 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS broth και επωάστηκαν στους 37 ^{o}C για 11 ώρες, υπό αναερόβιες συνθήκες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας στα 15.000 x *g*, για 30 λεπτά, στους 4 ^{o}C, παραλαβή του υπερκειμένου, ρύθμιση του pH στο 6,5 με υδροξείδιο του νατρίου (1N NaOH) και προσωρινή φύλαξη στους 4 ^{o}C .

2.16.2 Κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο της αντιμικροβιακής ουσίας από το υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας, στελέχους λακτοβακίλλου

Το θειικό αμμώνιο είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Αυτό το ουδέτερο άλας είναι ιδιαιτέρως γνωστό για την υψηλή διαλυτότητα του, την απώλεια δυνατότητας μετουσίωσης των περισσοτέρων πρωτεϊνών και τη σταθεροποιητική του επίδραση σε πολλές από αυτές (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων στη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Φαινόμενο εναλάτωσης (“salting in”) και εξαλάτωσης (“salting out”). Μόρια νερού τα οποία εντοπίζονται στο άμεσο περιβάλλον υδρόφοβων περιοχών της επιφάνειας της πρωτεΐνης θεωρούνται ως «σταθεροποιημένα» μόρια, με παρόμοιο προσανατολισμό έναντι της επιφάνειας της πρωτεΐνης. Σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος συνεπάγεται ενυδάτωση των αντίστοιχων ιόντων και σταδιακή μείωση των ελεύθερων μορίων νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να απομακρύνονται και τα σταθεροποιημένα μόρια νερού από τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης με σκοπό την ενυδάτωση ιόντων. Οι τελευταίες είναι πλέον ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, σχηματίζοντας σύμπλοκα, τα οποία και κατακρημνίζονται (“salting out”).

Στην παρούσα εργασία έγινε κατακρήμνιση σε 30% και 80% συγκέντρωση αλατότητας οι οποίες αντιστοιχούν σε 169 g και 516 g θειϊκού αμμωνίου ανά λίτρο διαλύματος πρωτεΐνης. Εν προκειμένω, σε δύο κωνικές φιάλες με 30 ml υπερκειμένου του παραγωγού – βακτηριακού στελέχους (από καλλιέργεια 11 ωρών γιατί εκεί παρατηρήθηκε η μέγιστη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας) προστέθηκαν 5,09 g (30% αλατότητα) και 15,48 g (80% αλατότητα) θειϊκού αμμωνίου. Τα

διαλύματα παρέμειναν, υπό ανάδευση, στους 4 ^{o}C, για 12 ώρες. Κατόπιν τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 x *g*, για 30 λεπτά στους 4 ^{o}C για την παραλαβή του καταβυθισμένου ιζήματος. Τα υπερκείμενα που προέκυψαν μεταγγίστηκαν, ενώ τα ιζήματα αναδιαλύθηκαν σε 10 ml PBS pH 6,5 (*παρ. 2.3.11)*. Τόσο τα υπερκείμενα όσο και τα ιζήματα που προέκυψαν, υποβλήθηκαν σε δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» με μικροοργανισμό δείκτη τον *L. delbrueckii* DSMZ 20081 προκειμένου να εξακριβωθεί ότι έχει γίνει η παραλαβή της επιθυμητής πρωτεΐνης. Για την αντιμικροβιακή δράση, από τα ιζήματα που προέκυψαν από την κατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν 10 μl τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 40 μl.

2.16.3 Πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ουσίας

Α)Καθαρισμός πρωτεΐνικού μορίου με υγρή χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25 και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Τα αρχικά βήματα σε μία διαδικασία καθαρισμού (κατακρήμνιση) είναι σχεδιασμένα για να απελευθερώνουν και να συγκεντρώνουν την επιθυμητή πρωτεΐνη. Επίσης για να απομακρύνουν μη επιθυμητές επιμολύνσεις όπως λιπίδια ή άλλες ουσίες οι οποίες μπορεί μετέπειτα να οδηγήσουν σε παρεμπόδιση σε ένα επόμενο στάδιο υψηλού καθαρισμού. Ο βαθμός καθαρισμού που επιτυγχάνεται από αυτές τις πρωταρχικές τεχνικές είναι πολύ συχνά οριακός. Μολονότι, τέτοια αρχικά στάδια μπορούν να αποφέρουν ένα υψηλό ποσοστό ανάκτησης της επιθυμητής πρωτεΐνης απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός πρωτεΐνης, ο οποίος μπορεί να επιτευχθεί με χρωματογραφία στήλης (Ιωάννης Κλώνης 1997, Gary Walsh, 2002).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25 (10-30 KDa) *(παρ. 2.3.2)*. Το υλικό αυτό της χρωματογραφίας είναι ένα πολυμερές δεξτράνης στο οποίο έχουν δημιουργηθεί γέφυρες γλυκερόλης ύστερα από επίδραση επιχλωριδίνης. Ως υγρή κινητή φάση στήλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών pH 6,5. Στις στήλες φορτώθηκαν 500 μl από τα δείγματα (ιζήματα από κατακρήμνιση με 30% και 80% ποσοστό αλατότητας) και εκλούσθηκαν 30 κλάσματα (F1-F30) των 300 μl σε σωλήνες τύπου eppendorf. Όλη η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στους 4 ^{o}C. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων (Power Wave XS2, BioTek Inc,

USA) και έγινε ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο “διάχυση σε πηγάδι από άγαρ” με μικροοργανισμό δείκτη τον *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Χρησιμοποιήθηκαν 6 μl από κάθε κλάσμα τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 40 μl με PBS pH 6,5. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμίδης.

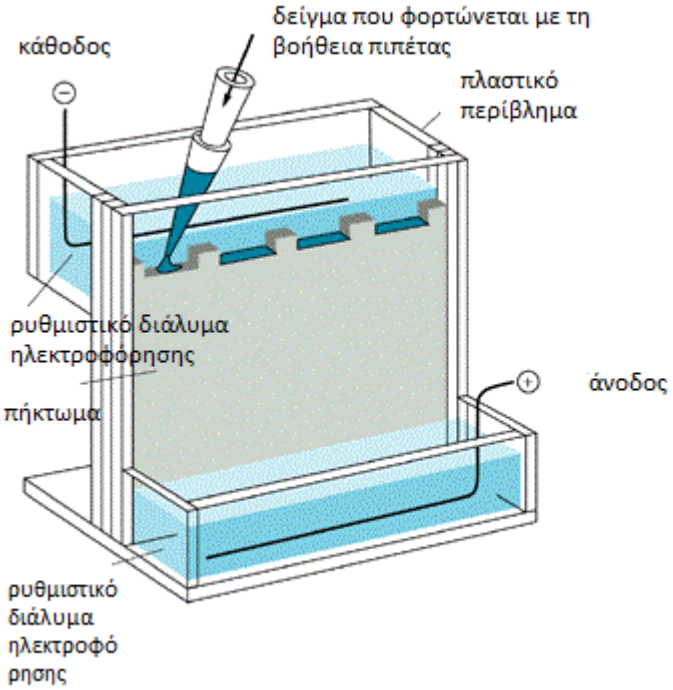
Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli (1970) το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σχηματίζεται με το συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου και N, N’-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου, όπου όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Παρουσία SDS η κινητικότητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος, με τις πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους να κινούνται γρηγορότερα διαμέσου των πόρων από την κάθοδο προς την άνοδο. Η εύρεση του μοριακού βάρους των αγνώστων πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση δεικτών μοριακής μάζας και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητας τους στο πήκτωμα, καθώς η μετακίνηση των πρωτεϊνών προς την άνοδο σε ένα πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας.

Προετοιμασία του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel) 16% σε μονομερές ακρυλαμίδιο και 0,375 M ως προς Tris-HCl, pH 8,8.

Αναμίχθηκαν 5,3 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου/ N, N’-μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου *(παρ. 2.3.12)* με 2,5 ml διαλύματος 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 *(παρ. 2.3.14),* 0,1 ml διαλύματος SDS 10% (w/v) *(παρ. 2.3.15)* και 2,05 ml νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,05 ml διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w/v) *(παρ. 2.3.17)* και 5 μl TEMED *(παρ. 2.3.18).* Έπειτα, το διάλυμα μονομερούς τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες, καλύφθηκε με μία στοιβάδα ισοβουτανόλης κορεσμένη σε νερό και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να πολυμεριστεί για 45 λεπτά. Μετά το πέρας των 45 λεπτών, απομακρύνθηκε η ισοβουτανόλη και η επιφάνεια εκπλύθηκε με νερό. Μετά την απομάκρυνση του νερού προστέθηκε το πήκτωμα επιστοίβασης.

Προετοιμασία του πηκτώματος συσσώρευσης/επιστοίβασης (stacking gel) 4% σε μονομερές ακρυλαμίδιο και 0,125 M ως προς Tris-HCl, pH 6,8.

Αναμίχθηκαν 1,33 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου/N, N'- μεθυλενο-δις ακρυλαμιδίου *(παρ. 2.3.12)* με 2,5 ml διαλύματος 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 *(παρ. 2.3.13)*, 0,1 ml διαλύματος SDS 10% (w/v) *(παρ. 2.3.15)* και 6,01 ml νερού. Κατόπιν προστέθηκαν 0,05 ml διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w/v) *(παρ. 2.3.17)* και 5 μl TEMED *(παρ. 2.3.18)*. Αμέσως το διάλυμα τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, αφού πρώτα είχε τοποθετηθεί η ειδική κτένα, όπου και παρέμεινε για 45 λεπτά έτσι, ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός. Στη συνέχεια, η κτένα απομακρύνθηκε και οι διακριτές πλέον θέσεις τοποθέτησης δείγματος εκπλύθηκαν με νερό.



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Τα διαλύματα που είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό, ο 'εκκινητής' (APS) και ο 'καταλύτης' (TEMED), τοποθετήθηκαν στα διαλύματα για την παρασκευή των πηκτωμάτων, λίγο πριν αυτά τοποθετηθούν στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμίχθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος σε αναλογία 1:4 και έπειτα υπέστησαν θερμική επεξεργασία στους

95 ^{o}C για 4 λεπτά. Αντίστοιχη επεξεργασία θέρμανσης υπέστησαν και τα διαλύματα των δεικτών μοριακής μάζας, τα όποια ήταν ήδη αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και τοποθετούνταν, ως είχαν, στο πήκτωμα. Στη συνέχεια, τόσο τα δείγματα, όσο και οι δείκτες μοριακής μάζας (15 μl) *(παρ. 2.3.20 & 2.3.21)* τοποθετήθηκαν στις θέσεις του πηκτώματος. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης *(παρ. 2.3.23)* υπό σταθερή τάση 200 V.

Επεξεργασία πηκτώματος μετά την ηλεκτροφόρηση

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η περιοχή του πηκτώματος όπου έγινε ο διαχωρισμός των δεικτών μοριακής μάζας, αποκόπηκε και έγινε ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση Coomasie Brilliant Blue R-250, όπως περιγράφεται παρακάτω (*παρ. 2.17.4*).
- Επιπλέον, το τμήμα του πηκτώματος το οποίο προοριζόταν για ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης, κόπηκε σε κάθετες λωρίδες (ύψους ~ 5 mm και μήκους ~ 5 mm) και εκπλύθηκε για 3 ώρες με απεσταγμένο νερό. Μετά το πέρας των 3 ωρών, οι λωρίδες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (90 mm) και καλύφθηκαν με 16 ml στερεού θρεπτικού υποστρώματος MRS, εμβολιασμένο με 252 μl κυτταρικού εναιωρήματος του μικροοργανισμού δείκτη. Τα τρυβλία παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τον πλήρη πολυμερισμό του θρεπτικού υποστρώματος και στη συνέχεια επωάστηκαν αναερόβια, στους 37 ^{o}C για 12-16 ώρες.

Β) Καθαρισμός πρωτεϊνικού μορίου με υγρή χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25 και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native-PAGE)

Στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στο πήκτωμα καθώς και η κινητικότητα τους εξαρτάται από το φορτίο, το μοριακό βάρος αλλά και το σχήμα των πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της διατήρησης της φυσικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών είναι και η διατήρηση της βιολογικής τους δραστικότητας. Το γεγονός αυτό δίνει στην τεχνική αυτή, ένα πλεονέκτημα χρήσης της ως παρασκευαστική τεχνική για την απομόνωση πρωτεϊνών μέσω εκχύλισης τους. Η δυσκολία εύρεσης μοριακού βάρους των υπό εξέτση πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη τεχνική θεωρείται ότι αντιμετωπίζεται με την παρουσία του αντιδραστηρίου CHAPS, η οποία προσδίδει γραμμικότητα του λογαρίθμου της

μοριακής μάζας και της σχετικής κινητικότητας των πρωτεϊνών πάνω στο πήκτωμα (Davis 1964, Ornstein 1964).

Στην παρούσα εργασία τα κλάσματα που έδωσαν αντιμικροβιακή δράση στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-25, λυοφιλιοποιήθηκαν και στη συνέχεια, αφού αναδιαλύθηκαν σε 20 μl PBS pH 6,5, έγινε δοκιμή για ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» με μικροοργανισμό δείκτη το *L. delbrueckii* DSMZ 20081 και προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford με τη χρήση 1/10 αραίωσης αυτών. Μετά τη λυοφιλιοποίηση το κλάσμα που διατήρησε την αντιμικροβιακή δράση και και περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης απουσία μετουσιωτικών παργόντων.

Η συγκέντρωση του μονομερούς ακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού ήταν 16% και χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακής μάζας 10-230 KDa. Η διαδικασία προετοιμασίας των πηκτωμάτων επιστοίβασης και διαχωρισμού ήταν ίδια με αυτήν της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες, χωρίς την προσθήκη μετουσιωτικών παραγόντων.

Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων

Τα δείγματα αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 με το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος *(2.3.27)* και τοποθετήθηκαν στο πήκτωμα στις ειδικές θέσεις τοποθέτησης τους. Από το διάλυμα δεικτών μοριακής μάζας, στο οποίο είχε προστεθεί διάλυμα CHAPS 8 mM *(παρ. 2.3.25)*, φορτώθηκαν στο πήκτωμα 15 μl. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 200 V παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης *παρ. 2.3.28)*.

Επεξεργασία πηκτώματος μετά την ηλεκτροφόρηση

- Μετά την ηλεκτροφόρηση, το κομμάτι του πηκτώματος το οποίο προοριζόταν για υπολογισμό μοριακού βάρους αποκόπηκε και υπέστη διαδικασία χρώσης με χρώση νιτρικού αργύρου, όπως περιγράφεται παρακάτω *(παρ. 2.17.5)*.
- Το τμήμα του πηκτώματος το οποίο προοριζόταν για ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης, κόπηκε σε κάθετες λωρίδες (ύψους ~ 5 mm και

μήκους ~ 5 mm), εκπλύθηκε για 3 ώρες σε απεσταγμένο νερό και έπειτα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν της SDS-PAGE.

- Το υπόλοιπο πήκτωμα, το οποίο προοριζόταν για την απομόνωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, αποκόπηκε και εκπλύθηκε για 3 ώρες σε απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια κόπηκε σε οριζόντιες λωρίδες των 3 mm, στην περιοχή των θέσεων που τοποθετήθηκαν τα δείγματα και κάθε οριζόντια λωρίδα που προέκυπτε, τοποθετούνταν σε σωλήνα τύπου eppendorf. Ακολούθησε, η προσθήκη 0,5 ml διαλύματος φωσφορικών pH 6,5 (PBS) *(παρ.2.3.11)*, τεμαχισμός με ράβδο και με σύριγγα του 1 ml (G 21 1/2) και επώαση στους 4 ^{o}C για 24 ώρες, ώστε να γίνει η εκχύλιση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα. Μετά τις 24 ώρες τα εκχυλισμένα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1.000 x *g* για 10 λεπτά και στα υπερκείμενα της εκχύλισης έγινε προσδιορισμός της πρωτεΐνης κατά Bradford και δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο "διάχυση σε πηγάδι από άγαρ" με μικροοργανισμό δείκτη τον *L. delbrueckii* DSMZ 20081.

Γ) Καθαρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας με χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G- 100 και ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G-100 *(παρ. 2.3.3)* αποτελεί ένα υλικό χρωματογραφίας το οποίο επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών από 40 KDa μέχρι 150 KDa.

Στη συγκεκριμένη επεξεργασία υπεβλήθη μόνο το ίζημα από την κατακρήμνιση με 80% συγκέντρωση θειικού αμμωνίου. Ως υγρή κινητή φάση στήλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών pH 6,5. Στη στήλη φορτώθηκαν 500 μl από το δείγμα και εκλούσθηκαν 30 κλάσματα (F1-F30) των 300 μl σε σωλήνες τύπου eppendorf. Όλη η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στους 4 ^{o}C. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση της απορρόφησης των κλασμάτων στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων (Power Wave XS2, BioTek Inc, USA) και δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» με μικροοργανισμό δεικτη το *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Τα κλάσματα που δώσανε αντιμικροβιακή δράση λυοφιλιοποιήθηκαν και αναδιαλύθηκαν σε 10 μl PBS pH 6,5. Για κάθε κλάσμα δημιουργήθηκε 1/10 αραίωση και από το συγκεκριμένο διάλυμα έγινε δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης, όπως περιγράφεται παραπάνω και προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford.

Τέλος, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μεγέθους 16 cm x 16 cm. Η συγκέντρωση του μονομερούς του ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα διαχωρισμού ήταν 16% και στο πήκτωμα επιστοίβασης 4%. Το πήκτωμα έτρεξε υπό σταθερή τάση στα 200 Volts για 6 ώρες. Κατόπιν έγινε χρώση του πηκτώματος για την οπτικοποίηση των ζωνών με νιτρικό άργυρο, ενώ το μισό πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης, όπως αυτή έχει περιγραφεί στα προηγούμενα πρωτόκολλα.

Δ) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες με διαβάθμιση 10-20% (gradient native-PAGE)

Θεωρητικά, υπάρχει μία συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που είναι η βέλτιστη για το διαχωρισμό ενός δεδομένου ζεύγους πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά είναι δύσκολο να βρεθεί μία μοναδική συγκέντρωση πηκτώματος που θα δώσει έναν υψηλού βαθμού διαχωρισμό ενός αγνώστου και πολύπλοκου πρωτεϊνικού μίγματος. Ως εκ τούτου, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται πηκτώματα με διαβάθμιση συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου, κατά τα οποία οι πρωτεΐνες κινούνται διαμέσου πόρων με σταδιακά μικρότερο μέγεθος μέχρις ότου φτάσουν στο πιο ικανοποιητικό για το δικό τους μοριακό μέγεθος. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορούν να διαχωριστούν παράλληλα πρωτεϊνικά μόρια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους (Chiou and Wu, 1999). Η δημιουργία της διαβάθμισης στο πήκτωμα διαχωρισμού έγινε με την κατασκευή δύο διαλυμάτων, ίσου όγκου, με διαφορετικές συγκεντρώσεις μονομερούς ακρυλαμιδίου, ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν παράλληλα στη συσκευή διαβάθμισης (Gradient former Model 385, Biolab), η οποία συνδεόταν με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου και τελικά κατέληγαν τα διαλύματα, σχηματίζοντας μία διαβάθμιση συγκέντρωσης μονομερούς ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Λόγω της δοκιμαστικής χρήσης αυτής της ηλεκτροφόρησης, φορτώθηκαν μόνο τα αρχικά ιζήματα από τις κατακρημνίσεις με 30% και 80% ποσοστό αλατότητας που έδωσαν αντιμικροβιακή δράση. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν ίδιες με αυτές των προηγούμενων ηλεκτροφορήσεων, με το ασυνεχές πήκτωμα να τρέχει υπό σταθερή τάση στα 200 Volts. Όπως και στις προηγούμενες ηλεκτροφορήσεις, σε ένα

μέρος του πηκτώματος έγινε χρώση με νιτρικό άργυρο και το άλλο μισό αξιοποιήθηκε για ανίχνευση των ζωνών των πρωτεϊνών.

