



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Bacillus Subtilis* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΕ ΗPLC-PDA

Επιμέλεια: ΚΑΚΛΑΜΑΝΟΥ ΠΕΛΑΓΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΡΟΕΣΤΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφερθώ σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στη διεξαγωγή και περάτωση της παρούσας εργασίας.

Καταρχάς, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επιβλέποντα Καθηγητή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χαράλαμπο Προεστό που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του δε θα μου δινόταν η ευκαιρία να παρουσιάσω την ερευνητική μου δουλειά. Συγχρόνως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιο Νυχά για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω το εργαστηριακό - ερευνητικό κομμάτι της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε. Ακόμη, θεωρώ απαραίτητο να ευχαριστήσω την Αλεξάνδρα Λιανού, μεταδιδακτορική φοιτήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο στις εργαστηριακές αναλύσεις, όσο και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βασίλη Ηλιόπουλο, μέλος του επιστημονικού προσωπικού του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που με βοήθησε στην ανάλυση των δειγμάτων μου με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και στην επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Βακτήρια	6
1.1.1 Δομή και Ταξινόμηση	6
1.1.2 Πολλαπλασιασμός.....	7
1.1.3 Μορφολογία Αποικιών	7
1.1.4 Σποριογένεση.....	8
1.2 Το γένος <i>Bacillus</i>	9
1.2.1 Συστηματοποίηση και Οικολογία των ειδών <i>Bacillus</i>	9
1.2.2 Ύπαρξη στο Περιβάλλον και τα Τρόφιμα	9
1.2.3 Τροφική Δηλητηρίαση.....	10
1.2.4 Πρόληψη και Έλεγχος της Βακτηριακής Τροφικής Δηλητηρίασης	11
1.2.5 Άλλες δράσεις - χρήσεις του γένους <i>Bacillus</i>	12
1.3 <i>Bacillus subtilis</i>	13
1.3.1 Χαρακτηριστικά του Είδους.....	13
1.3.2 Συνθήκες Ανάπτυξης	14
1.3.3 Σποριογένεση.....	14
1.3.4 Μεταβολισμός	14
1.3.5 Πτυχές ασφάλειας του <i>B. subtilis</i>	15
1.3.6 Αλλοίωση Τροφίμων	15
1.3.7 Άλλες Δράσεις – Χρήσεις του <i>B. subtilis</i>	16
• Βιοέλεγχος.....	16
• Βιοϋμένια (Biofilms).....	17
1.4 Αντικείμενο της Έρευνας	18
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
2.1 Τεχνικές και Μέθοδοι.....	19
2.1.1 Μοντελοποίηση Μικροβιακών Επιδράσεων στα Τρόφιμα – Οπτική Πυκνότητα	19
2.1.2 Μέθοδος Υπολογισμού μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max})	21
2.1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	22
2.1.4 Ενεργότητα Νερού (a_w).....	23
2.1.5 Σημασία του pH	25

2.2	Πειραματική Μέθοδος.....	27
2.2.1	Βακτηριακό στέλεχος και Προετοιμασία Εμβολίου.....	27
2.2.2	Πειράματα ανάπτυξης.....	27
2.2.3	Ανάλυση δειγμάτων με HPLC.....	29
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
4.1	Συμπεράσματα.....	38
4.2	Μελλοντική Εργασία.....	38
5	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	40
5.1	Αρκτικόλεξα - Συντμήσεις.....	40
5.2	Χρωματογραφήματα	40
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη αυτή αποτελεί αξιολόγηση της φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis* σε διαφορετικές συνθήκες επώασης. Ο σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός των ακραίων τιμών pH (minimum και maximum) στις οποίες είναι δυνατό να αναπτυχθεί ο *B. subtilis* και των πιθανών μεταβολών της κινητικής της ανάπτυξης του όταν το θρεπτικό υλικό χαρακτηρίζεται από διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (δισακχαρίτης) και NaCl. Να σημειωθεί ότι το εύρος των τιμών pH, σακχαρόζης και NaCl καθορίστηκε με βάση το αντίστοιχο εύρος τιμών που συναντάται στην πλειοψηφία των διαφόρων τροφίμων, καθώς θέλαμε να προσομοιάσουμε τις συνθήκες των πειραμάτων με αυτές που υπάρχουν στα τρόφιμα.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις θρεπτικού υλικού TSB εμβολιασμένου με *B. subtilis*. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με T.S. Αγαρ, μετά από επώασή τους στους 30°C για 24 ώρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, ενώ σε κάθε δειγματοληψία μετρήθηκε το pH με ειδικό ηλεκτρονικό πεχάμετρο.

Παράλληλα με το μικροβιολογικό έλεγχο, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των εμβολιασμένων θρεπτικών υλικών σε διαδοχικές (δεκαδικές) αραιώσεις με τη χρήση μικροπλακέτας 96 βοθρίων (μέγιστης χωρητικότητας 300μl/βοθρίο) και του αντίστοιχου μηχανήματος μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Τέλος, προσδιορίστηκαν ορισμένα προϊόντα του μεταβολισμού του *B. subtilis* με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξάγαμε από τα πειράματα που περιγράφονται παραπάνω, ο μικροοργανισμός αυτός αναπτύσσεται σε εύρος pH 4.5-9.0, με βέλτιστη τιμή pH 7.0. Επίσης, αύξηση της συγκέντρωσης NaCl (%) στο θρεπτικό υλικό προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ενώ αυξημένη συγκέντρωση σακχαρόζης δεν εμπόδισε την ανάπτυξη του *B. subtilis*. Η ανάλυση των δειγμάτων με HPLC επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βακτήρια