Ε) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες με διαβάθμιση 4-12% (gradient native-PAGE)

Στη συγκεκριμένη δοκιμή έγινε προσπάθεια για εκχύλιση της επιθυμητής πρωτεΐνης με απώτερο σκοπό την μετέπειτα ηλεκτροφόρηση της σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των πρωτεϊνικών υπομονάδων. Η χρήση της συγκεκριμένης διαβάθμισης έγινε διότι με αυτόν τον τρόπο γίνεται καλύτερος διαχωρισμός στις πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους και χάνονται οι μικρότερου μοριακού βάρους.

Συγκεκριμένα, το πήκτωμα έτρεξε υπό σταθερή τάση στα 200 Volts. Ακολούθησε χρώση σε ένα μέρος του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο, ενώ ένα άλλο μέρος του πηκτώματος κόπηκε σε οριζόντιες λωρίδες των 3 mm προκειμένου να γίνει η εκχύλιση της πρωτεΐνης όπως περιγράφθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ένα τρίτο μέρος κόπηκε σε κάθετες λωρίδες για ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης. Το μέρος του πηκτώματος που προοριζόταν για εκχύλιση της πρωτεΐνης προέκυψε από την ένωση 6 πηγαδιών του πηκτώματος. Στα 14 εκχυλίσματα που προέκυψαν (η αρίθμηση τους ξεκινά από το πάνω μέρος του πηκτώματος προς τα κάτω) έγινε δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» με μικροοργανισμό δείκτη το *L. delbrueckii* DSMZ 20081 και προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford.

2.16.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση Coomasie Brilliant Blue R-250

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η όξινη χρωστική δεσμεύεται στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον, το οποίο συντελεί στην ενίσχυση της αλληλεπίδρασης της χρωστικής με τις πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρώσης έχει κατώτατο όριο ανίχνευσης 0,5 μg πρωτεΐνης (Walsh, 2002).

Το πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε το διάλυμα χρωστικής *(παρ. 2.3.30)* και παρέμεινε εκεί υπό συνεχή ανάδευση για 30-45

λεπτά. Ακολούθησαν διαδοχικές εκπλύσεις με το διάλυμα αποχρωματισμού *(παρ. 2.3.31)*, έως ότου η χρωστική απομακρύνθηκε από το φόντο του πηκτώματος. Τέλος, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στο διάλυμα συντήρησης *(παρ. 2.3.32)* για προσωρινή φύλαξη.

2.16.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρώσης χρησιμοποιεί δύο πλεονεκτήματα του θειοθειϊκού: την ενίσχυση της εικόνας μέσω προεπεξεργασίας μονιμοποιημένων πηκτωμάτων και την αποφυγή ανάδειξης μη ειδικού υποβάθρου κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει μέχρι και 50 ng πρωτεΐνης (Walsh, 2002).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την απομάκρυνση του πηκτώματος επιστοίβασης, το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε σε έναν μεγάλο όγκο διαλύματος μονιμοποίησης *(παρ. 2.3.33)* για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 50% *(παρ. 2.3.37)* από δύο φορές για 20 λεπτά και μία τελευταία σε διάλυμα 30% αιθανόλης *(παρ. 2.3.37)* για επιπλέον 20 λεπτά. Ακολούθησε η καταβύθιση του πηκτώματος για ένα λεπτό σε διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου *(παρ. 2.3.34)* και έκπλυση με απεσταγμένο νερό τρεις φορές για 20 δευτερόλεπτα. Εν συνεχεία, το πήκτωμα καταβυθίστηκε για 20 λεπτά στο διάλυμα νιτρικού αργύρου *(παρ. 2.3.35)* και κατόπιν έγινε έκπλυση δύο φορές με απεσταγμένο νερό για 20 δευτερόλεπτα για την απομάκρυνση του νιτρικού αργύρου. Τελευταίο βήμα αυτής της μεθόδου, ήταν η παρατήρηση των ζωνών με την επώαση του πηκτώματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στο διάλυμα ανάπτυξης *(παρ. 2.3.36)*. Για προσωρινή αποθήκευση το πήκτωμα φυλάχθηκε στο διάλυμα μονιμοποίησης πηκτώματος *(παρ. 2.3.33)* στους 4 ^{o}C.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Αντιμικροβιακή δράση των απομονωθέντων βακτηρίων

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από βακτήρια απομονωμένα από το εντερικό μικροβιακό φορτίο υγιών νεογνών, με έμφαση στην παραγωγή βακτηριοσινών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 50 βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Lactobacillus* και 22 του γένους *Bifidobacterium* από τον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό υγιών τελειόμηνων νεογνών. Οι απομονώσεις των βακτηρίων αυτών έγιναν στα πλαίσια προηγούμενης Διπλωματικής Εργασίας που έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών (Μήτσου, 2005). Το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων υπεβλήθη σε δοκιμή αντιμικροβιακής δράσης με δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ με απώτερο στόχο την εύρεση στελεχών υποψήφιων για παραγωγή βακτηριοσίνης.

Α) Γένος *Lactobacillus*

Οι 50 βακτηριακές απομονώσεις εξετάσθηκαν ως προς την ικανότητα αντιμικροβιακής δράσης έναντι των 10 μικροοργανισμών δεικτών: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* CIP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689, με δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ: «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ». Ως αρνητικός μάρτυρας και στις δύο μεθόδους χρησιμοποιήθηκε μη εμβολιασμένο με στέλεχος *Lactobacillus,* θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Τα αποτελέσματα του αντιμικροβιακού φάσματος δράσης των 50 στελεχών *Lactobacillus* spp. προβάλλονται στους Πίνακες 3.1 & 3.2.

Από την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αντιμικροβιακής δράσης φαίνεται πως εμφανίζεται έντονη και ποικίλη αντιμικροβιακή δράση με τη μέθοδο «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ», ενώ με τη δεύτερη μέθοδο δεν επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της πρώτης.

Πίνακας 3.1: Αντιμικροβιακή δράση του συνόλου των βακτηριακών απομονώσεων του γένους *Lactobacillus* για τους μικροοργανισμούς δείκτες: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* CIP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 και *Listeria monocytogenes* DSM 12464. Με το νούμερο '1' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και με το νούμερο '2' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».

Στελέχη	**Ζώνες αναστολής (mm)**									
	E. hirae		***E. faecalis***		***S. aureus* ATCC 6538**		***S. aureus* ATCC 25923**		***L. monocytogenes***	
	1	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
AnLb 1	9	–	9	–	–	–	9	–	7	–
AnLb 2	–	–	–	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 3	9	–	9	–	–	–	9	–	7	–
AnLb 4	9	–	9	–	–	–	9	–	–	–
AnLb 5	–	–	9	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 9	9	–	9	–	9	–	11	–	–	–
AnLb 10	9	–	9	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 11	–	–	–	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 13	9	–	9	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 14	–	–	-	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 15	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 16	9	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 17	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 18	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 19	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 20	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 23	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 24	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 25	9	–	9	–	9	–	9	–	9	–
AnLb 26	9	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 28	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 31	9	–	9	–	9	–	9	–	9	–
AnLb 32	9	–	9	–	9	–	9	–	11	–
AnLb 33	–	–	9	–	–	–	–	–	11	–

(Συνέχεια Πίνακα 3.1)

AnLb 34	9	–	11	–	9	–	9	–	7	–
AnLb 35	9	–	11	–	9	–	9	–	-	–
AnLb 36	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 37	9	–	9	–	9	–	9	–	9	–
AnLb 38	–	–	–	–	9	–	9	–	–	–
AnLb 39	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 40	9	–	11	–	9	–	9	–	7	–
AnLb 41	–	–	–	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 42	9	–	9	–	9	–	9	–	–	–
AnLb 43	–	–	15	–	9	–	–	–	9	–
AnLb 44	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 45	9	–	–	–	–	–	–	–	7	–
AnLb 46	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 7	–	–	–	–	–	–	–	–	11	–
AnLb 48	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 49	9	–	9	–	11	–	9	–	7	–
AnLb 50	9	–	11	–	11	–	9	–	7	–
MRS	–	–	–	–	–	–	–	–	7	7

Πίνακας 3.2: Αντιμικροβιακή δράση του συνόλου των βακτηριακών απομονώσεων του γένους *Lactobacillus* για τους μικροοργανισμούς δείκτες: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689. Με το νούμερο '1' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και με το νούμερο '2' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».

Στελέχη	**Ζώνες αναστολής (mm)**									
	L. delbrueckii		***L. casei***		***L. rhamnosus***		***C. perfringens***		***C. difficile***	
	1	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
AnLb 1	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 2	–	–	–	–	–	–	11	–	–	–
AnLb 3	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 5	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 7	–	–	–	–	–	–	9	–	9	–
AnLb 8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 9	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 10	–	–	9	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 11	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 13	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

AnLb 15	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 16	–	–	–	–	–	–	11	–	–	–
AnLb 17	–	–	–	–	–	–	11	–	–	–
AnLb 18	–	–	9	–	–	–	15	–	9	–
AnLb 19	–	–	9	–	–	–	11	–	–	–
AnLb 20	25	17	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 22	11	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 24	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 31	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 32	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 34	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 38	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 39	9	–	13	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 40	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 41	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 42	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 43	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 44	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AnLb 45	–	–	–	–	–	–	–	–	11	–
AnLb 46	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 47	–	–	9	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 48	9	–	–	–	–	–	9	–	–	–
AnLb 49	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
AnLb 50	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–
MRS	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

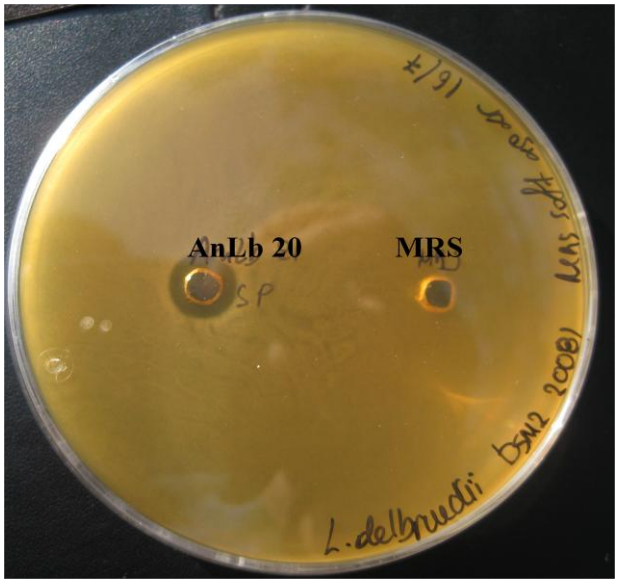
Επιπλέον, η ικανότητα αναστολής της αύξησης του συνόλου των στελεχών φάνηκε να εστιάζεται περισσότερο στα βακτηριακά παθογόνα από ότι στα πρότυπα βακτήρια που αποτελούν συγγενικά είδη με αυτά των υποψήφιων για παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στο στέλεχος *E.hirae*, ανταγωνιστική δράση με την πρώτη μέθοδο εμφάνισε το 38% του συνόλου των

βακτηριακών απομονώσεων, ενώ για τα υπόλοιπα παθογόνα, *E. faecalis*, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes*, *C. difficile* και *C. perfringens* τα ποσοστά ανταγωνιστικής δράσης με την πρώτη μέθοδο ήταν αντίστοιχα 46%, 26%, 15%, 64%, 14% και 40%. Αντίθετα, για όλα τα παθογόνα τα ποσοστά ανταγωνιστικής δράσης με τη δεύτερη μέθοδο «διάχυσης σε άγαρ» ήταν μηδενικά. Σε αντίθεση με την ευαισθησία που εμφάνισαν τα παθογόνα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί δείκτες, τα πρότυπα στελέχη λακτοβακίλλων έδωσαν χαμηλά ποσοστά ανταγωνιστικής δράσης με την πρώτη μέθοδο «διάχυσης σε άγαρ» και μηδενικά με τη δεύτερη. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στο στέλεχος *L. delbrueckii* τα αποτελέσματα ανταγωνιστικής δράσης με την πρώτη μέθοδο αντιπροσώπευαν το 8% του συνόλου των βακτηριακών απομονώσεων *Lactobacillus* spp. ενώ για το *L. casei* το 18%.

Από το σύνολο των μικροοργανισμών δεικτών, μόνο το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* WAV δεν εμφάνισε ευαισθησία σε κανένα από τα υπό εξέταση στελέχη των λακτοβακίλλων. Αντιθέτως, οι περισσότερες ζώνες αναστολής (64%) των στελεχών *Lactobacillus* spp. εμφανίστηκαν έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* DSM 12464. Όμως τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ψευδώς θετικά αποτελέσματα καθώς, αναστολή του μικροοργανισμού προκάλεσε και ο αρνητικός μάρτυρας (θρεπτικό υπόστρωμα MRS) και στις δύο μεθόδους. Η διάμετρος στις ζώνες αναστολής σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε, αφαιρώντας αυτήν της ζώνης του αρνητικού μάρτυρα.

Με βάση τα προκύπτοντα αποτελέσματα, μόνο ένα βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus* spp., το **AnLb 20**, παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση και στις δύο μεθόδους ενάντια στον ίδιο μικροοργανισμό δείκτη, το ***Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081** και αυτό θεωρήθηκε ως υποψήφιο για την παραγωγή βακτηριοσίνης (*Bac*$^{+}$ *στέλεχος*). Το συγκεκριμένο στέλεχος προκάλεσε έντονη αναστολή της αύξησης του μικροοργανισμού δείκτη, δίνοντας τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής και στις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ. Στην πρώτη μέθοδο παρουσίασε μία πολύ μεγάλη διαυγή ζώνη διαμέτρου 2,5 cm, ξεχωρίζοντας το από τα υπόλοιπα στελέχη που εμφάνισαν ζώνη αναστολής, ενώ στην δεύτερη μέθοδο ήταν το μόνο στέλεχος στο οποίο ανιχνεύθηκε αντιμικροβιακή δράση στο υπερκείμενο της καλλιέργειας του (διάμετρος ζώνης αναστολής 17 mm). Το στέλεχος αυτό ήταν εκείνο το οποίο

επιλέχθηκε για περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αντιμικροβιακή δράση οφειλόταν στην παραγωγή βακτηριοσίνης.



Εικόνα 3.1: Αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου του στελέχους AnLb 20 έναντι του μικροοργανισμού *L. delbrueckii* DSMZ 20081 με τη μέθοδο της «διάχυσης σε πηγάδι από άγαρ». Το πηγάδι στο οποίο έγινε έγχυση με MRS αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα αντιμικροβιακής δράσης.

Β) Γένος *Bifidobacterium*

Τα 22 απομονωθέντα βακτήρια *Bifidobacterium* spp. εξετάσθηκαν και αυτά ως προς την ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, με τις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ, ως προς 12 μικροοργανισμούς δείκτες: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* CIP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689. Ως αρνητικός μάρτυρας και στις δύο μεθόδους χρησιμοποιήθηκε μη εμβολιασμένο, με στέλεχος *Bifidobacterium,* θρεπτικό υπόστρωμα mMRS. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα για τις βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Bifidobacterium* ήταν λιγότερο ενθαρρυντικά, με το σύνολο των υποψηφίων στελεχών να εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση, αποκλειστικά και μόνο, ως προς τα βακτήρια του γένους *Clostridium* και μόνο με την πρώτη μέθοδο «διάχυσης σε άγαρ». Συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα που προβάλλονται στον Πίνακα 3.3 το 45,45% των απομονωθέντων βακτηρίων *Bifidobacterium* spp.

εμφάνισαν ανταγωνιστική δράση ενάντια στο *C. difficile* ATCC 9689 και το 59,09% ενάντια στο *C. perfringens*. Με τη χρήση της δεύτερης μεθόδου δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη αναστολής.

Πίνακας 3.3: Αντιμικροβιακή δράση του των βακτηριακών απομονώσεων του γένους *Bifidobacterium* με τις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ για τους μικροοργανισμούς δείκτες: *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689. Με το νούμερο '1' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και με το νούμερο '2' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».

Στελέχη	**Ζώνες αναστολής (mm)**							
	L. monocytogenes		***C. difficile***		***C. perfringens***		***L. rhamnosus***	
	1	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Bif. 3	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 7	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 9	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 12	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 15	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 17a	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 17b	–	–	–	–	7	–	–	–
Bif. 24	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 27	–	–	–	–	7	–	–	–
Bif. 54	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 55a	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 56a	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 56b	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 69a	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 69b	–	–	9	–	9	–	–	–
Bif. 82	–	–	11	–	7	–	–	–
Bif. 85	–	–	–	–	–	–	–	–
Bif. 88	–	–	–	–	7	–	–	–
Bif. B1	–	–	11	–	7	–	–	–
Bif. B7	–	–	7	–	7	–	–	–
Bif. B13	–	–	11	–	7	–	–	–
Bif. B14	–	–	–	–	–	–	–	–
mMRS	–	–	–	–	–	–	–	–

Τέλος, λόγω του ότι η παρατήρηση αντιμικροβιακής δράσης έγινε μόνο με τη μέθοδο της «διάχυσης στην επιφάνεια του άγαρ» και δεν υπήρξε επαλήθευση των αποτελεσμάτων από τη δεύτερη μέθοδο κανένα στέλεχος δε θεωρήθηκε υποψήφιο για την παραγωγή βακτηριοσίνης.

Με βάση τα συγκεκντρωτικά αποτελέσματα που προβάλλονται (Πίνακας 3.4) προκύπτει εμφανής υπεροχή των απομονώσεων του γένους *Lactobacillus* σε σχέση με

αυτά του γένους *Bifidobacterium* Η συνολική αυτή εικόνα των αποτελεσμάτων αναδεικνύει επίσης και το μοναδικό στέλεχος Bac^+ το οποίο αποτέλεσε εργαλείο μελέτης και επεξεργασίας.

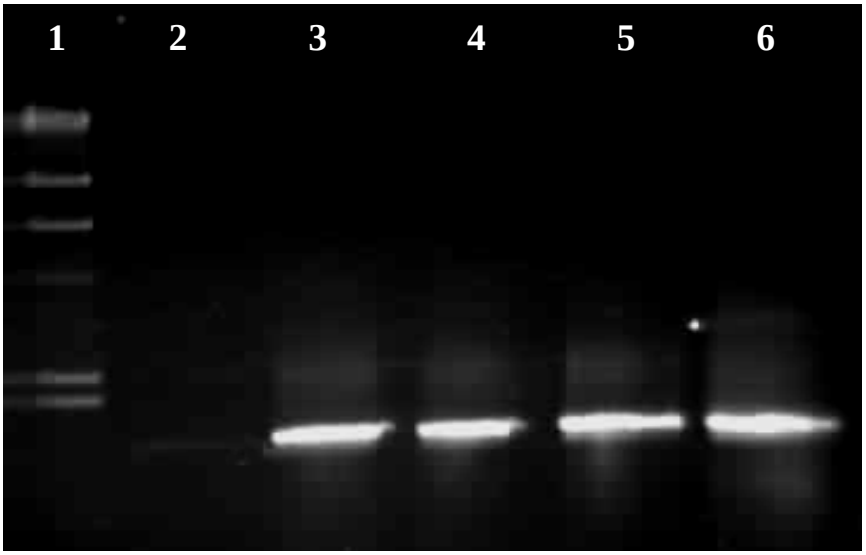
Πίνακας 3.4: Αντιμικροβιακή δράση όλων των βακτηριακών απομονώσεων και με τις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ. Με το νούμερο '1' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και με το νούμερο '2' συμβολίζεται η μέθοδος «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».