1.1.1 Δομή και Ταξινόμηση

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί με μέγεθος συνήθως λίγων μικρόμετρων. Μαζί με τα αρχαία, αποτελούν τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς η κυτταρική δομή των οποίων είναι πιο απλή από αυτή των υπολοίπων μικροοργανισμών που ονομάζονται ευκαρυωτικοί. Η κύρια διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς δεν υπάρχει σχηματισμένος πυρήνας ή οποιοσδήποτε άλλος μεμβρανικός σχηματισμός (π.χ. οργανίδια που να είναι συνδεδεμένα με ή να περικλείονται από μεμβράνη). Η γενετική πληροφορία των βακτηρίων περιέχεται σε ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA ενώ ορισμένα από αυτά έχουν επιπλέον και ένα ή περισσότερα κυκλικά μόρια DNA μικρότερου μεγέθους, τα οποία ονομάζονται πλασμίδια. Τα πλασμίδια αυτά συχνά περιέχουν γονίδια που δίνουν στο βακτήριο κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Για παράδειγμα, μπορεί να περιέχουν ένα γονίδιο το οποίο κάνει το βακτήριο ανθεκτικό σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό δίνοντάς του το πλεονέκτημα της επιβίωσης έναντι των υπολοίπων βακτηρίων που δε φέρουν το πλασμίδιο αυτό.

Τα βακτήρια ταξινομούνται σε 5 ομάδες ανάλογα με το βασικό τους σχήμα: σφαιρικά (cocci), ραβδία (bacilli), σπιράλ (spirilla), δονάκια (vibrios) και σπειροχαίτες. Μπορούν να υπάρξουν ως ξεχωριστά κύτταρα, σε ζεύγη, αλυσίδες ή συμπλέγματα.

Επίσης, τα βακτήρια χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, ήτοι τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram. Ο διαχωρισμός αυτός που χρονολογείται από το 1884, έχει ως υπόβαθρο τη διαφορετική δομή και σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στις δύο κατηγορίες βακτηρίων. Η χρώση Gram βασίστηκε στην ικανότητα ή ανικανότητα του βακτηρίου να κατακρατεί το σύμπλοκο της χρώσης με crystal violet και ιώδιο, όταν εκπλένονταν με οργανικό διαλύτη όπως ακετόνη ή αιθανόλη. Θετικά κατά Gram χαρακτηρίστηκαν όσα κατακρατούσαν το σύμπλοκο χρώμα και αρνητικά όσα με την έκπλυση το απέβαλαν. (1)

Τα βακτήρια απαντώνται σε όλους τους πιθανούς βιοτόπους πάνω στη γη: χώμα, πετρώματα, ωκεανούς, ακόμη και στο χιόνι της Ανταρκτικής. Κάποια ζουν μέσα ή πάνω σε άλλους οργανισμούς (συμβιωτικά ή παρασιτικά) συμπεριλαμβανομένων των φυτών,

των ζώων και των ανθρώπων. Ο αριθμός των βακτηρίων που 'κατοικούν' στο ανθρώπινο σώμα είναι ίσος ή και μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ πολλά από αυτά συναντώνται στο πεπτικό σύστημα(2). Άλλα βακτήρια βρίσκονται στο χώμα ή τη νεκρή φυτική ύλη όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών. Κάποια προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων ή καταστροφή των σπαρτών, ενώ κάποια άλλα είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην παραγωγή τροφίμων μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης, όπως για παράδειγμα το γιαούρτι και η σάλτσα σόγιας. Σχετικά μικρός αριθμός βακτηρίων λειτουργούν ως παράσιτα ή παθογόνα τα οποία προκαλούν νόσο στα ζώα, τα φυτά και τον άνθρωπο.

1.1.2 Πολλαπλασιασμός

Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με απλή διχοτόμηση. Κατά τη διαδικασία αυτή, το βακτήριο, το οποίο αποτελείται από ένα μόνο κύτταρο, διαχωρίζεται σε δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Η απλή διχοτόμηση ξεκινάει με το διαχωρισμό του DNA του βακτηρίου σε δύο αντίγραφα. Έπειτα το βακτηριακό κύτταρο επιμηκύνεται και χωρίζεται σε δύο θυγατρικά κύτταρα καθένα από τα οποία περιέχει ένα μόριο DNA πανομοιότυπο με αυτό του πατρικού κυττάρου. Κάθε θυγατρικό κύτταρο αποτελεί πλέον έναν κλώνο του πατρικού κυττάρου. (3)

Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη σωστής θερμοκρασίας και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, κάποια βακτήρια όπως η *Escherichia coli* μπορούν να διχοτομηθούν κάθε 20 λεπτά. Αυτό σημαίνει ότι σε 7 ώρες ένα βακτήριο μπορεί να δημιουργήσει 2.097.152 βακτήρια.