Μικροοργανισμοί δείκτες	**Αντιμικροβιακή δράση**			
	***Lactobacillus* spp. (N=50)**		***Bifidobacterium* spp. (N=22)**	
	1	**2**	**1**	**2**
***Enterococcus hirae* CIP 5855**	19	–	–	–
***Enterococcus faecalis* ATCC 51299**	23	–	–	–
***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**	13	–	–	–
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	15	–	–	–
***Listeria monocytogenes* DSM 12464**	32	–	–	–
***Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081**	4	1	–	–
***Lactobacillus casei* DSMZ 20011**	9	–	–	–
***Lactobacillus rhamnosus* WAV**	–	–	–	–
***Clostridium difficile* ATCC 9689**	20	–	10	–
Clostridium perfringens	7	–	13	–
***Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* DSMZ 10140**			–	–
***Bifidobacterium bifidum* DSM 20456**			–	–

3.2 Μοριακή ταυτοποίηση του Bac^+ στελέχους Lactobacillus *spp.*

Από το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων (72) που εξετάσθηκαν ως προς την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών ενάντια σε διάφορους μικροοργανισμούς δείκτες, τελικά μόνο ένα στέλεχος του γένους *Lactobacillus* ήταν αυτό που θεωρήθηκε υποψήφιο για την παραγωγή βακτηριοσίνης (*AnLb 20*). Το στέλεχος αυτό ταυτοποιήθηκε σε επίπεδο είδους μέσω ενίσχυσης της 16S rDNA περιοχής του γονιδίου του, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.9 και 2.10.

Η απεικόνιση των ζωνών των ενισχυμένων περιοχών υπέδειξε την εξίσου καλή καθαρότητα των γενωμικών DNAs που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο του Chelex-100 και με το Nucleospin Tissue Kit.



Εικόνα 3.2: Ενίσχυση της 16S r DNA αλληλουχίας στα 4 απομονωμένα γενωμικά DNA του στελέχους *Lactobacillus* spp. Διαδρομή: 1. *λ* Hind III ladder, 2. αρνητικός μάρτυρας, 3. ενισχυμένη 16S r DNA περιοχή του γενωμικού DNA μετά από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 3 της κλίμακας McFarland, 4. ενισχυμένη 16S r DNA περιοχή του γενωμικού DNA μετά από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 5 της κλίμακας McFarland, 5. ενισχυμένη 16S r DNA περιοχή του γενωμικού DNA μετά από εκχύλιση με Chelex-100 κυτταρικού εναιωρήματος πυκνότητας ίσης με την τιμή 7 της κλίμακας McFarland, 6. ενισχυμένη 16S r DNA περιοχή του γενωμικού DNA μετά από εκχύλιση με τη χρήση του Nucleospin Tissue Kit.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του ενισχυμένου DNA και η σύγκριση της (~ 1400 βάσεις) με όλες τις αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στις τράπεζες δεδομένων υπέδειξαν μέγιστη ομολογία 99,8% με *Lactobacillus gasseri*.

3.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής ουσίας

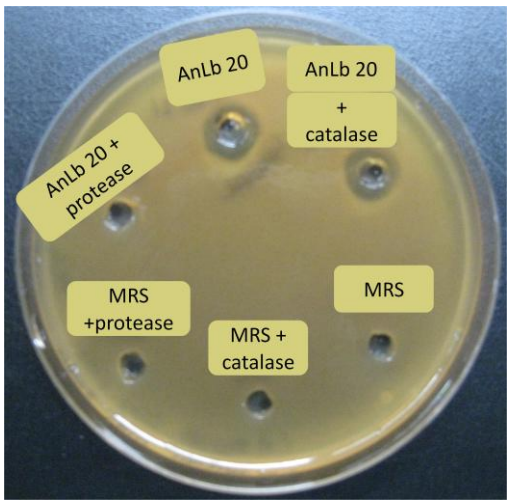
3.3.1 Επίδραση με υδρολυτικά ένζυμα και καταλάση στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας

Από την απεικόνιση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.5) της δοκιμής αυτής, η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 2.11.1, φάνηκε πως η επίδραση με πρωτεάση και λιπάση στο υπερκείμενο του στελέχους *L. gasseri* οδήγησαν σε απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης. Η απώλεια της ζώνης αναστολής από την πρωτεάση μαρτυρεί ότι η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται σε πρωτεϊνούχο ένωση. Ωστόσο, η

επίδραση με α-αμυλάση και κατάλαση δεν οδήγησαν σε απώλεια της ζώνης αναστολής. Το θρεπτικό υπόστρωμα MRS δεν παρουσίασε ανταγωνιστική δράση έναντι του μικροοργανισμού δείκτη.

Πίνακας 3.5: Αντιμικροβιακή δράση μετά από επίδραση με υδρολυτικά ένζυμα και καταλάση στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του στελέχους *L. gasseri*.

Επιδράσεις	Αντιμικροβιακή δράση
Υπερκείμενο + καταλάση	+
Υπερκείμενο + πρωτεάση	−
Υπερκείμενο + α-αμυλάση	+
Υπερκείμενο + λιπάση	−
Υπερκείμενο + λιπάση + αναστολείς πρωτεασών	−
MRS + καταλάση	−
MRS + πρωτεάση	−
MRS + α-αμυλάση	−
MRS + λιπάση	−
MRS + λιπάση + αναστολείς πρωτεασών	−
MRS	−
Υπερκείμενο	+



Εικόνα 3.3: Αντιμικροβιακή δράση μετά από επίδραση με πρωτεάση και καταλάση στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του στελέχους *L. gasseri* (AnLb 20).

3.3.2 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας

Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δοκιμής (*παρ. 2.11.1* του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι) υπέδειξαν τη διατήρηση της αντιμικροβιακής δράσης του μορίου ακόμα και στις πιο ακραίες τιμές pH (2 & 10) και θερμοκρασίας (121 ^{o}C) με κάπως μειωμένη την ένταση της ζώνης στους 121 ^{o}C (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6: Αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του στελέχους *L. gasseri* υπό την επίδραση διαφόρων τιμών pH και θερμοκρασίας

	Επιδράσεις	Αντιμικροβιακή δράση
Επιδράσεις που έγιναν στο υπερκείμενο του στελέχους του *L. gasseri*	pH 2	+
	pH 4	+
	pH 6	+
	pH 8	+
	pH 10	+
	60 ^{o}C για 30 min	+
	80 ^{o}C για 30 min	+
	100 ^{o}C για 30 min	+
	121 ^{o}C για 15 min	+
	4 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	+
	-20 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	+
	-80 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	+
	Υπερκείμενο χωρίς επίδραση	+
Επιδράσεις που έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (αρνητικός μάρτυρας)	pH 2	−
	pH 4	−
	pH 6	−
	pH 8	−
	pH 10	−
	60 ^{o}C για 30 min	−
	80 ^{o}C για 30 min	−
	100 ^{o}C για 30 min	−
	121 ^{o}C για 15 min	−
	4 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	−
	-20 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	−
	-80 ^{o}C για 1, 2, 7 & 30 ημέρες	−
	MRS χωρίς επίδραση	−

3.3.3 Επίδραση διαφόρων αντιδραστηρίων στη δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας *(παρ. 2.11.2 του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι)*

Πίνακας 3.7: Αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του στελέχους *L. gasseri* μετά από επώαση αυτού παρουσία διαφόρων αντιδραστηρίων.

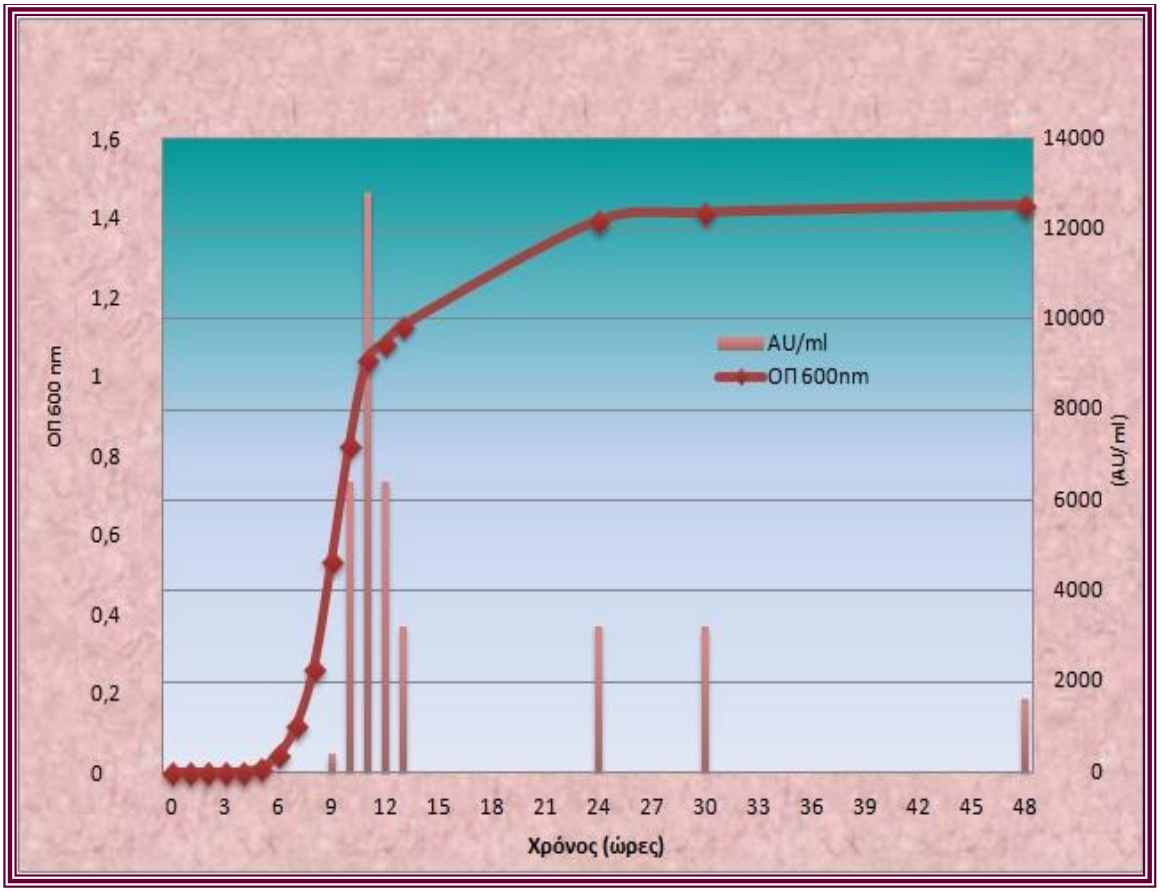
Δοκιμές	Αντιμικροβιακή δράση
Υπερκείμενο + Tween® 20	+
Υπερκείμενο + Tween® 80	+
Υπερκείμενο + Triton – X	+
Υπερκείμενο + SDS	+
Υπερκείμενο + EDTA	+
Υπερκείμενο + NaCl	+
MRS + Tween® 20	−
MRS + Tween® 80	−
MRS + Triton – X	−
MRS + SDS	−
MRS + EDTA	−
MRS + NaCl	−
MRS	−
Υπερκείμενο	+

Από τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης φάνηκε πως η δραστικότητα της αντιμικροβιακής ουσίας δεν επηρεάζεται παρουσία των διαφόρων αντιδραστηρίων, τα οποία ενδεχομένως να μπορούσαν να αποτελούν παρεμποδιστές της δράσης της. Ο αρνητικός μάρτυρας έδωσε τα αναμενόμενα αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού δείκτη.

3.4 Μελέτη του κλειστού κύκλου αύξησης του Lactobacillus gasseri *και παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας*

Ο *L. gasseri* αυξήθηκε σε υγρή κλειστή καλλιέργεια όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12. Η καμπύλη του κλειστού κύκλου αύξησης απεικονίζεται στην Εικόνα 3.4. Όπως είναι εμφανές, η λανθάνουσα φάση του μικροοργανισμού διήρκησε 4 ώρες (t=0h έως t=4h) κατά τις οποίες η Οπτική Πυκνότητα ήταν μηδενική, ενώ από τη χρονική στιγμή t=4h έως τη t=8,5h διήρκησε η φάση επιτάχυνσης. Ακολούθησε, η εκθετική φάση αύξησης, η οποία διήρκησε από τη χρονική στιγμή t=8,5h μέχρι την t=9,5h. Μεγαλύτερη φάση του κλειστού κύκλου αύξησης του μικροοργανισμού ήταν η φάση επιβράδυνσης, η οποία σύμφωνα με την καμπύλη, δίηρκησε από την t=10h μέχρι την t=30h. Τέλος, η φάση στασιμότητας ξεκίνησε από τη χρονική στιγμή t=30h και συνεχίστηκε μέχρι τη t=48h όπου η Οπτική Πυκνότητα, όπως φαίνεται και από την καμπύλη αύξησης, έφτασε τη μέγιστη τιμή της 1,433.

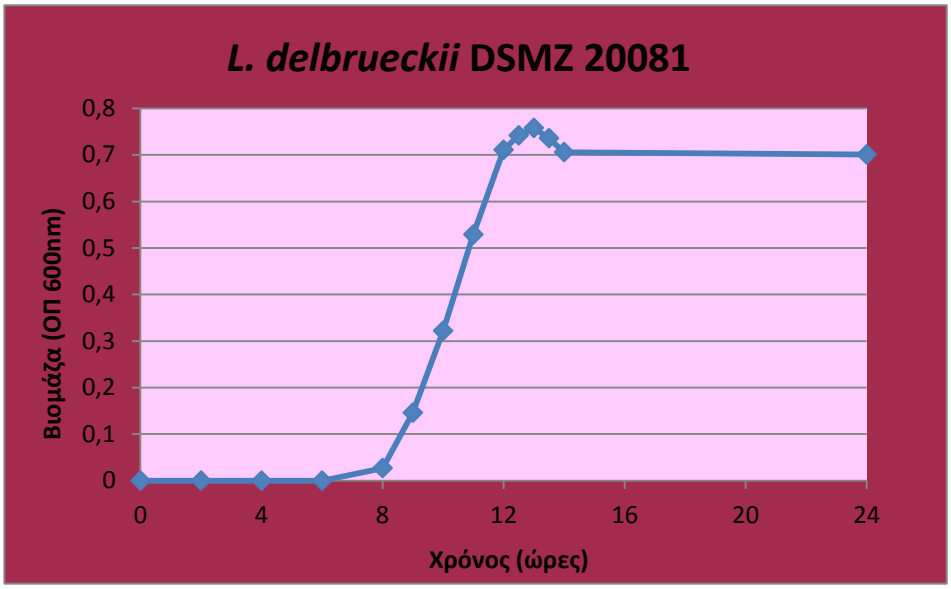
Η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας ξεκίνησε στο τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης του μικροοργανισμού (t=9h, AU/ml=400). Μέσα σε μία ώρα και ενώ είχε ξεκινήσει η φάση επιβράδυνσης η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας αυξήθηκε στα 6.400 AU/ml. Η μέγιστη μονάδα δραστικότητας παρατηρήθηκε στις 11 ώρες επώασης της βακτηριακής καλλιέργειας και υπολογίστηκε στα 12.800 AU/ml. Μετά τη μέγιστη τιμή της μονάδας δραστικότητας της αντιμικροβιακής ουσίας, που παρατηρήθηκε στην αρχή της φάσης επιβράδυνσης, η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας άρχισε να μειώνεται. Συγκεκριμένα, τη χρονική στιγμή t=12h η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας μειώθηκε στο μισό (6.400 AU/ml) και έπειτα στα 3.200 AU/ml (t=13h) όπου και παρέμεινε σε όλη τη φάση επιβράδυνσης του μικροοργανισμού μέχρι τις 48 ώρες επώασης του (φάση στασιμότητας), όπου έπεσε στα 1.600 AU/ml.



Εικόνα 3.4: Καμπύλη κλειστού κύκλου αύξησης του *L. gasseri* με παράλληλο προσδιορισμό της μονάδας δραστικότητας της παραγόμενης αντιμικροβιακής ουσίας εκφρασμένη σε AU/ml υπερκειμένου. Παράμετρος εκτίμησης της βιομάζας ήταν η Οπτική Πυκνότητα.

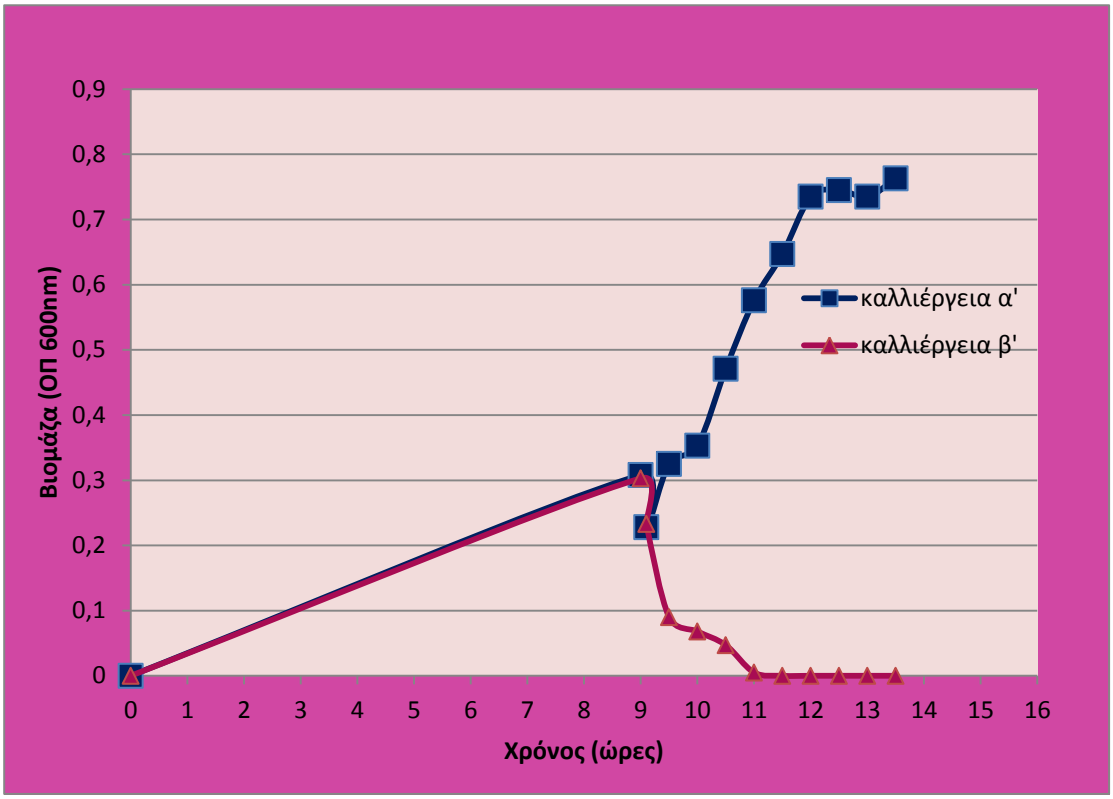
3.5 Προσδιορισμός της δράσης της αντιμικροβιακής ουσίας έναντι του μικροοργανισμού δείκτη Lactobacillus delbrueckii *DSMZ 20081*

Προκειμένου να εκτιμηθεί η δράση της αντιμικροβιακής ουσίας έναντι του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081, προσδιορίστηκε σε κλειστό σύστημα καλλιέργειας η μικροβιακή του αύξηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.13. Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται ο κλειστός κύκλος αύξησης του μικροβιακού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081 στον οποίο παράμετρος εκτίμησης της βιομάζας ήταν η Οπτική Πυκνότητα. Όπως είναι προφανές ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης μετά τις 9,5 ώρες επώασης μέχρι και τη χρονική στιγμή t=10,5h.