1.1.3 Μορφολογία Αποικιών

Τα βακτήρια ζουν και πολλαπλασιάζονται σε διάφορα περιβάλλοντα. Οι διαδοχικοί πολλαπλασιασμοί ενός αρχικού βακτηρίου οδηγούν στο σχηματισμό μιας βακτηριακής αποικίας. Η ανάπτυξη μιας τέτοιας αποικίας υπακούει σε διάφορους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς κανόνες, και ελέγχεται από παράγοντες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, pH, περιεκτικότητα σε αλάτι, υγρασία κλπ). Αλλαγές στους παραπάνω

παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τόσο την ανάπτυξη όσο και τη μορφολογία της αποικίας. Για παράδειγμα, ένα στέλεχος βακτηρίου μπορεί να δημιουργήσει αποικίες με ποικίλες μορφολογίες όταν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο σε άγαρ με διαφορετικά κάθε φορά συστατικά και υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.(4)

1.1.4 Σποριογένεση

Η σποριογένεση είναι μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα ορισμένων Gram⁺ βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα με χαμηλά επίπεδα G+C και τα οποία έχουν επιβιώσει πάνω από 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια(5). Αποτελεί μια σύνθετη αναπτυξιακή διαδικασία η οποία οδηγεί στη δημιουργία μεταβολικά αδρανών σπόρων προερχόμενοι από βλαστικά κύτταρα(6). Ενώ ο ακριβής λόγος για τον οποίο τα βακτήρια αποφασίζουν να σχηματίσουν σπόρια δεν είναι γνωστός, οι επικρατούσες θεωρίες υποστηρίζουν ότι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή/και η παρουσία τοξικών ουσιών στο περιβάλλον του βακτηριακού κυττάρου μπορούν να πυροδοτήσουν τη διαδικασία της σποριογένεσης(7). Ο σχηματισμός σπορίων αποτελεί μια υποβοηθητική στρατηγική για τα βακτήρια που έχουν αυτή την ικανότητα, δίνοντάς τους τη δυνατότητα να επιβιώνουν σε μη ευνοϊκές συνθήκες τόσο στο περιβάλλον όσο και μέσα σε κάποιον ξενιστή, αλλά και να μεταδίδονται σε άλλους ξενιστές ή σε άλλα περιβάλλοντα. Τα σπόρια μπορούν να αντέξουν σε διάφορες συνθήκες φυσικού και χημικού στρες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, πίεση, διαλύτες, οξειδωτικούς παράγοντες, λυτικά ένζυμα, ακτινοβολία, επιτάχυνση και αντιμικροβιακούς παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν τάχιστα να καταστρέψουν τις βλαστικές μορφές του βακτηρίου(8, 9). Σε αρκετές περιπτώσεις, τα σπόρια λειτουργούν ως ένα λοιμογόνο για τον άνθρωπο μόριο προκαλώντας έτσι νόσο(10). Όλα αυτά τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά οδήγησαν τους μικροβιολόγους στην εκτενή μελέτη της διαδικασίας της σποριογένεσης αλλά και της δομής και φυσιολογίας των σπορίων.

Αρκετές από αυτές τις μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο γένος *Bacillus* και ειδικά στον *Bacillus subtilis*, ο οποίος πλέον θεωρείται ως πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη της σποριογένεσης. (11)

1.2 Το γένος *Bacillus*

1.2.1 Συστηματοποίηση και Οικολογία των ειδών *Bacillus*

Τα αερόβια βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια ταξινομούνται σε τέσσερα γένη που ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae*. Μέσα στην οικογένεια αυτή, το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει τα ραβδόμορφα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία αέρα, διακρίνοντάς τα έτσι από τα αυστηρώς αναερόβια κλωστρίδια (*Clostridium spp*). Τα πολλά και διαφορετικά είδη *Bacillus* διακρίνονται σε έξι ομάδες οι οποίες διαφέρουν στη φυσιολογία και στη μορφολογία των σπορίων. Οι έξι ομάδες είναι:

- Στην ομάδα I (ομάδα του *B. polymyxa*), όλα τα είδη είναι δυνητικά αναερόβια και αναπτύσσονται ταχύτατα απουσία οξυγόνου. Τα ενδοσπόριά τους είναι ελλειψοειδή.
- Τα είδη της ομάδας II (ομάδα του *Bacillus subtilis*) είναι φυλογενετικά όμοια και μερικά, όπως ο *B. cereus* και ο *B. licheniformis*, είναι δυνητικά αναερόβια. Όλα αυτά τα βακτήρια παράγουν ωοειδή ενδοσπόρια τα οποία δε διογκώνουν το μητρικό κύτταρο.
- Η ομάδα III (ομάδα του *B. brevis*) αντιπροσωπεύει τα αυστηρώς αερόβια βακτήρια τα οποία παράγουν ελλειψοειδή σπόρια που διογκώνουν το μητρικό κύτταρο.
- Στην ομάδα IV (ομάδα του *B. sphaericus*) όλα τα είδη παράγουν σφαιρικά σπόρια τα οποία πιθανόν να διογκώσουν το μητρικό κύτταρο και είναι αυστηρώς αερόβια.
- Η ομάδα V αντιπροσωπεύει τα θερμοφιλα είδη που μεγαλώνουν ιδανικά σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C. Όσον αφορά τη φυσιολογία και τη μορφολογία, είναι ετερογενή, αλλά τα περισσότερα είδη παράγουν ωοειδή σπόρια τα οποία διογκώνουν το μητρικό κύτταρο.
- Στην ομάδα VI βρίσκονται τα θερμοφιλα, οξεόφιλα είδη.