Εικόνα 3.5: Καμπύλη κλειστού κύκλου αύξησης του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Παράμετρος προσδιορισμού της βιομάζας ήταν η Οπτική Πυκνότητα στα 600 nm.

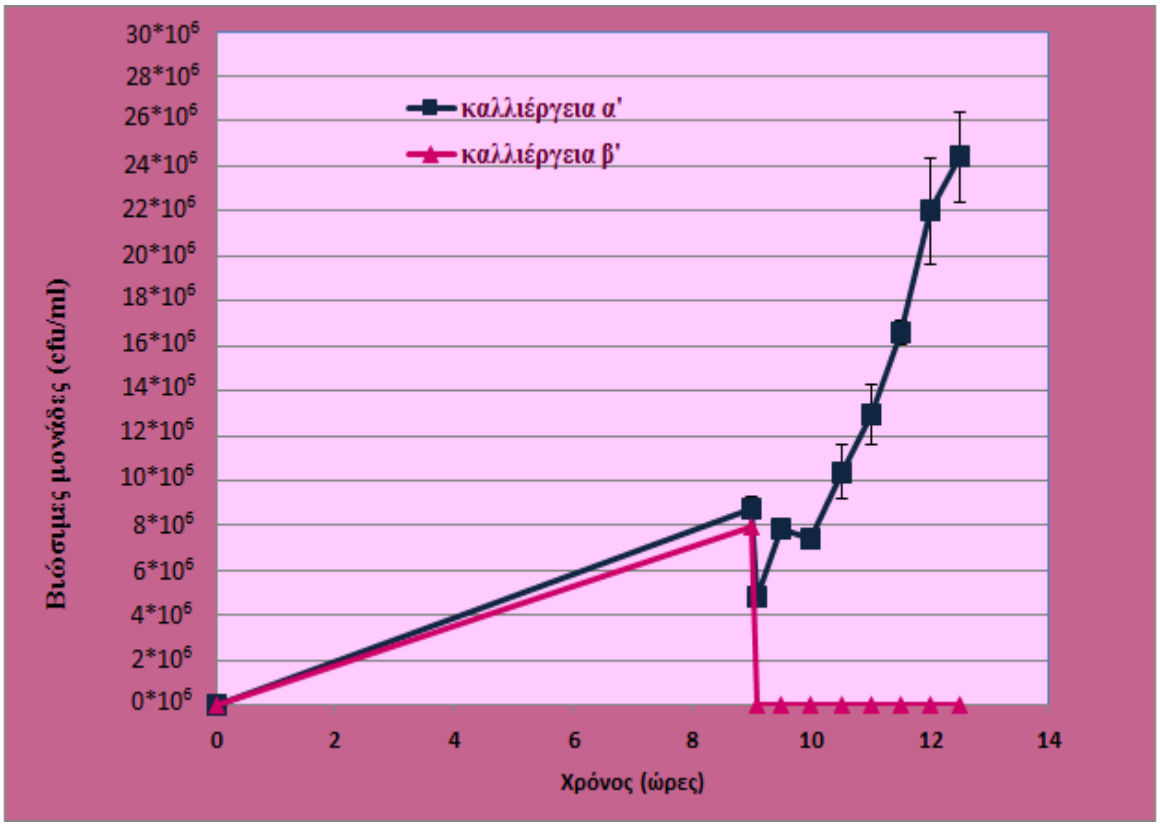
Στη συνέχεια, σε δύο πανομοιότυπα εναιωρήματα καλλιεργειών των 9 ωρών του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081, τα οποία ήταν αντίστοιχων συνθηκών της Εικόνας 3.5, προστέθηκε στη μία, που ονομάστηκε «καλλιέργεια α΄» και αποτελούσε τον μάρτυρα, υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του ίδιου του ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081 και στην άλλη, που ονομάστηκε «καλλιέργεια β΄», υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους *L. gasseri*. Οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες επωάστηκαν αναερόβια, στους 37 ^{o}C. Ακολούθησε εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού με προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βιομάζας και καταμέτρηση των βιώσιμων μονάδων (cfu/ml βακτηριακής καλλιέργειας), όπως αυτά περιγράφονται στις παραγράφους 2.14-Α και 2.14-Β. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στις Εικόνες 3.6 και 3.7. Το υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας του *L. gasseri* προήλθε από καλλιέργεια 11 ωρών του στελέχους καθώς εκεί εμφάνισε τη μέγιστη δραστικότητα η αντιμικροβιακή ουσία (12.800 AU/ml), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.4.



Εικόνα 3.6: Παρουσίαση του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.14-Α του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι». **Καλλιέργεια α΄(μάρτυρας)**: Σε χρόνο t=0 έγινε εμβολιασμός με 100 κύτταρα του ευαίσθητου μικροοργανισμού *L. delbrueckii* DSMZ 20081 (ΟΠ=0). Μετά από 9 ώρες αύξησης η ανωτέρω καλλιέργεια έφτασε την Οπτική Πυκνότητα 0,308. Σε αυτό το σημείο προστέθηκαν 50 ml υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του ίδιου του ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081**.** Στην Εικόνα φαίνεται η μεταβολή της βιομάζας (εκφρασμένη σε μονάδες Οπτικής Πυκνότητας) του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081. **Καλλιέργεια β΄:** Σε χρόνο t=0 έγινε εμβολιασμός με 100 κύτταρα του ευαίσθητου μικροοργανισμού *L. delbrueckii* DSMZ 20081 (ΟΠ=0). Μετά από 9 ώρες αύξησης η ανωτέρω καλλιέργεια έφτασε την Οπτική Πυκνότητα 0,303. Σε αυτό το σημείο προστέθηκαν 50 ml υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους *L. gasseri***.** Στην Εικόνα φαίνεται η μεταβολή της βιομάζας (εκφρασμένη σε μονάδες Οπτικής Πυκνότητας) του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081.

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.6 τα αποτελέσματα της επίδρασης του υπερκειμένου της καλλιέργειας του *L. gasseri* ήταν ιδιαίτερα εμφανή. Οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες πριν την έγχυση βρέθηκαν να έχουν όμοιες τιμές Οπτικής Πυκνότητας ($ΟΠ_{καλ.α΄}$=0,308 και $ΟΠ_{καλ.β΄}$=0,303). Μετά την προσθήκη των 50 ml υπερκειμένου υπήρξε μία αραίωση και στις δύο βακτηριακές καλλιέργειες ($ΟΠ_{καλ.α΄}$=0,228 και $ΟΠ_{καλ.β΄}$=0,233). Από την επόμενη όμως χρονική στιγμή και έπειτα, οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες ακολούθησαν διαφορετικές πορείες. Η καλλιέργεια α΄ (μάρτυρας) από τη χρονική στιγμή t=9,5h παρουσίασε αύξηση της βιομάζας ($ΟΠ_{t=9,1}$=0,228→$ΟΠ_{t=9,5}$=0,325), η οποία συνεχίστηκε κατά τη διάρκεια των

επόμενων ωρών, υποδεικνύοντας ότι ο μικροοργανισμός ακολούθησε κανονικά τον κύκλο αύξησής του, χωρίς να επηρεαστεί, φτάνοντας στα ίδια επίπεδα βιομάζας με αυτά που προβάλλονται στην Εικόνα 3.5 (βλέπε Εικόνα 3.5 σε σύγκριση με Εικόνα 3.6). Αντίθετα, η καλλιέργεια β΄ εμφάνισε απότομη πτωτική τάση της βιομάζας ($ΟΠ_{καλ.β΄,t=13,5}$=0,000). Η καλλιέργεια φαινοτυπικά παρουσίασε μία διαύγαση στο χρώμα της.



Εικόνα 3.7: Παρουσίαση του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.14-Β του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι». **Καλλιέργεια α΄(μάρτυρας)**: Σε χρόνο t=0 έγινε εμβολιασμός με 100 κύτταρα του ευαίσθητου μικροοργανισμού *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Μετά από 9 ώρες αύξησης προστέθηκαν 50 ml υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του ίδιου του ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081**.** Στην Εικόνα φαίνεται η μεταβολή των βιώσιμων μονάδων του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081. **Καλλιέργεια β΄:** Σε χρόνο t=0 έγινε εμβολιασμός με 100 κύτταρα του ευαίσθητου μικροοργανισμού *L. delbrueckii* DSMZ 20081. Μετά από 9 ώρες αύξησης προστέθηκαν 50 ml υπερκειμένου υγρής καλλιέργειας του παραγωγού στελέχους *L. gasseri***.** Στην Εικόνα φαίνεται η μεταβολή βιώσιμων μονάδων του μικροοργανισμού δείκτη *L. delbrueckii* DSMZ 20081.

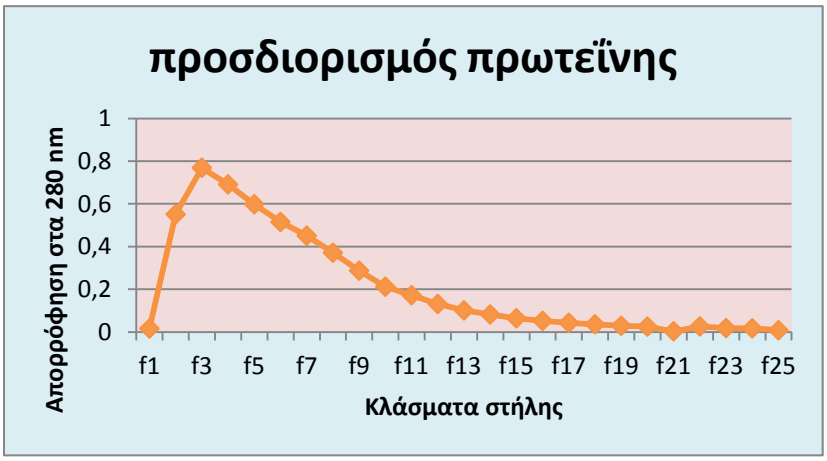
Οι πληθυσμοί που προέκυψαν από την καταμέτρηση των βιώσιμων μονάδων, εκφράστηκαν ως μέση τιμή cfu/ml ± τυπική απόκλιση για όλες τις χρονικές στιγμές και από τις δύο βακτηριακές καλλιέργειες (Εικόνα 3.7). Όπως είναι προφανές, τα αποτελέσματα της καταμέτρησης επιβεβαίωσαν τα δεδομένα της παρατήρησης των

μεταβολών της βιομάζας. Οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες πριν την έγχυση του υπερκειμένου είχαν παρόμοιους πληθυσμούς κυττάρων, με την καλλιέργεια του μάρτυρα να φτάνει τα $8,8*10^6 \pm 5,3*10^5$ (cfu/ml) και την καλλιέργεια β΄ τα $8,0*10^6 \pm 3,2*10^5$ (cfu/ml). Αμέσως μετά την έγχυση, οι πληθυσμοί των δύο καλλιεργειών εμφάνισαν μία σημαντική πτώση, η οποία όμως ήταν πιο μεγάλη στην καλλιέργεια β΄ (157±45 cfu/ml) από ότι στον μάρτυρα ($4,8*10^6 \pm 3,8*10^5$ cfu/ml). Κατόπιν, οι δύο βακτηριακές καλλιέργειες ακολούθησαν τελειώς διαφορετική συμπεριφορά. Στην καλλιέργεια β΄, τον αισθητά μειωμένο πληθυσμό, που παρατηρήθηκε μετά την έγχυση, ακολούθησαν μικρές αυξομειώσεις με την τελική καταμέτρηση του πληθυσμού τη χρονική στιγμή t=12,5h να φτάνει τα 530±135 (cfu/ml) καλλιέργειας. Η τελική αυτή παρατήρηση ανέδειξε μία απώλεια του 99,99% του αρχικού πληθυσμού της καλλιέργειας. Αντίθετα, στην καλλιέργεια του μάρτυρα, μετά την αρχική πτώση του πληθυσμού, η οποία κράτησε 60 λεπτά της ώρας, παρατηρήθηκε άνοδος των τιμών της βιομάζας με έναν εκθετικό ρυθμό έως και την τελική καταμέτρηση του πληθυσμού τη χρονική στιγμή t= 12,5h.

3.6 Χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας

3.6.1 Πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ουσίας

Πρωτόκολλο Α

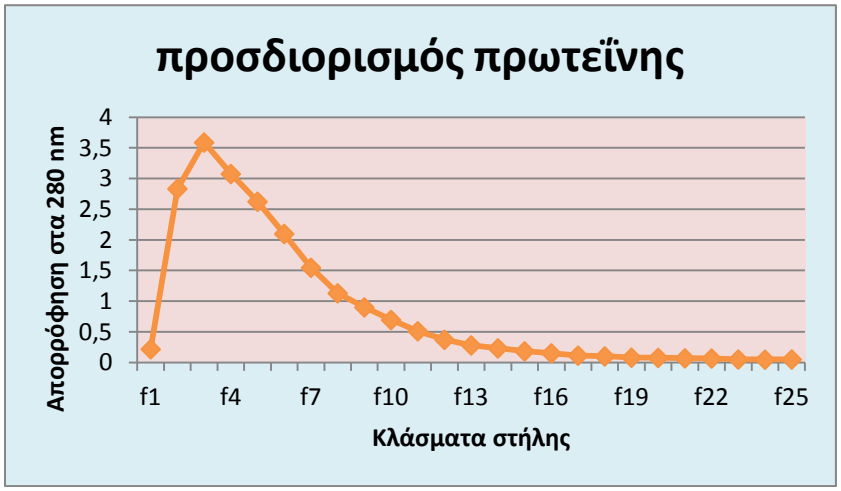


Εικόνα 3.8: Χρωματογράφημα προσδιορισμού πρωτεΐνης στα 280 nm μετά από χρωματογραφία στήλης Sephadex G-25 του ιζήματος από την κατακρήμνιση με 30% θειικό αμμώνιο.

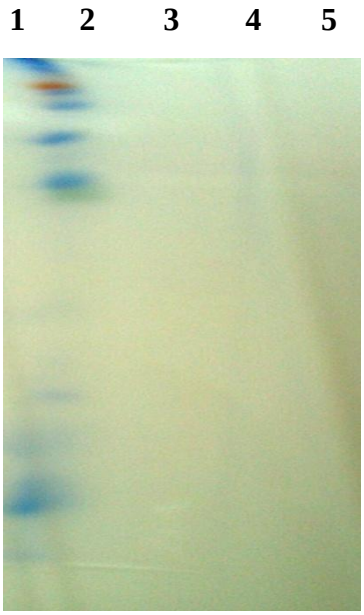
Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των υπερκειμένων και των ιζημάτων που προέκυψαν από την κατακρήμνιση σε 30% και 80% ποσοστό αλατότητας με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» (μέθοδος Β-*παρ.2.7*) και μικροοργανισμό

δείκτη το *L. delbrueckii* DSMZ 20081 ανέδειξαν την παρουσία ζώνης αναστολής μόνο στα δύο ιζήματα (30% και 80%) και όχι στα αντίστοιχα υπερκείμενα τους.

Έγιναν δύο χρωματογραφίες μοριακής διήθησης Sephadex G-25, μία για κάθε ίζημα που προέκυψε από τις κατακρημνίσεις με 30% και 80% θειικό αμμώνιο (Εικ. 3.8 & 3.9).



Εικόνα 3.9: Χρωματογράφημα προσδιορισμού πρωτεΐνης στα 280 nm μετά από χρωματογραφία στήλης Sephadex G-25 του ιζήματος από την κατακρήμνιση με 80% θειικό αμμώνιο.



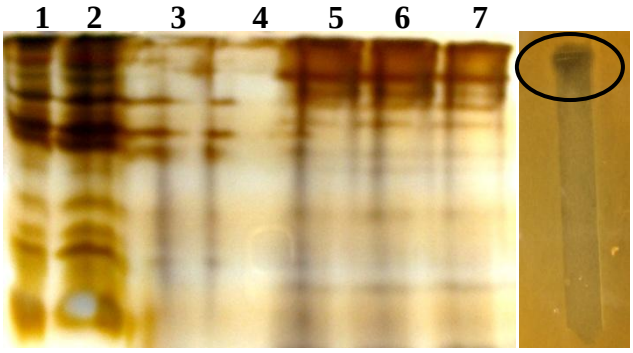
Εικόνα 3.10: Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ιζημάτων από κατακρήμνιση και κλάσματος μετά από στήλη Sephadex G-25. 1. Δείκτης μοριακής μάζας 2,5-20 KDa (10 μl), 2.Κλάσμα 2 από κατακρήμνιση με 30% θειϊκό αμμώνιο, 3. Κλάσμα 2 από κατακρήμνιση 80% (1:4 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 4. Ίζημα 30% (1:4 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 5. Ίζημα 80% (αναλογία 1:4 με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος).

Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δοκιμής με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» (*παρ.2.7-Β*) και μικροοργανισμό δείκτη το *L. delbrueckii* DSMZ 20081 ήταν ίδια και για τις δύο στήλες. Μόνο τα κλάσματα 2, 3, 4 και 5 (F2, F3, F4 & F5)

έδωσαν διαυγή ζώνη αναστολής με το κλάσμα 2 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη ζώνη (4 mm), το 3 κάπως μικρότερη (2 mm), ενώ μόλις 1 mm ήταν η διάμετρος των κλασμάτων 4 και 5. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δεν ανέδειξαν την παρουσία αντιμικροβιακής δράσης γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων στην ηλεκτροφόρηση. Επίσης, μετά από τη χρώση του πηκτώματος δεν ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη σε κανένα δείγμα, πιθανώς λόγω της παρουσίας μικρότερης ποσότητας πρωτεΐνης από αυτή που μπορεί να ανιχνεύσει η συγκεκριμένη χρωστική (Εικόνα 3.10).

Πρωτόκολλο Β

Από τα κλάσματα που προέκυψαν από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης και τη μετέπειτα λυοφιλιοποίηση, τα μόνα που διατήρησαν την ικανότητα αντιμικροβιακής δράσης ήταν τα 2 και 3 και από τις δύο στήλες με το κλάσμα 2 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής. Επίσης, από τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης φάνηκε πως το κλάσμα 2 από την κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης (2,853755 μg/μl) και ήταν αυτό που φορτώθηκε στο πήκτωμα.



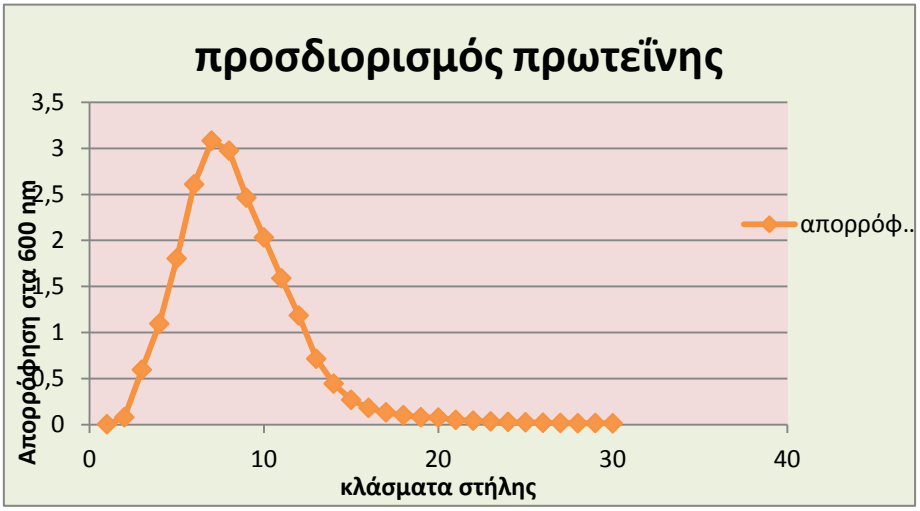
Εικόνα 3.11: *Αριστερά*: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ιζημάτων από κατακρήμνιση και κλάσματος μετά από στήλη Sephadex G-25. 1. Δείκτης μοριακής μάζας 10-230 KDa(20 μl), 2. Δείκτης μοριακής μάζας 10-230 KDa (30 μl), 3. Ίζημα 80% (1:4 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 4. Ίζημα 30% (1:1 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 5. Ίζημα 80% (αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 6. Ίζημα 80% (αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος + CHAPS 8 mM), 7. Κλάσμα 2 από στήλη ιζήματος 80%. *Δεξιά*: αντιμικροβιακή δράση του κλάσματος 2 μετά από κοπή της κάθετης λωρίδας του πηκτώματος στην οποία είχε τρέξει το δείγμα και την επεξεργασία όπως αυτή έχει προαναφερθεί. Την ίδια ακριβώς εικόνα έδωσαν και τα άλλα δείγματα: ίζημα από 30% κατακρήμνιση και ίζημα από 80%.

Το πήκτωμα μετά από τη χρώση έδωσε την παρουσία κοινών ζωνών στα δείγματα, όμως φάνηκε πως τα δείγματα δεν είχαν τρέξει σωστά καθώς οι ζώνες των προτύπων πρωτεϊνών δε διαχωρίστηκαν όσο θα έπρεπε. Η αντιμικροβιακή δράση εμφανίστηκε

ψηλά και έτσι κατέστη αδύνατος ο υπολογισμός του μοριακού βάρους, καθώς οι ζώνες μεγάλου μοριακού βάρους δε διαχωρίστηκαν καλά (Εικόνα 3.11).

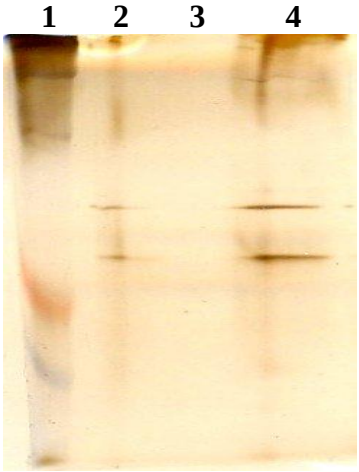
Πρωτόκολλο Γ

Η υπόνοια πως το μόριο της βακτηριοσίνης του *L. gasseri* είναι μεγάλου μοριακού βάρους οδήγησε στη χρήση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Sephadex G-100 (40 KDa - 150 KDa) για τον καθαρισμό του, καθώς θεωρήθηκε πως στην Sephadex G-25 τα κλάσματα που δώσανε αντιμικροβιακή δράση βρίσκονταν στο νεκρό όγκο της στήλης επειδή φέρανε μεγαλύτερο μοριακό βάρος από αυτό που μπορούσαν να δεσμεύσουν οι πόροι του χρωματογραφικού υλικού (10 KDa – 30 KDa) (Εικόνα 3.12). Στη συγκεκριμένη επεξεργασία υπεβλήθη μόνο το ίζημα από την κατακρήμνιση με 80% συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου.



Εικόνα 3.12: Χρωματογράφημα προσδιορισμού πρωτεΐνης στα 280 nm μετά από χρωματογραφία στήλης Sephadex G-100 του ιζήματος από την κατακρήμνιση με 80% θειικό αμμώνιο.

Μόνο τα κλάσματα 2-10 δώσανε αντιμικροβιακή δράση, με τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής να παρουσιάζεται στα κλάσματα 3 και 4 (διάμετρος ζώνης 4 mm), τα οποία δώσανε και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,35 μg/μl και 0,31 μg/μl αντίστοιχα. Όπως παρατηρήθηκε, μετά τη λυοφιλιοποίηση των κλασμάτων, μόνο τα κλάσματα 3 και 4 διατήρησαν την αντιμικροβιακή τους δράση, τα οποία περιείχαν 0,19 μg/μl και 0,16 μg/μl αντίστοιχα.



Εικόνα 3.13: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ιζημάτων από κατακρήμνιση και κλάσματος μετά από στήλη Sephadex G-100. 1. Δείκτης μοριακής μάζας 10-230 KDa (30 μl), 2. Κλάσμα 3 από στήλη ιζήματος 80% (1:4 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος) , 3. Κλάσμα 4 από στήλη ιζήματος 80% (1:4 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 4. Ίζημα 80% (1:1 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος)

Ως αποτέλεσμα αυτής της δοκιμής ήταν η απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης αλλά και ο μη διαχωρισμός των δεικτών μοριακής μάζας κατά τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.13).

Πρωτόκολλο Δ

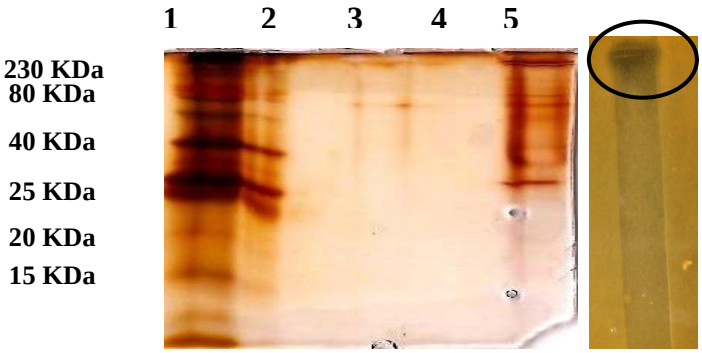
Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της αντιμικροβιακής ουσίας ήταν ανέφικτος λόγω του ότι η αντιμικροβιακή δράση παρατηρήθηκε σε πολύ υψηλά μοριακά βάρη και το ποσοστό διαβάθμισης που χρησιμοποιήθηκε δεν έδωσε τον επιθυμητό διαχωρισμό στις μεγάλου μοριακού βάρους ζώνες πρωτεϊνών.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.14 το ίζημα από την κατακρήμνιση με 30% θειικό αμμώνιο, παρόλο που έδωσε αντιμικροβιακή δράση, δεν ανιχνεύθηκε σε αυτό μετά τη χρώση κάποια ζώνη πρωτεΐνης, πιθανότατα λόγω χαμηλής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Πρωτόκολλο Ε

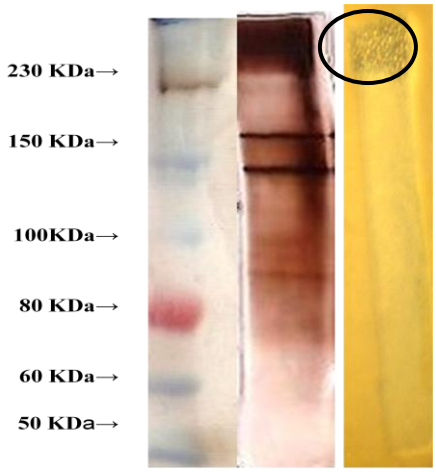
Κανένα από τα υπερκείμενα της εκχύλισης δεν παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση σε αντίθεση με το δείγμα του ιζήματος το οποίο δεν εκχυλίστηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε αυτούσιο (μετά από έκπλυση για 3 ώρες σε απεσταγμένο νερό) για τη δοκιμή της αντιμικροβιακής δράσης. Αντίθετα, ο προσδιορισμός πρωτεΐνης ανέδειξε την παρουσία πρωτεΐνης μόνο στα δύο πρώτα εκχυλίσματα και συγκεκριμένα το πρώτο εκχύλισμα περιείχε 0,19 μg/μl πρωτεΐνης και το δεύτερο 0,16 μg/μl. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι είτε υπήρξε αδυναμία εκχύλισης της

συγκεκριμένης πρωτεΐνης είτε στη διαδικασία της εκχύλισης κάτι να οδήγησε σε απώλεια της βιολογικής δράσης της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.14: *Αριστερά*: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με διαβάθμιση 10-20% των ιζημάτων από 30% και 80% κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο. 1. Δείκτης μοριακής μάζας (30 μl), 2. Κενό, 3. Ίζημα από κατακρήμνιση με 30% θειικό αμμώνιο (1:1 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος), 4. Κενό, 5. Ίζημα από κατακρήμνιση με 80% θειικό αμμώνιο (1:1 αναλογία με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος). *Δεξιά*: αντιμικροβιακή δράση του ιζήματος από κατακρήμνιση με 80% αλατότητας έναντι του ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081 μετά από κοπή της κάθετης λωρίδας του πηκτώματος στην οποία είχε τρέξει το δείγμα και επεξεργασία αυτής. Την ίδια ακριβώς εικόνα αντιμικροβιακής δράσης έδωσε και το ίζημα από κατακρήμνιση με 30% αλατότητα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως αυτά προβάλλονται στην Εικόνα 3.15, η αντιμικροβιακή δράση εμφανίστηκε πολύ ψηλά πάνω στο πήκτωμα και συγκρίνοντας τη ζώνη αναστολής με το δείκτη μοριακής μάζας φαίνεται πως η αντιμικροβαική δράση οφείλεται σε μόριο μοριακού βάρους άνω των 230 KDa. Η ακριβής εύρεση του μοριακού βάρους κατέστη αδύνατη λόγω του ότι στο δείγμα δεν έγινε καλός διαχωρισμός των ζωνών και επομένως δεν ήταν δυνατή η συσχέτιση των μοριακών βαρών με τη σχετική απόσταση των ζωνών. Επίσης, η ηλεκτροφόρηση των εκχυλισμάτων σε πήκτωμα SDS - πολυακρυλαμίδης δεν έλαβε χώρα καθότι δεν υπήρξε παραλαβή της επιθυμητής πρωτεΐνης στα υπερκείμενα των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 3.15: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με διαβάθμιση 4-12%. ***α***: Δείκτης μοριακής μάζας, ***β***: ίζημα από κατακρήμνιση σε 80% συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου, ***γ***: αντιμικροβιακή δράση του ιζήματος από κατακρήμνιση με 80% αλατότητας έναντι του ευαίσθητου στελέχους *L. delbrueckii* DSMZ 20081 μετά από κοπή της κάθετης λωρίδας του πηκτώματος στην οποία είχε τρέξει το δείγμα και επεξεργασία αυτής.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση- Συμπεράσματα

4.1 Ανίχνευση Bac+ στελεχών εντερικού μικροβιακού πληθυσμού

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής, όπως έχει προαναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν 50 βακτηριακές απομονώσεις *Lactobacillus* spp. και 22 *Bifidobacterium* spp. Τα συγκεκριμένα απομονωθέντα βακτήρια εντερικού μικροβιακού συστήματος επελέγησαν καθότι διάφορες επιστημονικές δημοσιεύσεις (Zacharof and Lovitt 2012, Martinez *et al*. 2013) τα προβάλλουν ως τα πλέον υποσχόμενα αυτόχθονα μέλη του εντερικού μικροβιακού φορτίου.

Όλες οι βακτηριακές απομονώσεις εξετάσθηκαν για παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών με τις δύο μεθόδους διάχυσης σε άγαρ, τη «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» και τη «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ». Η επιλογή των βακτηριακών απομονώσεων για παραγωγή βακτηριοσίνης έγινε με τη χρήση δύο μεθόδων με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μιας μεθόδου με τα αποτελέσματα της δεύτερης.

Χρησιμοποιήθηκαν 10 μικροοργανισμοί δείκτες για τα απομονωθέντα βακτήρια *Lactobacillus* spp. και 12 για τα *Bifidobacterium* spp. Η επιλογή των μικροοργανισμών δεικτών έγινε με βάση διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές, ενώ ο λόγος που επελέγησαν μόνο Gram θετικοί δείκτες είναι γιατί έχει φανεί πως οι βακτηριοσίνες δρουν κυρίως έναντι συγγενών ειδών (Todorov *et al*., 2011).

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη φάση των πειραμάτων το πρώτο συμπέρασμα που προκύπτει είναι η διαφορά στη διακριτική ικανότητα των δύο μεθόδων διάχυσης σε άγαρ όσον αφορά στην ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης. Τόσο στην περίπτωση των απομονώσεων *Lactobacillus* spp. όσο και των στελεχών *Bifidobacterium* spp. τα αποτελέσματα ήταν φαινομενικά καλύτερα με τη χρήση της πρώτης μεθόδου διάχυσης σε άγαρ.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στους λακτοβακίλλους από το σύνολο των 50 βακτηριακών απομονώσεων, 41 ήταν εκείνα τα οποία έδωσαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των διαφόρων μικροοργανισμών δεικτών με τη μέθοδο «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» , εντούτοις μόνο ένα έδωσε αντιμικροβιακή δράση και στις δύο μεθόδους έναντι του ίδιου ευαίσθητου στελέχους. Επίσης, όσον αφορά στα απομονωθέντα βακτήρια *Bifidobacterium* spp. τα αποτελέσματα ήταν φαινομενικά καλύτερα με την πρώτη μέθοδο, αν και μόνο δύο μικροοργανισμοί δείκτες εμφάνισαν

ευαισθησία στις συγκεκριμένες βακτηριακές απομονώσεις, ενώ με τη δεύτερη μέθοδο δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη αναστολής. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν και με άλλες ερευνητικές μελέτες από παλαιότερα χρόνια, όπως αυτή των Schillinger και Lucke το 1989. Οι εν λόγω ερευνητές από ένα σύνολο 221 στελεχών του γένους *Lactobacillus* μόνο 19 από αυτά εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση με τη μέθοδο «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ», ενώ από αυτά τα 19 στελέχη μόνο 6 έδωσαν αντιμικροβιακή δράση με τη μέθοδο της «διάχυσης σε πηγάδι από άγαρ» (Schillinger and Lucke, 1989). Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν ο Brandao και οι συνεργάτες τους το 2010, οι οποίοι από ένα σύνολο 224 απομονώσεων του γένους *Enterococcus*, οι 102 παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση με τη μέθοδο «της οδοντογλυφίδας» (παρόμοια με τη μέθοδο «διάχυσης στην επιφάνεια του άγαρ») και από αυτές μόνο οι 22 παρουσίασαν εξωκυτταρική αντιμικροβιακή δράση με τη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ».

Όσον αφορά στα στελέχη των *Bifidobacterium* spp. είναι αποδεδειγμένο και βιβλιογραφικά πως είναι δύσκολη η ανίχνευση της παραγωγής βακτηριοσινών από τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη καθώς υπάρχουν πολυάριθμοι διατροφικοί και βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από τα στελέχη *Bifidobacterium* spp., όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η παρουσία συναγωνιστικών βακτηριακών στελεχών του εντερικού μικροβιακού συστήματος (Martinez *et al*., 2013). Ο Tourez και οι συνεργάτες του το 2003 δημοσίευσαν πως μία συγκαλλιέργεια *L. monocytogenes* και ενός στελέχους *Bifidobacterium* spp. μπορούσε να επάγει την παραγωγή βακτηριοσίνης από το τελευταίο στέλεχος και σε πολλές περιπτώσεις απορρυπαντικά όπως το Tween® 80 μπορούσαν να αυξήσουν τα επίπεδα παραγωγής βακτηριοσίνης. Ο Lee και οι συνεργάτες του το 2008 ανέφεραν πως ένα απομονωμένο από εντερικό σύστημα στέλεχος *Bifidobacterium longum* DJO10A υφίστατο μείωση του μεγέθους του γονιδιώματος του ως απόκριση σε αύξηση σε περιβάλλον καθαρής καλλιέργειας ζύμωσης άνω των 1000 γενεών. Η μείωση αυτή του γονιδιώματος οφειλόταν στην απώλεια του γενετικού τόπου που ήταν υπεύθυνος για την παραγωγή βακτηριοσίνης, όπως επίσης και του γενετικού τόπου που ήταν υπεύθυνος για τον μεταβολισμό ολιγοσακχαριδίων. Η απώλεια της ικανότητας παραγωγής βακτηριοσίνης από την εντερική αυτή απομόνωση οφειλόταν στο γεγονός ότι η αύξηση του γινόταν σε καθαρή καλλιέργεια και όχι παρουσία κάποιου από τα συναγωνιστικά στελέχη του

εντερικού μικροβιακού συστήματος από το οποίο προερχόταν. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα επίπεδα παραγωγής βακτηριοσινών από απομονώσεις *Bifidobacterium* spp. του εντερικού μικροβιακού φορτίου συνήθως είναι χαμηλά (Tourez *et al*., 2003) μπορεί να εξηγήσει γιατί έχουν ταυτοποιηθεί ελάχιστες βακτηριοσίνες από στελέχη του γένους *Bifidobacterium* παρά τις πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες που στοχεύουν σε αυτά (Zinedine and Faid, 2007).

Μολονότι οι δύο μέθοδοι που ακολουθήθηκαν σε αυτήν την εργασία ανιχνεύουν για την ίδια δραστικότητα διαφέρουν σε ένα πολύ σημαντικό παράγοντα. Η «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ» χρησιμοποιεί βακτηριακές καλλιέργειες των υπό εξέταση στελεχών, ενώ η «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» ανιχνεύει την αντιμικροβιακή δράση στο υπερκείμενο της βακτηριακής καλλιέργειας, γεγονός που την καθιστά πιο ευαίσθητη και πιο εξειδικευμένη μέθοδο για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης που οφείλεται σε μόρια βακτηριοσίνης. Είναι αδιαμφισβήτητο το γεγονός πως η παρουσία κυττάρων μπορεί να συντελέσει σε αντιμικροβιακή δράση εξαιτίας άλλων παραγόντων (εκτός της παραγωγής βακτηριοσίνης) του υπό εξέταση στελέχους έναντι κάποιου μικροοργανισμού δείκτη (Brandao *et al*., 2010).

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο το οποίο θα πρέπει να αναφερθεί είναι το μειονέκτημα που παρουσιάζουν οι κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές ανίχνευσης παραγωγής βακτηριοσινών, καθώς διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή της βακτηριοσίνης ή τον φαινότυπο της παραγωγής (Toure *et al*. 2003, Lee *et al*. 2009). Στην παρούσα εργασία, περιορίστηκαν όλοι οι γνωστοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν αντιμικροβιακή δράση πέραν των βακτηριοσίνων. Όπως για παράδειγμα, στη μέθοδο «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» το pH των υπερκειμένων από τις υγρές καλλιέργειες των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών ρυθμίστηκε στο 6,5 προκειμένου να μην ανιχνευθεί αντιμικροβιακή δράση λόγω όξινων συνθηκών. Επίσης, οι συνθήκες επώασης των τρυβλίων με τα υπό εξέταση δείγματα γινόταν υπό αναερόβιες συνθήκες για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αντιμικροβιακής δράσης λόγω υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η τήρηση αυτών των παραμέτρων, τουλάχιστον όσον αφορά στη δεύτερη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, μαρτυρά πως η επικείμενη παρατήρηση της αντιμικροβιακής δράσης οφείλεται σε αντιμικροβιακή ένωση που εκκρίνεται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο (Schillinger and Lucke, 1989). Είναι γεγονός, ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που ενδεχομένως να ρυθμίζουν τόσο την παραγωγή όσο και τη δράση της

αντιμικροβιακής ουσίας. Σύμφωνα με τους Vriezen J.A. και συνεργάτες (2009) οι τεχνικές καλλιέργειας μειονεκτούν από το γεγονός πως η ρύθμιση των βακτηριοσινών επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και υπό την απουσία του κατάλληλου σήματος η παραγωγή της βακτηριοσίνης μπορεί να μην ανιχνευθεί.