1.2.2 Ύπαρξη στο Περιβάλλον και τα Τρόφιμα

Τα μέλη του γένους *Bacillus* συναντώνται ευρύτατα στο περιβάλλον. Τα βακτήρια που σχετίζονται με τον *B. subtilis* απαντώνται συχνά και αναγνωρίζονται εύκολα. Το έδαφος αποτελεί “αποθήκη” για αυτά τα βακτήρια. Από το έδαφος μεταφέρονται σε διάφορα άλλα γειτονικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των

τροφίμων, των ζώων, καθώς και στη θάλασσα και τους βιοτόπους γλυκού νερού. Οι *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, και *B. subtilis* αφθονούν στο έδαφος, ιδιαίτερα σε εδάφη που είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά. Συναντώνται επίσης συχνά στο άχυρο και στα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένου του ρυζιού και των οσπρίων, όπου πιθανώς σχηματίζουν αποικίες από σωματίδια χώματος και σκόνης που μεταφέρονται με τον άνεμο. Τα ενδοσπόρια είναι σημαντικά για τη διασπορά του είδους *Bacillus* και αντιπροσωπεύουν μια μεταβολικά ανενεργή μορφή επιβίωσης. Χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή στη ζέση, την ξηρασία, την ακτινοβολία και άλλες ανεπιθύμητες περιβαλλοντικές συνθήκες. Συνήθως τα σπόρια αναβιώνουν υπό καλές περιβαλλοντικές συνθήκες που επιτρέπουν τη βλάστηση και την ανάπτυξη των κυττάρων.

Τρόφιμα ποικίλης προέλευσης και σύνθεσης μπορούν να προσφέρουν αυτές τις συνθήκες και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση ή ακόμα και σε τροφική δηλητηρίαση εξαιτίας της ανάπτυξης βακτηρίων στο τρόφιμο. Αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας του νωπού γάλακτος και μπορούν εύκολα να μολύνουν διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, προκαλώντας αλλοίωση μέσω των πρωτεολυτικών, λιπολυτικών και σακχαρολυτικών δραστηριοτήτων τους. Ο *B. cereus* έχει εντοπιστεί και καταγραφεί σε γάλα, λαχανικά και προϊόντα που βασίζονται στο κρέας. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι ένα μεγάλο πρόβλημα για τη βιομηχανία γάλακτος διότι μολύνει τους μαστούς των αγελάδων καθώς αυτές βόσκουν στα χωράφια και μπορεί να μεταφερθεί στο γάλα. Τα βακτήρια *B. licheniformis*, *B. pumilus* και *B. subtilis* είναι τα πιο κοινά είδη *Bacillus* που απομονώνονται στα αρτοποιεία και στο γάλα. (12)

1.2.3 Τροφική Δηλητηρίαση

Υπάρχουν πολλά είδη *Bacillus* τα οποία σχετίζονται με τροφικές δηλητηριάσεις, αλλά το μοναδικό είδος που προκαλεί συχνά προβλήματα είναι ο *Bacillus cereus*. Στην ομάδα του *Bacillus cereus* ανήκουν έξι είδη, συμπεριλαμβανομένου του *B. anthracis*. Όλα αυτά τα είδη μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση και στις περισσότερες περιπτώσεις δε μπορούν να διακριθούν στα κοινά εργαστήρια τροφίμων, εκτός από τον *B. anthracis*, ο οποίος συνήθως δεν είναι αιμολυτικός και είναι ευαίσθητος στην πενικιλίνη.

Ο *B. cereus* είναι ένα βακτήριο αυξανόμενου ενδιαφέροντος που προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις με αυξημένη συχνότητα τα τελευταία χρόνια. Σε μερικές χώρες όπου έχουν καταγραφεί σχετικά λίγα ξεσπάσματα καμπυλοβακτηρίωσης και σαλμονέλωσης (οι δύο πιο συχνές αιτίες βακτηριακής γαστρεντερίτιδας), έχει παρατηρηθεί σταθερή αύξηση στις περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης από *B. cereus*. Ο *B. cereus* και άλλα μέλη της ίδιας ομάδας μπορούν να προκαλέσουν δύο τύπους τροφικής δηλητηρίασης: τον διαρροϊκό τύπο και τον τύπο που προκαλεί εμετό. Ο διαρροϊκός τύπος προκαλείται από ένα σύμπλεγμα εντεροτοξινών που παράγονται κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης του *B. cereus* στο λεπτό έντερο, ενώ η τοξίνη που προκαλεί εμετό παράγεται κατά τη ανάπτυξη των κυττάρων στο τρόφιμο. Και για τους δύο τύπους τροφικής δηλητηρίασης, το τρόφιμο το οποίο καταναλώθηκε έχει συνήθως υποστεί θερμική επεξεργασία και η τροφική δηλητηρίαση προκαλείται από τα σπόρια που επιβίωσαν.

Ο *B. thuringiensis* έχει αναφερθεί ότι παράγει εντεροτοξίνες και προκαλεί συμπτώματα τροφικής δηλητηρίασης. Η εκτεταμένη χρήση αυτού του οργανισμού ως προστατευτικού παράγοντα ενάντια σε επιθέσεις εντόμων στις καλλιέργειες μπορεί να αποτελεί μέρος του αυξανόμενου προβλήματος της ομάδας του *B. cereus* που παρατηρείται στη βιομηχανία τροφίμων.

Ο *B. weihenstephanensis* είναι ψυχροανθεκτικό είδος της ομάδας του *B. cereus*, και τα περισσότερα στελέχη του είδους αυτού δεν παράγουν τοξίνες, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις. Επίσης, υπάρχουν στελέχη του *B. cereus* τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες μικρότερες των 4°C.

Τα άλλα είδη *Bacillus* που μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση απομονώνονται όλα από το έδαφος και τα τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά, σε αντίθεση με τα μέλη της ομάδας του *B. cereus*, μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών των ειδών έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση.