Οι περιορισμοί που προέκυψαν από τις τεχνικές καλλιέργειας για τη διαλογή εκείνων των βακτηριακών στελεχών που παράγουν βακτηριοσίνη μπορούν να ξεπεραστούν από εναλλακτικές μοριακές ή γονιδιακές προσεγγίσεις. Σε αυτή την κατεύθυνση της *in silico* επιλογής, μπορεί να βοηθήσει η ολοένα αυξανόμενη διαθεσιμότητα μικροβιακών γονιδιωμάτων καθώς και η ανάπτυξη βιοϋπολογιστικών συστημάτων (de Jong *et al*., 2010). Λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα των μικροοργανισμών της γαστρεντερικής οδού που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν γίνεται αντιληπτό πως τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης και προσεγγίσεις βασισμένες στη λειτουργική μεταγονιδιωματική μπορούν να αποβούν κρίσιμες για την εύρεση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή βακτηριοσίνης από γονιδιώματα μικροβιακών στελεχών του εντερικού μικροβιακού φορτίου που μέχρι πρότινος δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Είναι πολύ πιθανόν, τέτοιου τύπου βακτηριοσίνες να παράγονται εντός της γαστρεντερικής οδού αλλά να μην μπορούν να ανιχνευθούν *in vitro* σε συνθήκες εργαστηρίου (O'Shea *et al*., 2011).

Επίσης, οι υπό εξέταση βακτηριακές απομονώσεις θα μπορούσαν να μελετηθούν για την παραγωγή βακτηριοσίνης σε διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα καθώς έχει αποδειχθεί πως διαφορετικά συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων μπορούν να επάγουν την παραγωγή διαφορετικών μορίων βακτηριοσινών.

Τέλος, από την αρχική επιλογή του συνόλου των 72 βακτηριακών απομονώσεων για παραγωγή βακτηριοσίνης, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, αναδείχθηκε μία μοναδική απομόνωση λακτοβακίλλου που εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι του ίδιου μικροοργανισμού δείκτη (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081) και με τις δύο μεθόδους, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus gasseri*. Το γεγονός πως η αντιμικροβιακή δράση οφειλόταν στο συγκεκριμένο είδος βακτηριακού στελέχους επιβεβαιώνει για ακόμα μία φορά τις μελέτες που εμφανίζουν το *Lactobacillus gasseri* ως το πλέον ωφέλιμο και επικρατέστερο είδος του ανθρώπινου εντερικού μικροβιακού συστήματος (Wall *et al*., 2007). Επίσης, η τόσο εξειδικευμένη αντιμικροβιακή δράση που εμφάνισε το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος έναντι ενός συγγενικού μικροοργανισμού δείκτη, είναι σε απόλυτη

συμφωνία με την παρατήρηση πως τα μέλη της ομάδας Acidophilus στο οποίο ανήκει το *Lactobacillus gasseri* εμφανίζουν εξειδικευμένη αντιμικροβιακή δράση έναντι στενά συγγενικών ειδών και σπανιότερα έναντι κάποιων εντερικών παθογόνων (Selle and Klaenhammer, 2013).

Αυτή η τόσο εξειδικευμένη αντιμικροβιακή δράση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως στη συγκεκριμένη περίπτωση η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας βοηθάει τον μικροοργανισμό παραγωγό στο να επικρατήσει έναντι άλλων μικροοργανισμών εντός της οικοθέσης του, όπως φάνηκε στην περίπτωση του *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* DJO104 (Kreth *et al*. 2005, Lee et al. 2008). Επίσης, η εξειδικευμένη και τόσο στενά στοχευμένη παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας μπορεί να βοηθάει τον μικροοργανισμό παραγωγό, εν προκειμένω το *L. gasseri*, να ρυθμίσει τα μη ευαίσθητα στην παραγωγή της βακτηριοσίνης του είδη, μέσα στο εντερικό μικροβιακό σύστημα, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα που ανέδειξαν ο Bhardwaj και οι συνεργάτες του (2010). Στη μελέτη αυτή καθορίστηκε πως το παραγωγό στέλεχος βακτηριοσίνης *Enterococccus faecium* KH24 επηρέαζε σημαντικά το μικροβιακό σύστημα του ποντικιού. Συγκεκριμένα, για ένα διάστημα 12 ημερών χορηγήθηκε σε ποντίκια συγκεκριμένη ποσότητα Bac^+ *Enterococcus faecium* KH24 ή αντίστοιχη ποσότητα μίας ισομορφής *Enterococcus faecium* που δεν παρήγαγε βακτηριοσίνη (Bac^-). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχθηκε πως ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων ήταν πολύ μεγαλύτερος στα ποντίκια που είχε χορηγηθεί το στέλεχος που παρήγαγε βακτηριοσίνη από ότι σε αυτά που είχε χορηγηθεί το Bac^- στέλεχος. Ως εκ τούτου, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως τα στελέχη των εντερόκκοκων που παράγουν βακτηριοσίνη επιβάλλουν επιλεκτική πίεση η οποία βοηθά στον έλεγχο του εντερικού μικροβιακού συστήματος με έναν ωφέλιμο τρόπο (Bhardwaj *et al*., 2010).

4.2 Χαρακτηριστικά αντιμικροβιακής δράσης

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσπάθεια χαρακτηρισμού της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας ανέδειξαν τα εξής στοιχεία:

- Η αντιμικροβιακή δράση του *L. gasseri* οφείλεται σε πρωτεϊνούχο ένωση καθότι η επίδραση με πρωτεάση οδήγησε σε απώλεια της ζώνης αναστολής. Το πρωτεϊνικό αυτό μόριο, βάσει των αποτελεσμάτων της επίδρασης με λιπάση και α-αμυλάση, φάνηκε να αποτελείται από ένα τμήμα λιπιδίου αλλά

από κανένα τμήμα ολιγοσακχαριτών, το οποίο θα ήταν ευαίσθητο στην υδρόλυση με α-αμυλάση. Τέλος, η παρατήρηση της αντιμικροβιακής δράσης παρουσία καταλάσης στο υπερκείμενο του παραγωγού στελέχους αποτελεί ένα πρόσθετο ενδεικτικό στοιχείο του ότι πρόκειται για μόριο βακτηριοσίνης καθώς αποκλείει το ενδεχόμενο η δράση να οφείλεται στην παρουσία H_2O_2.

- Η πρωτεϊνική ένωση φάνηκε να είναι ιδιαίτερα σταθερή στις διακυμάνσεις της τιμής του pH όπως επίσης και στις διάφορες τιμές θερμοκρασίας. Το μόριο φάνηκε να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό τόσο σε πολύ υψηλές όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζει το γεγονός πως η δράση του παρέμεινε ανεπηρέαστη ακόμα και σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης, όπως για παράδειγμα στους -80 ^{o}C για ένα μήνα. Τέλος, η παρουσία των διαφόρων αντιδραστηρίων στο υπερκείμενο, όπου εκκρίνεται το συγκεκριμένο μόριο δεν αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα της δράσης του.

Ως τελικό συμπέρασμα αυτών των δοκιμών είναι πως το βακτηριακό στέλεχος *L. gasseri* παράγει και εκκρίνει στον εξωκυττάριο χώρο του μία βακτηριοσίνη που φέρει τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Τα δεδομένα αυτά συμπίπτουν με τις υπόλοιπες ερευνητικές μελέτες που ανέδειξαν την παραγωγή βακτηριοσινών και συγκεριμένα γκασερισινών από στελέχη *L. gasseri* απομονωμένα από κόπρανα νεογνών (Kawai *et al*. 1998, Kawai *et al*. 2000, Zhu *et al*. 2000, Mahjenic *et al*. 2004). Όλες αυτές οι ερευνητικές μελέτες ανέδειξαν την εξωκυττάρια παραγωγή βακτηριοσινών ευαίσθητων σε πρωτεάση, ανθεκτικών σε υδρολυτικά ένζυμα, ιδιαίτερα σταθερά σε διακυμάνσεις τιμών pH και θερμοκρασίας. Η μόνη διαφορά αποτέλεσε πως σε κανένα από αυτά τα μόρια δε βρέθηκε ευαισθησία σε λιπάση.

Όμως το γεγονός πως στην παρούσα εργασία το μόριο της βακτηριοσίνης παράγεται από το στέλεχος *L. gasseri* δεν οδηγεί άμεσα και άκριτα στο συμπέρασμα πως πρόκειται για μια γκασερισίνη, καθώς έχει αποδειχθεί πως τα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή των βακτηριοσινών υπόκεινται σε οριζόντια μεταφορά τόσο ανάμεσα στα μέλη της ομάδας των Acidophilus όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών αλλά και γενών. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός πως ο γενετικός τόπος των γονιδίων των βακτηριοσινών πολλές φορές έχει συσχετιστεί με μεταθετά στοιχεία όπως συζευκτικά τρανσποζόνια (van Reenen *et al*., 2011). Χαρακτηριστικό παράδειγμα

αποτελεί η βακτηριοσίνη πεδιοσίνη PA-1, η οποία παράγεται από πολλά διαφορετικά είδη όπως *Pediococcus acidilactici, Pediococcus parvulus, Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus plantarum* και *Bacillus coagulans* (Bennik *et al*. 1997, Le Marrec *et al*. 2000, Mora *et al*. 2000, Miller *et al*. 2005, Todorov and Dicks 2009). Το οπερόνιο που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη βακτηριοσίνη συνήθως εντοπίζεται μέσα σε πλασμίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ένα είδος μεταφοράς, μολονότι εμφανίζεται μικρή ομολογία μεταξύ των υπολοίπων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του πλασμιδίου ή των υπολοίπων πρωτεϊνών που αυτό κωδικοποιεί (van Reenen *et al*., 2011).

4.3 Παραγωγή βακτηριοσίνης και τρόπος δράσης

Στα πειράματα ανίχνευσης της παραγωγής βακτηριοσίνης βρέθηκε πως η παραγωγή της βακτηριοσίνης ξεκίνησε στο τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης προς αρχή της φάσης επιβράδυνσης και συγκεκριμένα μετά από 9 ώρες επώασης (400 AU/ml) και έφτασε το μέγιστο της δραστικότητας της (12.800 AU/ml) στις 11 ώρες επώασης, δηλαδή στη φάση επιβράδυνσης. Μετά την επίτευξη του μεγίστου της δραστικότητας της, η παραγωγή της βακτηριοσίνης άρχισε να μειώνεται. Η μικρή αυτή μείωση στη φάση επιβράδυνσης μπορεί να οφείλεται στην παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από το ίδιο το κύτταρο (Jiang *et al*., 2012) αν και η παραγωγή της εκάστοτε βακτηριοσίνης μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες των οποίων η τιμή και η περίσσεια μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αύξησης του μικροοργανισμού παραγωγού μέσα στο θρεπτικό καλλιέργειας του. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι η μείωση των θρεπτικών πηγών, η τιμή του pH και η θερμοκρασία (Matijasic and Rogelj, 2000). Η πορεία της παραγωγής της παρούσης βακτηριοσίνης ακολουθεί την υπόθεση που υπάρχει πως η παραγωγή των βακτηριοσινών από τα Gram θετικά βακτήρια ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό «αίσθησης απαρτίας» που είναι εξαρτώμενος από τον πληθυσμό του μικροοργανισμού σε αυτή τη φάση (Kleerebezem and Quadri, 2001). Μερικά παραδείγματα είναι αυτά της σακακίνης LSJ618 (Jiang *et al*., 2012) και της πλανταρισίνης MG (Gong *et al*., 2010). Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της νισίνης. Ο Hechard και ο Sahl (2002) απέδειξαν πως η νισίνη A λειτουργεί ως πρωτεΐνη φερομόνη ρυθμίζοντας η ίδια τη σύνθεσή της, μέσω του μηχανισμού «αίσθησης απαρτίας» και ενός μεταγωγικού σήματος δύο συστατικών (Hechard and Sahl, 2002). Με βάση αυτά τα δεδομένα προκύπτει πως η παραγωγή των

βακτηριοσινών χαρακτηρίζεται από έναν διττό ρόλο. Σύμφωνα με αυτήν τη υπόθεση, η βακτηριοσίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο ενώ σε χαμηλές ως επαγωγικό σήμα (Fajardo and Martinez, 2008). Αυτό το φαινόμενο έχει συσχετιστεί με πολλές βακτηριοσίνες εκτός της νισίνης όπως με τη σουμπτιλισίνη που παράγεται από το *Bacillus subtilis*, τη σαλιβαρισίνη Abp 118 και την πλανταρισίνη Α που παράγονται από το *L. salivarius* UCC118 και το *L. plantarum* C11 αντίστοιχα (Flynn et al. 2002, Kleerebezeem 2004, Gobbetti *et al*. 2007). Επομένως θα μπορούσε να γεννηθεί το ερώτημα μήπως και στην παρούσα εργασία η χαμηλή παραγωγή της βακτηριοσίνης στο τέλος της εκθετικής φάσης αύξησης λειτουργεί ως αυτεπαγωγικό σήμα για την μετέπειτα υψηλή παραγωγή της που είναι απαραίτητη για την αντιμικροβιακή της δράση έναντι του *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081. Αυτή η υπόθεση όμως για να απαντηθεί απαιτεί πλήθος εργαστηριακών δοκιμών *in vitro* προκειμένου να εξακριβωθεί.

Όσον αφορά στη μελέτη του τρόπου δράσης της βακτηριοσίνης του *L. gasseri*, τα πειράματα προσδιορισμού του τρόπου δράσης υπέδειξαν μία ραγδαία μείωση τόσο της βιομάζας όσο και του αριθμού των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων της υγρής καλλιέργειας του *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081 όταν προστέθηκαν σε αυτή 3.200 AU/ml βακτηριοσίνης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μία εν δυνάμει βακτηριοκτόνο δράση της βακτηριοσίνης, πιθανότατα βακτηριολυτικής καθότι παρατηρήθηκε μία άμεση διαύγαση της υγρής καλλιέργειας του *L. delbrueckii* DSMZ 20081 μετά την προσθήκη του υπερκειμένου της υγρής καλλέργειας του *L. gasseri* που εμπεριείχε τη βακτηριοσίνη. Παρόμοιο τρόπο δράσης παρουσίασαν οι βακτηριοσίνες bacST202Ch και bacST216Ch από στελέχη *Lactobacillus plantarum*, η ασιδοσίνη 1B από το *Lactobacillus acidophilus* GP1B και η ασιδοσίνη CH5 από το *Lactobacillus acidophilus* CH5 (Chumchalova *et al*. 2004, Kyoung-Sik *et al*. 2007, Todorov *et al*. 2010). Πάρα ταύτα, προκειμένου να διαπιστωθεί ο ακριβής μηχανισμός της βατκηριοσίνης απαιτούνται περαιτέρω πειράματα τα οποία θα εστιάζουν στο διαχωρισμό συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών ουσιών και την κυτταρική μορφολογία.

4.4 Καθαρισμός βακτηριοσίνης

Το γεγονός πως κατά την προσπάθεια κατακρήμνισης της βακτηριοσίνης με 30% και 80% θειϊκό αμμώνιο παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση στα ιζήματα και των δύο ποσοστών αλατότητας, πιθανά να υποδηλώνει την έκκριση δύο διαφορετικών μορίων βακτηριοσινών, καθώς σε διαφορετικά ποσοστά αλατότητας κατακρημνίζονται διαφορετικές πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, κρίθηκε αρχικά αναγκαίο, να μελετηθούν και τα δύο ιζήματα παράλληλα.

Σε όλα τα πρωτόκολλα καθαρισμού που έλαβαν χώρα, παρατηρήθηκε πως η ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης στο τμήμα του πηκτώματος που δεν επεξεργάστηκε με χρώση, αντιστοιχούσε σε πρωτεϊνική ζώνη υψηλού μοριακού βάρους (~ 200 KDa). Αυτό το αποτέλεσμα δημιουργεί προβληματισμό καθότι δεν έχει βρεθεί καμία βακτηριοσίνη μέχρι τώρα με τόσο μεγάλο μοριακό βάρος. Λόγω του ότι όλες οι δοκιμές μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης κρίθηκαν ανεπιτυχείς για την απομόνωση και τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της αντιμικροβιακής ουσίας αποφασίστηκε η περαιτέρω εξέταση μόνο του αρχικού ιζήματος από την κατακρήμνιση με 80% θειικό αμμώνιο με σκοπό την εξακρίβωση και την καθιέρωση συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ηλεκτροφόρησης. Τα αποτελέσματα όμως της τελικής, παρασκευαστικής, μη-αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης με διαβάθμιση 4%-12% του μονομερούς ακρυλαμιδίου δεν μπόρεσαν να δώσουν πιο ευκρινείς απαντήσεις στην προσπάθεια εύρεσης μοριακού βάρους της βακτηριοσίνης. Βάσει όλων αυτών των αποτελεσμάτων φάνηκε πως το μόριο της βακτηριοσίνης του *L. gasseri* είτε λειτουργεί ως σύμπλοκο μαζί με κάποιους άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες, οι οποίοι μάλιστα όταν αποδιαταχθούν και διαχωριστούν από το μόριο της βακτηριοσίνης παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων οδηγούν στην απώλεια της δραστικότητας της τελευταίας είτε αποτελεί κυκλικό μόριο το οποίο δυσκολεύεται να τρέξει στις συγκεκριμένες συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Όσον αφορά στην τελευταία περίπτωση, πρέπει να αναφερθεί πως έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές βακτηριοσίνες με κυκλική δομή συμπεριλαμβανομένης της γκασερισίνης Α από το στέλεχος *Lactobacillus gasseri* LA39 εντερικού μικροβιακού φορτίου (van Belkum *et al.*, 2011). Επίσης, ως ένα δευτερεύον συμπέρασμα όλης αυτής της προσπάθειας είναι η ανάγκη εύρεσης της μέγιστης παραγωγής της βακτηριοσίνης στην διάρκεια του κυτταρικού κύκλου του στελέχους παραγωγού καθώς η παραγωγή χαμηλών ποσοτήτων βακτηριοσίνης καθιστά δύσκολο έως και αδύνατο τον καθαρισμό της. Με

αυτόν τον τρόπο μπορεί και να αποφευχθεί η χρώση νιτρικού αργύρου για την οπτικοποίηση πρωτεϊνικών ζωνών μετά από ηλεκτροφόρηση καθώς αυτή η χρώση έχει πολύ χαμηλό διακριτικό όριο και συνεπώς αναδεικνύεται παράλληλα μεγάλο μέρος υποβάθρου.