1.2.4 Πρόληψη και Έλεγχος της Βακτηριακής Τροφικής Δηλητηρίασης

Η πρόληψη των τροφικών δηλητηριάσεων και ο έλεγχος των ειδών του *Bacillus* είναι σχετικά εύκολος, εκτός από τη βιομηχανία γάλακτος, όπου ο *B. cereus* προκαλεί μεγάλα προβλήματα. Υπάρχει επίσης στην αγορά ένας αυξανόμενος αριθμός προμαγειρεμένων τροφίμων μακράς διάρκειας τα οποία είναι δύσκολο να παραχθούν

τελείως απαλλαγμένα από τα διάφορα είδη *Bacillus*. Αν τα τρόφιμα δεν διατηρούνται σε θερμοκρασία 6-60°C για πολύ καιρό, δε θα προκληθεί βλάστηση των σπορίων ούτε ανάπτυξη των βακτηρίων. Η άμεση ψύξη και η σωστή επαναθέρμανση του μαγειρεμένου φαγητού είναι απαραίτητα εάν το φαγητό δεν καταναλωθεί αμέσως. Η αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασίες κάτω από τους 8°C (ή προτιμότερα σε θερμοκρασία 4-6 °C ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη του *B. cereus*). Τρόφιμα με χαμηλό pH μπορούν να θεωρηθούν ασφαλή. Συνήθως, σπόρια *Bacillus* απομονώνονται από μπαχαρικά, δημητριακά και αποξηραμένα τρόφιμα.

Η πλειοψηφία των στελεχών από την ομάδα του *B. cereus* που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (συμπεριλαμβανομένου του *B. weihenstephanensis*) δεν παράγουν συνήθως εντεροτοξίνη, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις.

Τα σπόρια του *B. cereus* προσκολλούνται αρκετά σε διάφορες υδροφοβικές επιφάνειες (όπως το γυαλί και το ανοξείδωτο ατσάλι), και γι' αυτό το λόγο ο μικροοργανισμός αυτός εντοπίζεται συχνά σε φυτικές τροφές και στις κουζίνες. Προς το παρόν, ο μόνος τρόπος να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι η χρήση διαλύματος υποχλωριώδους (0,2% σε pH 7-8) ή με φως UVC, δεδομένου ότι ο καθαρισμός είτε με χαμηλό είτε με υψηλό pH δεν είναι ικανός να ελέγξει το πρόβλημα.(13)

1.2.5 Άλλες δράσεις - χρήσεις του γένους *Bacillus*

- Τα είδη του *Bacillus* χρησιμοποιούνται σε πολλές ιατρικές, φαρμακευτικές, γεωργικές και βιομηχανικές διεργασίες, καθώς έχουν το πλεονέκτημα ότι διαθέτουν μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών χαρακτηριστικών και έχουν την ικανότητα να παράγουν μια σειρά από ένζυμα, αντιβιοτικά και άλλους μεταβολίτες(14). Η βακτητρασίνη (bactitracin) και η πολυμυξίνη (polymyxin) είναι δύο γνωστά αντιβιοτικά που λαμβάνονται από τα είδη *Bacillus*. (15)
- Τα σπόρια του υποχρεωτικά θερμόφιλου *B. stearothermophilus* χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή των διαδικασιών αποστείρωσης με θερμότητα. Το υπο-είδος *B. subtilis globigii*, το οποίο είναι ανθεκτικό στη θέρμανση, στα χημικά και στην ακτινοβολία, χρησιμοποιείται ευρύτατα για να αξιολογηθούν εναλλακτικές μεθόδους αποστείρωσης και απολύμανσης με καπνό.(15)

- Τα προβιοτικά ή “φιλικά βακτήρια”, διατίθενται όλο και περισσότερο στο κοινό ως ευεργετικά λειτουργικά τρόφιμα που μπορούν να προσφέρουν μια σειρά από συγκεκριμένα οφέλη για την υγεία των καταναλωτών. Σε ορισμένες χώρες, τα προβιοτικά είναι διαθέσιμα για στοματική βακτηριοθεραπεία και βακτηριοπροφύλαξη από γαστρεντερικές διαταραχές που παρουσιάζονται στους ανθρώπους. Συχνά, αυτές οι διαταραχές, πολλές από τις οποίες οδηγούν σε διάρροια, είναι άμεσο αποτέλεσμα της χρήσης αντιβιοτικού, η οποία προκαλεί ανισορροπία στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται συνήθως ως προβιοτικά περιλαμβάνουν τους λακτοβακίλλους (*Lactobacilli*, *Enterococci*, *Streptococci*, *Bifidobacteria*). Επίσης, και διάφορα είδη *Bacillus* πωλούνται συχνά ως προβιοτικά. Αυτά αποτελούνται από παρασκευάσματα βακτηριακών σπορίων τα οποία έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να επιβιώσουν στο στομάχι. (16)
- Τέλος, η σημαντική πρόοδος που έχει συντελεστεί στον τομέα της μοριακής βιολογίας έχει αυξήσει τη χρήση του είδους *Bacillus* ακόμα και στην ετερόλογη έκφραση γονιδίων και την παραγωγή ποικιλίας πρωτεϊνών. (17)

1.3 *Bacillus subtilis*

1.3.1 Χαρακτηριστικά του Είδους

Ο *B. subtilis* είναι ένα αερόβιο, Gram-θετικό, ραβδόμορφο (περίπου 0.8μ έως 1.5μ)(18), ευκίνητο βακτήριο που διαθέτει μαστίγια, σχηματίζει ενδοσπόρια και συνήθως βρίσκεται στο έδαφος. Το όνομα του αναφέρεται σε ένα χαρακτηριστικό του γένους, τη σουμππιλισίνη (*subtilisin*). Η σουμππιλισίνη E είναι μια εξωκυττάρια αλκαλική πρωτεάση η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *aprE* και εκφράζεται ταυτόχρονα με τα πρώιμα γονίδια του σχηματισμού σπορίων. Το ότι η σουμππιλισίνη E βρίσκεται έξω από το κύτταρο, αντανakλά το γεγονός ότι ορισμένες πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτόπλασμα του *B. subtilis*, εξέρχονται κατά προτίμηση στο περιβάλλον μέσω ενός ειδικού μηχανισμού έκκρισης. (19)