4.5 Γενικά συμπεράσματα

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας τα συμπεράσματα που προέκυψαν ήταν τα εξής:

1) Οι κλασσικές τεχνικές ανίχνευσης αντιμικροβιακής δράσης μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο ένα μικρό ποσοστό των στελεχών που φέρουν την ιδιότητα αντιμικροβιακής δράσης.
2) Η μέθοδος «διάχυση σε πηγάδι από άγαρ» εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με τη μέθοδο «διάχυση στην επιφάνεια του άγαρ».
3) Από το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων που εξετάσθηκαν με τις δύο μεθοδολογίες προέκυψε ένα μόνο στέλεχος *Lactobacillus* spp. το οποίο παρουσίασε εξειδικευμένη αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081.
4) Το στέλεχος αυτό ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus gasseri.*
5) Η αντιμικροβιακή δράση του *Lactobacillus gasseri* οφείλεται σε πρωτεΐνικό μόριο και συνεπώς σε μόριο βακτηριοσίνης το οποίο φέρει τα εξής χαρακτηριστικά:
    i. Εμφανίζει ευαισθησία στη λιπάση και ανθεκτικότητα στην α-αμυλάση και στην καταλάση.
    ii. Είναι ανθεκτικό σε διακυμάνσεις pH και θερμοκρασίας.
    iii. Η δραστικότητα του μορίου δεν επηρεάζεται από την παρουσία διαφόρων εν δυνάμει ανασταλτικών αντιδραστηρίων.
6) Η παραγωγή της βακτηριοσίνης ξεκινά στην αρχή της φάσης επιβράδυνσης και φτάνει το μέγιστο της δραστικότητας της (12.800 AU/ml) πολύ γρήγορα κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής.
7) Η βακτηριοσίνη εμφανίζει πιθανότατα βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081.
8) Η εύρεση του μοριακού βάρους της κατέστη αδύνατη καθώς απαιτούνται περαιτέρω προσπάθειες καθαρισμού του πρωτεϊνικού μορίου.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

Άρθρα

- Ahmed Z., Wang Y., Cheng Q and Imran E. **(2010)** *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr J Biotechonol* **9**, 2843-2850.
- Andreatti Filho R.L., Higgins J.P., Higgins S.E., Gaona G., Wolfenden A.D., Tellez G. and Hargis B.M. **(2007)** Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enteric* serovar enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poul Sci* **86**, 1904-1909.
- Arakawa K., Kawai Y., Ito Y., Nakamura K., Chujo T., Nishimura J., Kitazawa H. and Saito T. **(2010)**. HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reutericin 6. *Let Appl Microbiol* **50**, 406–411.
- Aucher W., Lacombe C., Hequet A., Frere L and Berjeaud J.M. **(2005)** Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol* **187**, 2218-2223.
- Barefoot S. F. and Klaenhammer T. R. **(1983)** Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *App. Environ. Microbiol*. **45**, 1808-1815.
- Bennik M.H.J., Smid E.J. and Gorris L.G.M. **(1997)** Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2074-2076.
- Bhardwaj A., Gupta H., Kapila S., Kaur G., Vij S. and Malik R.K. **(2010)** Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. Int. *J Food Microbiol* **141**, 156-164.
- Bradford M. **(1976)**. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein – dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brandao A., Almeidda T., Munoz-Atienza E., Torres C., Igrejas G., Hernandez P.E., Cintas L.M., Poeta P and Herranz C. **(2010)** Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and

animal origin isolated in Portugal. *Arch Microbiol* DOI 10.1007/s00203-010-0619-z.

- Breukink E., Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.G. and De Kruijff B. **(1999)** Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Sci* **286**, 2361-2364.
- Brotz H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Gotz F., Bierbaum G and Sahl H.G. **(1998)** Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* **30**, 317-327.
- Carr F.J., Chill D. and Maida N. **(2002)** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, **28**, 281-370.
- Cheikhyoussef A., Pogori N., Chen W. and Zhang H. **(2008)**. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from Bifidobacteria: From production to their application. *Int J Food Microbiol* **125**, 215-222.
- Cheikyoussef A., Pogori N., Vhen H., Tian F. and Chen W. **(2009)** Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infa*ntis BCRC 14602. *Food Control* **20**, 553-559.
- Cheikhyoussef A., Cheikhyoussef N., Chen H., Zhao J., Tang J., Zhang H. and Chen W. **(2010)** Bifidin I – A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. *Food Control* **21**, 746-753.
- Chiou S. H. and Wu S. H. **(1999)** Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Anal Chim Acta* **383**, 47-60.
- Chumchalova J., Stiles J., Josephsen J. and Plockova M. **(2004)** Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. *J Appl Microbiol* **96**, 1082-1089.
- Claesson M.J., D. van Sinderen and O'Toole P.W. (2007). The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* **269,** 22–28.

- Clemente J.C., Urswll L.K., Parfrey W.L. and Knight R. **(2012)** The impact of gut microbiota on human health : An intergrative view. *Cell*. **148**, 1258-1270.
- Cotter P.D., Hill C. and Ross R.P. **(2005)** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**, 777-788.
- Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P, the European *Listeria* Genome Consortium and Hechard Y. **(2001)** A σ^{54}- dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiol* **147**, 3263-3269.
- Davidson A.L. and Chen J. **(2004)** ATP- binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**, 241-268.
- Davis B. J. (1964) *Ann N Y Acad Sci* **121**, 404
- Dayem M.A., Fleury Y., Devilliers G., Chaboisseau E., Girard R., Nicolas P. and Delfour A. **(1996)** The putative immunity protein of the Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 251-259.
- de Jong A., van Heel A.J., Kok J. and Kuipers O.P. **(2010)**. BAGEL2: mining for bacteriocins in genomic data. *Nucl Ac Res* **38** (Suppl), W647–W651.
- De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe M. E. **(1960)** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **23**, 130-135.
- De Souza E.L., Da Silva C.A. and De Sousa C.P. **(2005)** Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food preservatives. *Braz Arch Biol Technol* **48**, 559-566.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. **(2006)** Bacteriocins : Biological tools for bio0preservation and shelf-life extention. *Int Dairy J* **16**, 1058-1071.
- Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen and Prevost H. **(2006)** The continuing story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol Molec Biol Rev* **70**, 564-582.
- Eckburg P. B., Bik E.M, Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E. and Relman D.A. **(2005)**. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Sci* **308,** 1635–1638.
- Elner P. D., Stoessel C. J., Drakeford E. and Vasi F. **(1966)** A new culture medium for medical bacteriology. *Amer J Clin Pathol* **45**, 502-504.

- Ennahar S., Sonomoto K. and Ishizaki A. **(1999)** Class II Bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *J Biosc Bioengineer*. **87**, 705-716.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. and Ishizaki A. **(2000)** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 85-106.
- Eschenbach D.A., Davick PR., Williams BL, Klebanoff SJ., Young-Smith K., Critchlow CM. and Holmes KK. **(1989)** Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* **27**, 251-256.
- Faith M.J., Skvirsky R., Gilson L., Mahanty H.K. and Kottler R. **(1992)** The secretion of colicin V, p. 331-348. In: James R., Lazdunski C. and Pattus F. (eds). Bacteriocins, microcins and lantibiotics. *Springer – Verlag*, New York.
- Falagas M.E., Betsi GI. and Athanasiou S. **(2007)** Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* **13**, 657-664.
- Fazardo A. and Matinez J.L. **(2008)** Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* **11**, 161-167.
- Fimland G., Eijsink V.G. and Nissen-Meyer J. **(2002)** Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriopcins. *Microbiol* **148**: 3661-3670.
- Flynn S., van Sinderen D., Thornton G.M., Holo H., Nes I.F. and Collins J.K. **(2002)** Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol* **148**, 973-984.
- Franke C.M., Tiemersma J., Venema G. and Kok J. **(1999)** Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP cassette transporter protein LcnC. Involvement of LcnC in lactococcin A maturation. *J Biol Chem* **271**, 8484-8490.
- Georgalaki M.D., Van den Berghe E., Kritikos D., Devreese B., Van Beeumen J., Kalantzopoulos G., De Vyust L. and Tsakalidou E. **(2002)** Macedocin, a second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *App Environ Microbiol* **68**, 5891-5903.

- Gillor O., Etzion A. and Rilley M.A. **(2008)** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 591-606.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Minervini F. and Limitone A. **(2007)** Cell-cell communication in food related bacteria. *Int J Food Microbiol* **120**, 34-45.
- Gong H.S, Meng X.C. and Wang H. **(2010)** Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Control* **21**, 89-96.
- Gratia A. **(1925)** Sur un remarquable example d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C R Seanes Soc Biol Fil* **93**, 1040-1041.
- Hadji-Sfaxi I., El-Ghaish S., Ahmadova A., Batdorj B., Le Blay-Laliberte G., Barbier G., Haertle T. and Chobert J-M. **(2011)** Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* **22**, 2020-2027.
- Hasper H.E., de Kruijff B. and Breukink E. **(2004)** Assembly and stability of nisin-lipid pores. *Biochem* **43**, 11567-11575.
- Hasper H.E., Kramer N.E., Smith. J.L., Himlan J.D., Zachariah C., Kuipers O.P., de Kruijff B. and Breukink E. **(2006)** An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Sci* **313**, 1636-1637.
- Hattori M. and Taylor T. D. **(2009)** The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* **16**, 1-12.
- Hechard Y. and Sahl H.G. **(2002)** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochim* **84**, 545-557.
- Heilig H.G., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D. and de Vos W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Environ Microbiol* **68,** 114-123.
- Ingram L.C. **(1970)** A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim Biophys Acta* **224**, 263-265.

- Jack R.W., Tagg J.R and Ray B. **(1995)** Bacteriocins of Gram-Positive bacteria. *Microbiol Rev* **59**, 171-200.
- James R., Lazdunski C. and Pattus F. **(1992)** (eds). Bacteriocins, microcins and lantibiotics. *Springer – Verlag*, New York.
- Jayaratne P. and Rutherford C. **(1999)** Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant Enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 2090-2092.
- Jiang J., Shi B., Zhu D., Cai Q., Chen Y., Li J., Qi K. and Zhang M. **(2012)** Characterization of a novel bacteriocinproduced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control* **23**, 338-344.
- Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H. and Warner P.J. **(1995)** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4459-4463.
- Jonhsen L., Fimland G. and Nissen-Meyer J. **(2005)** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determing tha antimicrobial spectrum. *J Biol Chem* **280**, 9243-9250.
- Kawai Y., Saito T., Kitazawa H. and Itoh T. **(1998)** Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 887-892.
- Kawai Y., Saitoh B., Takahashi O., Kitazawa H., Saito T., Nakajima H. and Itoh T. **(2000)** Primary amino acid and DNA sequences of Gassericin T, a Lactacin F-Family Bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2201-2208.
- Kheadr E., Dabour N., Le Lay C., Lacroix C. and Fliss I. **(2007)**. Antibiotic susceptibility profile of Bifidobacteria as affected by oxgall, acid and hydrogen peroxide stress. *Antimicrob Ag and Chemother* **51**, 169-174.

- Kjos M., Nes I.F. and Diep D.B. **(2009)** Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiol* **155**, 2949-2961.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes I. F. and Diep D. B. **(2010)**. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J Bacteriol* **192**, 5906–5913.
- Kjos M., Borrero J., Opsata M., Birri D.J., Holo H., Chintas L.M., Snipen L., Hernandez P.E., Nes I.F. and Diep D.B. **(2011)** Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol* **157**, 3256-3267.
- Klaenhammer TR. **(1988)** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochim* **70**, 337-349.
- Klaenhammer TR. **(1993)** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 39-85.
- Kleerebezem M. **(2004)** Quorum sensing control of lantibiotic production; Nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25**, 1405-1414.
- Kleerebezem M. and Quadri L.E. **(2001)**. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**, 1579–1596.
- Klijn A., Mercenier A. and Arigoni F. **(2005)**. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29,** 491–509.
- Korbie J. Darren and Mattick S.J. **(2008)** Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Prot* **3**, 1452-1456.
- Kotelnikova E.A. and Gelfand M.S. **(2002)** Bacteriocin production by Gram-Positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Rus J Gen* **38**, 758-772.
- Kotsou M. G., Mitsou E. K., Oikonomou I. G. and Kyriacou A. A. **(2008)** In vitro assessment of probiotic properties of *Lactobacillus* strains from infant gut microflora. *Food Biotecnol* **22**, 1-17.

- Kreth J., Meritt J., Shi W. and Qi F. **(2005)** Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* **187**, 7193-7203.
- Kunz C., Kuntz S. and Rudloff S. **(2009)** Intestinal Flora. *Adv Exp Med Biol* **639**, 67-79.
- Kyoung-Sik H., Kim Younghoon, Kim Sae-Hun and Oh S. **(2007)** Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 774-783.
- Laemmli U. K. **(1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* **227**, 680-685.
- Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B. and Urdaci M. **(2000)** Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. *Appl Environ Microbiol* **66**. 5213–5220.
- Lee J.H., Karamychev V.N., Kozyavkin S.A., Mills D., Pavlov A.R., Pavlova N.V., Polouchine N.N., Richardson P.M., Shakhova V.V., Slesarev A.I., Weimer B. and O'Sullivan D.J. **(2008)**. Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* **9**, 247.
- Lee J.H. and O'Sullivan D. **(2010)** Genomic insights into Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 378-416.
- Lee J.H., Li X. and O'Sullivan D.J. **(2011)** Transcription analysis of a lantibiotic gene cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5879–5887.
- Leeber S., Vanderleyden J. and De Keersmacker S.C.J. **(2008)** Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **72**, 728-764.
- Ley R. E., Peterson D. A. and Gordon J.I. **(2006)** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in human intestine. *Cell* **124**, 837-848.
- Lubelski J., Rink R., Khusainov R., Moll G.N. and Kuipers O.P. **(2008)** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci* **65**, 455-476.

- Majhenic A.C., Venema K., Allison G.E., Matijasic B.B., Rogelj I. and Klaenhammer T.R. **(2004)** DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**, 705-714.
- Margolles A., Florez A.B., Moreno H.A., van Sinderen D. and de los Reyes-Gavilan C.G. **(2006)**. Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter. *Microbiol* **152**, 3497-3505.
- Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D. and de Souza Oliveira R.P. **(2013)** Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv* **31**, 482-488.
- Matamoros S., Gras-Leugen C., Le Vacon F., Potel G and de la Cochetiere M. F. **(2013)** Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiol* **21**, 167-173.
- Matijasic B.B. and Rogelj I. **(2000)** Lactobacillus K7 – A new candidate for a probiotic strain. *Food Technol Biotechnol* **38**, 119-119.
- Milette M., Dupont C., Shareck M., Ruiz M.T., Archambault D. and Lacroix M. **(2008)** Purification and characterization of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *J Appl Microbiol* **104**, 269-275.
- Miller K.W., Ray P., Steinmetz T., Hanekarnp T. and Ray B. **(2005)** Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Lett Appl Microbiol* **40**, 56–62.
- Mitsou E. K., Kirtzalidou E., Oikonomou I., Liosis G. and Kyriacou A. **(2008)** Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe*, **14**, 94-101.
- Mora D., Fortina M.G., Parini C. and Manachini P.L. **(2000)** PCR-mediated site-directed mutagenesis on *pedB* gene and *Hae*III restriction as a rapid tool for discrimination among pediocin AcH/PA-1 producer strains. *Food Microbiol* **17**, 415–420.
- Nes I.F., Holo H., Fimland G., HangeH.H and Nissen-Meyer J. **(2002)** Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria p. 81-115. In. C.J. Dutton, M.A. Haxell, H.A.I. McArthur and R.G. Wax (eds).

Peptide antibiotics: discovery, modes of action and application. Marcel Dekker, New York, NY.

- Neish AS. **(2009)** Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterol* **136**, 65-80.
- Nishie M., Nagao JI. and Sonomoto K. **(2012)** Antibacterial peptides 'Bacteriocins': An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci* **17**, 1-16.
- Nissen-Meyer, J., Håvarstein L. S., Holo H., Sletten K. and Nes I.F. **(1993)** Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol* **139,** 1503–1509.
- O'Keefee T., Hill C. and Ross R.P. **(1999)** Characterization and heterologous expression of the genes encoding Enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1506-1515.
- O'Shea E.F., Gardiner G.E., O'Connor P.M., Mills S., Ross R.P. and Hill C. **(2009)**. Characterization of enterocin- and salivaricin-producing lactic acid bacteria from the mammalian gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* **291**, 24–34.
- O'Shea EF., Cotter PD., Stanton C., Ross RP. and Hill C. **(2011)** Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* **152**, 189-205.
- Ornstein L. **(1964)** *Ann N Y Acad Sci* **121**, 321.
- Pei J., Yuan Y. and Yue T. **(2013)** Characterization of bacteriocin bificin C6165: a novel bacteriocin. *J Appl Microbiol* **114**, 1273-1284.
- Postma P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson G.R. **(1993)**. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543–594.
- Quadri L.E., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. **(1994)** Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem* **269**, 204-211.

- Quadri L.E., Sailer M., Terebiznik M.R., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. **(1995)** Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J Bacteriol* **177**, 1144-1151.
- Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K. and Hastings, J. W. **(2000)**. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3098–3101.
- Rivas L., Brid C., McAuliffe O., McDonell MJ., Burgess C.M., Coffey A., Paul Ross R. and Duffy G. **(2010)** *In vivo* and *Ex vivo* evaluations of Bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* 0157:H7. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7210-7216.
- Ross R. P., Mills S., Hill C., Fitzgerald G. F. and Stanton C. **(2010)** Specific matebolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. *Int Dairy J* **20**, 269-276.
- Saier M.H., Hvorup R.N. and Baranote R.D. **(2005)** Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem Soc Trans* **33**, 220-224.
- Saucier L., Poon A. and Stiles M.E. **(1995)** Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *J Appl Bacteriol* **78**, 684-690.
- Savadogo A., Ouattara C., Bassole I.H. and Traore S. **(2006)** Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *Afr J Biotechnol* **5**, 678-683.
- Schillinger U. and Lucke F. **(1989)** Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. *App Environ Microbiol* **55**, 1901-1906.
- Sekirov I., Russell S.L., Antunes C.M and Finlay B. **(2010)** Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859-904.
- Selle K. and Klaenhammer T.R. **(2013)** Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. FEMS *Microbiol Rev*, 1-21.

- Shand R.F. and Leyva K.J. **(2008)** Archaeal antimicrobials: an undiscovered country. In: Blum P (eds) Archaea: new models for prokaryotic biology. *Caister Academic*, Norfolk, p. 233-242.
- Smajs D., Micenkova L., Smarda J., Vrba M., Sevcikova A., Valisova Z. and Woznicova V. **(2010)** . Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol* **10**, 288.
- Smith JL., Orugunty R. and Hillman JD. **(2007)** Lantibiotic production by *Streptococcus mutans*: their uses in replacement therapy for the prevention of dental carries and as antibiotics for the treatment of various infections diseases. In: Riley MA, Gillor O. (eds) Research and applications in Bacteriocins. *Horizon Biosci*, Norfolk, p. 95-115.
- Sprules, T., Kawulka K.E. and Vederas J.C. (2004). NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochem* **43,** 11740–11749.
- Tagg J.R., Dajani A.S. and Wannamaker L.W. **(1976)** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* **40**, 722-756.
- Todorov S.D. and Dicks L.M.T. **(2009)** Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (Scerocarya birrea). *Int J Food Microbiol* **132**, 117–126.
- Todorov S.D., Ho P., Vaz-Velho M. and Dicks L.M.T. **(2010)** Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from *Beloura* and *Chouriço*, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci* **84**, 334-343.
- Todorov S.D., Rachman C., Fourrier A., Dicks L.M.T., van Reenen C.A., Prevost H. and Dousset X. **(2011)** Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* **17**, 23-31.
- Tourez R., Kheadr E., Lacroix C., Moroni O. and Fliss I. **(2003)** Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **95**, 1058–1069.

- Van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A. and Vederas J.C. **(2011)** Structure and genetics of circular bacteriocins. *Cell*, **19**, 411-418.
- Van Reenen C.A. and Dicks L.M.T. **(2011)** Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch Microbiol* **193**, 157-168.
- Venema, K., Haverkort R.E., Abee T., Haandrikman A.J., Leenhouts K.J., de Leij L., Venema G. and Kok J. (1994) Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol Microbiol* **14,** 521–532.
- Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald G.F. and Zink R. **(2004)**. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek **86,** 205–223.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra. G., Fitzgerald G.F., Chater K.F. and van Sinderen D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71,** 495–548..
- Vriezen J.A., Valliere M. and Riley M.A. **(2009)**. The evolution of reduced microbial killing. *Gen Biol Evol* **1**, 400–408.
- Walker A.W., Duncan S.H., McWilliam Leitch E.C., Child M.W. and Flint H.J. **(2005)** pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3692-3700.
- Wall R., Fitzgerald G., Hussey S., Ryan T., Murphy B., Ross P. and Stanton C. **(2007)**. Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* **59,** 127–137.
- Walter J. (2005). The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract, p. 51–82. *In* Tannock G.W. (eds.), Probiotics & prebiotics: scientific aspects. *Caister Academic Press*, Norfolk, United Kingdom.
- Wiedemann I., Breukink E, van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G., de Kruijff B and Sahl H.G. **(2001)** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precurson lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* **276**, 1772-1779.

- Willey R.E. and van der Vonk W.A. **(2007)** Lantibiotics : peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* **61**, 477-501.
- Zacharof M.P. and Lovitt R.W. **(2012)** Bcateriocins produced by lactic acid bacteria- A review article. *APCBEE Procedia* **2**, 50-56.
- Zhu W. M., Liu W. and Wu D.Q. **(2000)** Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol* **88**, 877-886.
- Zinedine A. and Faid M. **(2007)** Isolation and characterisation of strains of bifidobacteria with probiotic properties in vitro. *World J Dairy Food Sci* **2**, 28–34.

Βιβλία

- Corr S. C., Hill C. and Cahan C. G.M. **(2009)** Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens**.** Advances in Food and Nutrition Research, Chapter 1.
- Gary Walsh **(2002)** Proteins: Biochemistry and Biotechnology, Wiley Publications.
- Corry J.E.L., Curts G.D.W. and Baird R.M. **(1999)** Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Second Edition, Volume 34, published in Progress in Industrial Microbiology, Volume 34, Second Impression.
- Madigan T. Michael, Martinko M. John and Parker J. **(2005)** Brock -Βιολογία των Μικροοργανισμών, 9η έκδοση, τόμος Ι.
- Sambrook J. and Russell D.W. **(2001)** Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scardovi V. **(1986)** The genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen 1924, 472AL, p. 1418-1434. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Καραγκούνη – Κύρτσου Α.Δ. **(2012)**, Γενική Μικροβιολογία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

- Κλώνης Ι. **(1997)**, Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Μεταπτυχιακή Μελέτη

- Μήτσου Ε. **(2005)** Μελέτη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και μπιφιδοβακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας νεογνών – Επίδραση της διατροφής.

Παράρτημα

Πίνακας 1: Μορφολογικές και βιοχημικές παρατηρήσεις των βακτηριακών στελεχών *Lactobacillus* spp. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

ΑΑ	*Κωδικός*	*Μορφολογία αποικίας*	*Gram*	*Αποτελέσματα ταυτοποίησης (API)*	*Δοκιμή καταλάσης*
1.	***Anlb-1***	round, convex, λευκή γαλακτώδης, d=1mm	βάκιλλοι κοντοί & μέτριου πάχους		-
2.	***Anlb-2***	round, flat, umbonated, λευκό κέντρο, μπεζ περιφέρεια χρυσίζουσα, d=0.5mm	βάκιλλοι σε ποικίλα μεγέθη & σε αλυσίδες		-
3.	***Anlb-3***	round, convex, ελαφρώς wavy, λευκή γαλακτώδης, χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι κοντοί & μέτριου πάχους		-
4.	***Anlb-4***	round, flat, στικτή, λευκό κέντρο & μπεζ περιφέρεια χρυσ., d= 1-2mm	βάκιλλοι λεπτοί & επιμήκεις		-
5.	***Anlb-5***	round, drop-like, μπεζ, d= 2mm	βάκιλλοι κοντοί & robust		-
6.	***Anlb-6***	round, drop-like, μπεζ, d= 0.5mm	βάκιλλοι μικρού μήκους προς κοντοί & μέτριου πάχους		-
7.	***Anlb-7***	round, drop-like, λευκή γαλακτώδης με μπεζ χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι κοντοί (ποικίλα μεγέθη) & αρκετά robust		-
8.	***Anlb-8***	round, convex, λευκή με μπεζ χρυσ.περιφέρεια, d= 2mm	βάκιλλοι μικρού μήκους προς μέτριοι		-
9.	***Anlb-9***	round, drop-like, μπεζ με χρυσ. περιφέρειεα, d= 2mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους	LR-B19	-
10.	***Anlb-10***	round, convex, wavy, μπεζ με χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους, λεπτοί		-
11.	***Anlb-11***	round, convex, λευκή με χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι κοντοί & λεπτοί	LR-A1	-
12.	***Anlb-12***	round,, scalloped	βάκιλλοι	LC-C5	-

		margins, λευκή με μπεζ χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	λεπτοί & σε ποικίλα μεγέθη		
13.	***Anlb-13***	round, drop-like, λευκή γαλακτώδης, d= 0.5mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους	LR-B5	-
14.	***Anlb-14***	round, wavy, convex, λευκή με μπεζ χρυσ. περιφέρεια, d=2mm	βάκιλλοι κοντοί & ποικίλα μεγέθη	LC-C2	-
15.	***Anlb-15***	round, convex προς drop-like, λευκή γαλακτώδης, d= 1mm	βάκιλλοι κοντοί & λεπτοί	LR-B20	-
16.	***Anlb-16***	round, scalloped margins λευκή με χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι πολύ λεπτοί & επιμήκεις	LA-B17	-
17.	***Anlb-17***	round, umbonated, ελαφρώς wavy, λευκό κέντρο με χρυσ. περιφέρεια, d=1mm	βάκιλλοι λεπτοί & πολύ επιμήκεις	LA-B2	-
18.	***Anlb-18***	round, wavy, raised προς umbonated, με λευκό μπεζ κέντρο, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους σε αλυσίδες	LDD-C1	-
19.	***Anlb-19***	round, wavy, raised προς umbonated, χρυσ. με λευκό μπεζ κέντρο, d= 1mm	βάκιλλοι λεπτοί σε ποικίλα μήκη	LDD-C4	-
20.	***Anlb-20***	round, drop-like, μπεζ-γυαλιστερή, d= 0.5mm	βάκιλλοι κοντοί, χοντροί σε αλυσίδες	LA-A2	-
21.	***Anlb-21***	round, convex, umbonated, λευκή μπεζ γαλακτώδης, d= 2mm	βάκιλλοι πολύ μικρού μήκους, robust	LF-B21	-
22.	***Anlb-22***	round, umbonated, λευκή-μπεζ με πιο λευκό κέντρο, d= 1-2mm	βάκιλλοι κοντοί και σχετικά robust	LF-B15	-
23.	***Anlb-23***	round with radiating margins, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 2mm	βάκιλλοι ποικίλου μήκους, κυρίως κοντοί, robust	LB-C8	-
24.	***Anlb-24***	round, umbonated,scalloped margins, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφ., d=2mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους προς κοντοί, όχι πολύ λεπτοί	LR-A3	-
25.	***Anlb-25***	round, convex, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι λεπτοί, ποικίλου μήκους σε αλυσίδες	LA-A20	-

26.	***Anlb-26***	round, wavy, umbonated, λευκό κέντρο με μπεζ χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι λεπτοί, επιμήκεις, ποικίλου μήκους	LDD-B18	-
27.	***Anlb-27***	round, wavy, umbonated με λευκό κέντρο, χρυσ. περιφέρεια, d=0.5mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους σε αλυσίδες	LP-C9	-
28.	***Anlb-28***	round, convex, λευκή γυαλιστερή με πιο διαφανή περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι λεπτοί σε ποικίλα μήκη	LF-B14	-
29.	***Anlb-29***	round, scalloped margins, μπεζ χρυσίζουσα με πιο πυκνό μπεζ κέντρο, d= 1mm	βάκιλλοι λεπτοί & επιμήκεις	LCR-A21	-
30.	***Anlb-30***	round, convex προς drop-like, λευκή γυαλιστερή, d= 2mm	βάκιλλοι μέτριοι προς κοντοί, robust		-
31.	***Anlb-31***	round, raised προς umbonated, στικτή, λευκή με χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι μέτριοι προς κοντοί		-
32.	***Anlb-32***	round, umbonated, με λευκό κέντρο & γυαλιστερή διαφανή περιφ., στικτή, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου πάχους & μήκους, επιμήκεις, αλυσίδες		-
33.	***Anlb-33***	round, wavy, convex, διαφανής, στικτή με μπεζ κέντρο & χρυσ. περιφ, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου πάχους, μέτριου μήκους & επιμήκεις		-
34.	***Anlb-34***	round, drop-like, λευκή γυαλιστερή, d= 1mm	βάκιλλοι κοντοί ως μέτριου μήκους & μέτριου πάχους		-
35.	***Anlb-35***	round, convex, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι κοντοί, robust		-
36.	***Anlb-36***	round, convex, στικτή, λευκό κέντρο & χρυσ. περιφ., d= 0.5mm	βάκιλλοι ποικίλα μήκη σε αλυσίδες		-
37.	***Anlb-37***	round, umbonated, scalloped με χρυσ. περιφ. & λευκό κέντρο, d= 0.5mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους		-
38.	***Anlb-38***	round, drop-like, μπεζ θαμπή με γυαλιστερή περιφέρεια, d=	βάκιλλοι μέτριου μήκους προς		-

		0.5mm	κοντοί, όχι πολύ λεπτοί		
39.	***Anlb-39***	round, wavy, στικτή, μπεζ με διαφανή περιφέρεια, umbonated, irregular and spreading, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου πάχους , επιμήκεις		-
40.	***Anlb-40***	round, convex, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι κοντοί, robust		-
41.	***Anlb-41***	round, ελαφρώς wavy, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους		-
42.	***Anlb-42***	round, umbonated, στικτή, μπεζ διαφανής περιφέρεια & πιο πυκνό κέντρο, d= 1-2mm	βάκολλοι μέτριου πάχους, επιμήκεις		-
43.	***Anlb-43***	round, convex προς drop-like, λευκή με χρυσ. περιφέρεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι κοντοί, μέτριου πάχους		-
44.	***Anlb-44***	round, convex, λευκή με χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους προς κοντοί		-
45.	***Anlb-45***	round, drop-like, λευκή γαλακτώδης με χρυσ. περιφέρεια, d= 2mm	βάκιλλοι κοντοί, μέτριου πάχους		-
46.	***Anlb-46***	round, wavy, scalloped, λευκή γαλακτώδης με μπεζ χρυσ. περιφέρεια, d= 1mm	βάκιλλοι λεπτοί, μέτριου μήκους	LPP-A16	-
47.	***Anlb-47***	round, drop-like, λευκή γαλακτώδης, d= 2mm	βάκιλλοι μέτριου μήκους & πάχους	LP-A22	-
48.	***Anlb-48***	round, umbonated, λευκό κέντρο & μπεζ χρυσ. περιφέρεια, στικτή, διαφανής, d= 1mm	βάκιλλοι επιμήκεις, λεπτοί, ποικίλου μήκους		-
49.	***Anlb-49***	round, wavy προς filiform, λευκό κέντρο, μπεζ γυαλιστερή, διαφανή επιφάνεια, d= 1-2mm	βάκιλλοι μικρού μήκους & μέτριου πάχους		-
50.	***Anlb-50***	round, convex, λευκή-μπεζ, d= 2mm	βάκιλλοι κοντοί, robust		-

❖ Όλοι οι μικροοργανισμοί του γένους *Lactobacillus* αναπτύχθηκαν σε MRS broth και MRS agar

Πίνακας 2: Μορφολογικές και βιοχημικές παρατηρήσεις των βακτηριακών στελεχών *Bifidobacterium* spp. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

ΑΑ	Κωδικός	Μορφολογία αποικίας	Gram	Δοκιμή καταλάσης
1.	**Bif. 3**	α. Round, convex, λευκή γαλακτώδης, d=2 mm, β. Round, drop-like, διαφανής, υπόλευκη, d=1 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, μέτριου μήκους και πάχους	-
2.	**Bif. 7**	α. Round, convex, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, d=2 mm β. round, drop-like, λευκή, διαφανής, d=0,5-1 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, όχι τόσο καλά βαμμένοι	-
3.	**Bif. 9**	Round προς umbonated, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, ελαφρώς wavy, d=2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, όχι τόσο καλά βαμμένοι	-
4.	**Bif. 12**	α. Round, convex, λευκή γαλάκτώδης, d=2 mm β. round, convex, λευκή, διαφανής, d=0,5 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'* σπάνια	-
5.	**Bif. 15**	Round, convex, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, d= 2mm	χοντροί ακανόνιστοι βάκιλλοι, μέτριου μήκους, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*	-
6.	**Bif. 17a**	α.Round, convex προς umbonated, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, d= 2 mm β. round, drop-like, λευκή-μπεζ διαφανής, d=0,5 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία *'y'*, μέτριου μήκους και πάχους	-
7.	**Bif. 17b**	Round, umbonated, πυκνό κέντρο, πιο διαφανής περιφέρεια, λευκή γυαλιστερή, ελεφρώς wavy, d= 2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, μέτριου μήκους και πάχους	-
8.	**Bif. 24**	Round with scalloped margins, μπεζ, d= 2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι πολύ συχνή παρουσία *'y'*	-
9.	**Bif. 27**	Round, convex, λευκή γαλακτώδης, d= 1mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, σχετικά επιμήκεις	-
10.	**Bif. 54**	Round, convex προς umbonated, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, d= 2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*, σχετικά λεπτοί	-
11.	**Bif. 55a**	Round, convex προς umbonate, μπεζ θαμπή, mat, πιο πυκνό κέντρο, d=2 mm	μεγάλοι ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία *'y'*	-
12.	**Bif. 56a**	Round, umbonated, λευκή με μπεζ χρυσίζουσα περιφέρεια, d=2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία *'y'*, μέτριου μήκους και πάχους	-
13.	**Bif. 56b**	Round with raised margin, μπεζ mat, d=2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία *'y'*, λεπτοί και επιμήκεις	-

14.	**Bif. 69a**	Round, umbonated, wavy προς filiform, λευκή, d= 2mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία ‘*y’*, χοντροί και επιμήκεις	-
15.	**Bif. 69b**	Round, umbonated, λευκό πυκνό κέντρο και πιο διαφανή περιφέρεια, d= 2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους και πάχους	-
16.	**Bif. 82**	α. round, convex, wavy, στικτή επιφάνεια, λευκή γαλακτώδης, d=2 mm β. round, drop-like, μπεζ, d= 0,1-0,5 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους προς επιμήκεις και μέτριου πάχους	-
17.	**Bif. 85**	Round, convex, ελαφρώς wavy, λευκή, d=0,5 mm	πολύ λεπτοί, ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους	-
18.	**Bif. 88**	Round, filiform, umbonated, λευκή, d=1 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία ‘*y’*, επιμήκεις και λεπτοί	-
19.	**Bif. B1**	Round, convex προς umbonated, λευκή διαφανής περιφέρεια με πιο πυκνό κέντρο, d= 2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους και πάχους	-
20.	**Bif. B7**	Round, raised προς umbonated, περλέ λευκό κέντρο, κίτρινη περιφέρεια, d=1-2 mm	λεπτοί, ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, πολύ συχνή παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους και επιμήκεις	-
21.	**Bif. B13**	α. round, convex, μπεζ-λευκή γαλακτώδης, d=2 mm β. round, drop-like, μπεζ θαμπή, d=1 mm	Ακανόνιστοι βάκιλλοι μέτριου μήκους και πάχους, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία ‘*y’*, όχι καλά χρωματισμένα	-
22.	**Bif. B14**	Round, flat, wavy, μπεζ, d=2 mm	ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, συχνή παρουσία ‘*y’*, μέτριου μήκους και πάχους	-

❖ Όλες οι βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Bifidobacterium* αναπτύχθηκαν σε mMRS agar και mMRS broth (MRS + 0,05% L- υδροχλωρική κυστεΐνη)

Πίνακας 3: Μορφολογικές και βιοχημικές παρατηρήσεις των μικροοργανισμών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

ΑΑ	Μικροοργανισμοί Δείκτες	Θρεπτικά Υποστρώματα	Μορφολογία αποικίας	Gram	Δοκιμή καταλάσης
1.	*Enterococcus faecalis* ATCC 51299	BHI agar, TSBYE	round, umbonated, με μπεζ χρυσίζουσα περιφέρεια & πιο πυκνό μπεζ κέντρο, λίγο θαμπή, d= 1 mm	Κόκκοι προς κοκκοβάκιλλοι	-
2.	*Enterococcus hirae* CIP 5855	BHI agar, BHI broth	round, convex προς umbonated, μπεζ χρυσίζουσα, διαφανής περιφέρεια & πιο μπεζ κέντρο, d= 1 mm	Κόκκοι προς κοκκοβάκιλλοι	-
3.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538	BHI agar, TSBYE	round, convex, κίτρινη χρυσίζουσα, d= 2 mm	Κόκκοι που μοιάζουν να σχηματίζουν σταφύλι	+
4.	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923	BHI agar, TSBYE	round, convex, μπεζ, d = 2 mm	Κόκκοι που μοιάζουν να σχηματίζουν σταφύλι	+
5.	*Listeria monocytogenes* DSM 12464	BHI agar, TSBYE	round, umbonated, με μπεζ χρυσίζουσα διαφανή περιφέρεια & πιο πυκνό κέντρο, d = 1 mm	Βάκιλλοι μέτριου μήκους και πάχους	+
6.	*Clostridium perfringens*	CBA+0,05 % L-υδροχλωρική κυστεΐνη, mBHI broth	round, filiform, d= 4 mm, κάνει αιμόλυση	Καλοσχηματισμένοι βάκιλλοι, ποικίλη μήκη, μέτριου πάχους	-
7.	*Clostridium difficile* ATCC 9689	CBA+0,05 % L-υδροχλωρική κυστεΐνη, mBHI broth	round, filiform, d= 2 mm, πολύ πυκνή ανάπτυξη	Καλοσχηματισμένοι βάκιλλοι	-
8.	*Lactobacillus casei* DSMZ 20011	MRS agar, MRS broth	round,convex, wavy, στικτή επιφάνεια, πυκνό κέντρο, πιο διαφανή περιφέρεια, d= 1 mm	Βάκιλλοι μέτριου μήκους και πάχους, σε αλυσίδες	-
9.	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ	MRS agar, MRS broth	round, λευκή, στικτή, irregular and spreading,	βάκιλλοι επιμήκεις, μέτριου πάχους	-

	20081		d=2 mm		
10.	*Lactobacillus rhamnosus* WAV	MRS agar, MRS broth	round, convex, wavy, λευκή γαλακτώδης με χρυσίζουσα περιφέρεια, d=2 mm	Βάκιλλοι μέτριου μήκους προς κοντοί και μέτριου πάχους	-
11.	*Bifidobacterium bifidum* DSM 20456	mMRS agar, mMRS broth	α. round, convex, μπεζ, d= 2 mm β. round, drop-like, μπεζ, d=0,5 mm	Ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές, παρουσία *'y'*	-
12.	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140	mMRS agar, mMRS broth	round, convex, λευκή διαφανής, d= 0,5 mm	Ακανόνιστοι βάκιλλοι, ροπαλοειδείς δομές	-

- mMRS = MRS + 0,05% L- υδροχλωρική κυστείνη
- mBHI = BHI + 0,05% L- υδροχλωρική κυστείνη