Οι αποικίες του *B. subtilis* σε άγαρ είναι συνήθως μικρές, υπόλευκες, με ομαλό περίγραμμα. Είναι σύνηθες να βλέπει κανείς ζαρωμένες, ακανόνιστες αποικίες, ειδικά

μετά το μετασχηματισμό. Μετά τη γήρανση οι αποικίες σκουραίνουν λόγω του σχηματισμού των σπορίων.(18)

1.3.2 Συνθήκες Ανάπτυξης

Ο *B. subtilis* είναι αρκετά ανθεκτικός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 25-43°C, συνήθως υπό αερόβιες συνθήκες σε pH 5.5-8.5 αν και ταξινομείται ως δυνητικά αναερόβιος. Η πρότυπη συνθήκη επώασης είναι στους 37 °C με ανάδευση. Υπό αυτές τις συνθήκες και σε ένα πλούσιο θρεπτικό υλικό, ο *B. subtilis* εμφανίζει χρόνο διπλασιασμού περίπου 20-30 λεπτά.

1.3.3 Σποριογένεση

Ο *B. subtilis* συναντάται παντού στη φύση και μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί σε ποικίλες μεταβολές του περιβάλλοντος. Κάτω από στρεσογόνες συνθήκες μπορεί να επιστρατεύσει διάφορους μηχανισμούς επιβίωσης όπως η κινητικότητα, η πρόσληψη εξωγενούς DNA, ο σχηματισμός βιομεμβρανών και η σποριογένεση (20-22).

Ο σχηματισμός των σπορίων λαμβάνει χώρα στη στατική φάση ανάπτυξης υπό αερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη των ενδοσπορίων είναι μια διαδικασία μεγάλης ενεργειακής έντασης και οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων πολύπλοκων μορφολογικών δομών. Τα σπόρια που προκύπτουν κατά την σποριογένεση είναι θερμοανθεκτικά στους 80°C. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά εφικτό τον εντοπισμό και την κατηγοριοποίηση των σποριογόνων μικροοργανισμών όπως ο *B. subtilis*.(19)

1.3.4 Μεταβολισμός

Η βάση για να καταλάβουμε τις δυνατότητες του *B. subtilis* είναι η καλή γνώση του μεταβολισμού του. Τα βακτήρια αυτά, προτιμούν τα σάκχαρα και την αμμωνία ως πηγή άνθρακα και αζώτου αντίστοιχα. Η προτιμότερη πηγή άνθρακα και ενέργειας είναι η γλυκόζη. Ο περαιτέρω μεταβολισμός περιλαμβάνει τη γλυκόλυση, τη μεταβολική οδό των φωσφοπεντοζών, τον κύκλο του Krebs, καταλήγοντας στην οξειδωση της γλυκόζης

σε διοξείδιο του άνθρακα και στην παραγωγή ATP.(23)

1.3.5 Πτυχές ασφάλειας του *B. subtilis*

Σε γενικές γραμμές, το είδος αυτό χαρακτηρίζεται ως ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός, αλλά θεωρείται μη παθογόνος για τον άνθρωπο. Ωστόσο, ο *B. subtilis* πρακτικά είναι πανταχού παρόν και γι' αυτό είναι αναπόφευκτο το γεγονός ότι μερικές φορές μπορεί να βρεθεί σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς σε μολυσμένους ανθρώπους. Σε λίγες περιπτώσεις, ο *B. subtilis* βρέθηκε να σχετίζεται με ναρκομανείς ή με σοβαρά εξασθενημένους ασθενείς. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν στοιχεία παθογένειας του *B. subtilis* στους ανθρώπους γενικά.

Ο *B. subtilis* έχει απομονωθεί σε μερικές περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης, αλλά ο αριθμός των επεισοδίων είναι χαμηλός (για παράδειγμα, το αρνί και το κοτόπουλο έχουν ενοχοποιηθεί σε επεισόδια τροφικών δηλητηριάσεων). Ο μικροοργανισμός αυτός παράγει μια εξαιρετικά θερμο-σταθερή τοξίνη, η οποία μπορεί να είναι όμοια με την τοξίνη που προκαλεί εμετό και παράγεται από τον *B. cereus*. Αν και αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι πιθανόν ο *B. subtilis* είναι τοξικός, οι αναφορές που επιβεβαιώνουν αυτό το εύρημα είναι θεωρητικές και σε καμία περίπτωση οι τοξικολογικές έρευνες που διεξήχθησαν δεν ήταν πιστοποιημένες.(19)

1.3.6 Αλλοίωση Τροφίμων

Ο εντοπισμός ειδών *Bacillus* σε πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία τροφίμων γίνεται σε γενικές γραμμές σε ποσότητες κάτω από τις λοιμογόνες δόσεις που απαιτούνται για να επηρεαστεί αρνητικά η υγεία των καταναλωτών (η λοιμογόνος δόση είναι συνήθως πάνω από 10^5 κύτταρα/g ή /ml τροφίμου). Αυτό συνεπάγεται ότι τα κύτταρα του *Bacillus* ή τα σπόρια αυτού πρέπει να έχουν την ευκαιρία να πολλαπλασιαστούν στο περιβάλλον του τροφίμου ώστε να μπορούν να προκαλέσουν τροφική αλλοίωση και δηλητηρίαση.

Έχει αναφερθεί ότι ο *B. subtilis* προκάλεσε νόσο προερχόμενος από πιάτα που περιείχαν κρέας και στοιχεία από λαχανικά, θαλασσινά και ρύζι, ψωμί και προϊόντα

ζαχαροπλαστικής, σάντουιτς, και πίτσα. Η λοιμογόνος δόση ήταν $>10^5$ cfu/g με χρόνο επώασης 10 λεπτά έως 14 ώρες και η διάρκεια της ασθένειας 2-8 ώρες. Τα συμπτώματα ήταν εμετός (80%), διάρροια (49%), κοιλιακοί πόνοι/κράμπες (27%), ναυτία, πονοκέφαλοι, εξάψεις και εφίδρωση.

Τα βακτήρια αυτά είναι επίσης ικανά να προκαλέσουν αλλοίωση στο ψωμί, γνωστή ως ιξώδης αλλοίωση (ropiness). Η ιξώδης αλλοίωση είναι η πιο σημαντική αλλοίωση του ψωμιού μετά το μούχλιασμα και συμβαίνει κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες όπου οι κλιματικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων, κυρίως του *B. subtilis*. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων στο λευκό αλεύρι και στο αλεύρι ολικής άλεσης που έχουν παραχθεί χωρίς συντηρητικά ή προζύμι ήταν σταθερά 10^6 cfu/g μετά από αποθήκευση 2 ημερών σε καλοκαιρινή θερμοκρασία περιβάλλοντος. (12)

1.3.7 Άλλες Δράσεις – Χρήσεις του *B. subtilis*

- **Βιοέλεγχος**

Ο Gram⁺ μικροοργανισμός-πρότυπο *B. Subtilis* (24), αναγνωρίζεται πλέον ως ένα ισχυρότατο εργαλείο για την εφαρμογή βιοελέγχου στις καλλιέργειες. Ως βιοέλεγχος (biocontrol) ορίζεται η χρήση μη παθογόνων βακτηρίων που κατοικούν στο έδαφος για την καταστολή ασθενειών που προκαλούνται από διάφορα φυτοπαθογόνα, μέσω της παραγωγής ευρείας γκάμας αντιμικροβιακών παραγόντων (25), του ανταγωνισμού για τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στη γύρω περιοχή (26),(27) και της ενεργοποίησης του αμυντικού συστήματος του ξενιστή μέσω της λεγόμενης προκλητής συστημικής αντίστασης (ISR). Ως ένα ριζοβακτήριο που κατοικεί στο χώμα και συναντάται φυσιολογικά σε άμεση γειτνίαση με τις ρίζες φυτών, ο *B. Subtilis* έχει την ικανότητα να διατηρεί σταθερή επαφή με τα φυτά αυτά και να προάγει την ανάπτυξή τους. Επιπρόσθετα, λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών στους οποίους μπορεί να επιβιώσει, της ικανότητάς του να σχηματίζει ενδοσπόρια αλλά και να παράγει διάφορα αντιβιοτικά με δραστηριότητα ευρέως φάσματος, ο *B. Subtilis* καθώς και άλλα μέλη του γένους *Bacillus*, αποτελούν πιθανότατα χρήσιμους παράγοντες βιοελέγχου.

Πιο συγκεκριμένα, ο *B. subtilis* έχει βρεθεί ότι κατέχει κατασταλτικές ιδιότητες έναντι περισσότερων των 23 τύπων φυτικών παθογόνων in vitro, λόγω της ικανότητάς του να

παράγει μεγάλη αφθονία αντιβιοτικών με εξαιρετική ποικιλία στη δομή και τη δράση τους (28). Αυτά περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο πεπτιδία που είναι είτε ριβοσωμιακής προέλευσης είτε παράγονται μη ριβοσωμιακά. Τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν την αποτελεσματικότητά τους είναι το ευρύ φάσμα δραστηριότητάς τους αλλά και η αντοχή τους στην υδρόλυση από πεπτιδάσες και πρωτεάσες. Η δράση τους είναι επίσης ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες και σε ένα μεγάλο εύρος διακύμανσης του pH (29). Όλα τα γονίδια που συμμετέχουν στην παραγωγή αντιβιοτικών από τον *B. subtilis*, συνδυασμένα έχουν μέγεθος γύρω στις 350kb. Ωστόσο, δεδομένου ότι κανένα στέλεχος δεν τα έχει όλα μαζί, κατά μέσο όρο μόνο το 4-5% του γονιδιώματος του *B. subtilis* σχετίζεται με την παραγωγή αντιβιοτικών. (28)

Ένα μεγάλο μέρος των αντιβιοτικών αυτών συντίθεται εξωριβοσωμιακά και αποτελούν κυρίως λιποπεπτιδία, τα οποία σχηματίζονται από μεγάλα πολυένζυμα, τις μη ριβοσωμιακές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPSs) (30). Αυτά τα ένζυμα μπορούν εύκολα να υποστούν γενετικούς χειρισμούς με σκοπό τη δημιουργία νέων αντιβιοτικών με νέες ιδιότητες(31). Αυτή μπορεί να αποτελέσει και μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στον τομέα του βιοελέγχου των φυτών. (32)

- **Βιοϋμένια (Biofilms)**

Τα βιοϋμένια αποτελούν ομάδες μικροοργανισμών οι οποίοι 'κολλάνε' μεταξύ τους, σχηματίζουν 'κοινότητες' με ιδιαίτερη δομή και ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες, και αποτελούν επικρατούσα μορφή ύπαρξης των μικροοργανισμών σε κάθε οικοσύστημα. Η διαδικασία της προσκόλλησης σε μία επιφάνεια και δημιουργίας βιοϋμενίου αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική επιβίωσης που αξιοποιείται από όλα σχεδόν τα βακτήρια και έχει διατηρηθεί εδώ και εκατομμύρια χρόνια (33). Αντίστοιχα και ο *B. subtilis* σχηματίζει εύρωστα βιοϋμένια τόσο σε βιοτικές όσο και σε αβιοτικές επιφάνειες. Ωστόσο, στις εργαστηριακές συνθήκες, η πιο κοινή μορφή αυτών των δομών είναι οι βιομεμβράνες που σχηματίζονται και επιπλέουν στο σημείο επαφής του υγρού με τον αέρα.(32)

1.4 Αντικείμενο της Έρευνας

Η μελέτη αυτή παρέχει εκτίμηση της φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis* σε διαφορετικές συνθήκες επώασης. Ο σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός των ακραίων τιμών pH (minimum και maximum) στις οποίες είναι δυνατό να αναπτυχθεί ο *B. subtilis* και των πιθανών μεταβολών της κινητικής ανάπτυξής του όταν το θρεπτικό υλικό χαρακτηρίζεται από διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (δισακχαρίτης) και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Να σημειωθεί ότι το εύρος των τιμών pH, σακχαρόζης και NaCl καθορίστηκε με βάση το αντίστοιχο εύρος τιμών που συναντάται στην πλειοψηφία των διαφόρων τροφίμων, καθώς θέλαμε να προσομοιάσουμε τις συνθήκες των πειραμάτων με αυτές που υπάρχουν στα τρόφιμα.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις TSB εμβολιασμένου με *B. subtilis*. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με TSA, μετά από επώασή τους στους 30°C για 24 ώρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, ενώ σε κάθε δειγματοληψία μετρήθηκε το pH με ειδικό ηλεκτρονικό πεχάμετρο.

Παράλληλα με το μικροβιολογικό έλεγχο, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των εμβολιασμένων θρεπτικών υλικών σε διάφορες (δεκαδικές) αραιώσεις με τη χρήση μικροπλακέτας 96 βοθρίων (μέγιστης χωρητικότητας 300μl/βοθρίο) και του αντίστοιχου μηχανήματος μέτρησης οπτικής πυκνότητας.

Τέλος, προσδιορίστηκαν ορισμένα προϊόντα του μεταβολισμού του *B. subtilis* με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με βάση τη μέθοδο που ακολουθήθηκε στο άρθρο A. Lianou, K. P. Koutsoumanis, Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food microbiology* **28**, 828-837 (2011).

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Τεχνικές και Μέθοδοι

2.1.1 Μοντελοποίηση Μικροβιακών Επιδράσεων στα Τρόφιμα – Οπτική Πυκνότητα

Μία από τις πιο απλές μεθόδους για τη συλλογή δεδομένων είναι η χρήση της *οπτικής πυκνότητας* (optical density, OD), όπου η ανάπτυξη μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση της θολερότητας της μικροβιακής καλλιέργειας. Η οπτική πυκνότητα, ή απορρόφηση, είναι η μέτρηση του ποσού φωτός που απορροφάται ή διαχέεται από ένα διάλυμα με βακτήρια. Τα βακτήρια απορροφούν ή διαχέουν το φως ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, το μέγεθος και το σχήμα. Σύμφωνα με το νόμο του Beer, η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης, και σχετίζεται με το ποσοστό μεταδιδόμενου φωτός (%T) σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$OD=2-\log_{10}(\%T)$$

Υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί που σχετίζονται με αυτή την προσέγγιση για τη συλλογή δεδομένων. Αποκλίσεις από τα αποτελέσματα που προβλέπονται από το νόμο του Beer συμβαίνουν σε υψηλές πυκνότητες κυττάρων, απαιτώντας να γίνουν αραιώσεις για $OD < 0.3$ προτού ληφθούν ακριβείς μετρήσεις απορρόφησης.

Επιπρόσθετα, οι μέθοδοι οπτικής πυκνότητας είναι μόνο συγκριτικοί και δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προβλέψουν ζωντανούς πληθυσμούς, εκτός αν έχει γίνει κάποια προσπάθεια βαθμονόμησης. Ανιχνεύσιμες αλλαγές απορρόφησης παρατηρούνται στην ελάχιστη βακτηριακή συγκέντρωση των 10^6 cfu/ml, ανάλογα με την ευαισθησία του οργάνου. Γραμμική σχέση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας και των ζωντανών πληθυσμών υπάρχει μόνο μεταξύ του ορίου ανίχνευσης και των $10^{7.5}$ cfu/ml περίπου.

Με τη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα στα περισσότερα θρεπτικά υλικά να περιορίζεται στα 10^9 cfu/ml περίπου, το μ που μετράται χρησιμοποιώντας την οπτική πυκνότητα αντιπροσωπεύει το ρυθμό προς το τέλος της φάσης ανάπτυξης, ο οποίος θα είναι μικρότερος από το *μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης* (μ_{max}) που παρατηρείται κατά το μέσον της εκθετικής φάσης της καμπύλης ανάπτυξης Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι η

ανικανότητα διάκρισης των νεκρών και των ζωντανών κυττάρων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των κυττάρων. Επιπλέον, οι βακτηριακές καλλιέργειες που αλλάζουν τη μορφολογία των κυττάρων κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, π.χ. επιμήκη κύτταρα *L. monocytogenes* σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, πάλι οδηγούν σε υπερεκτίμηση του αριθμού των κυττάρων.(34)

- Για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων μας, χρησιμοποιήθηκαν μικροπλακέτες των 96 βοθρίων (96-well microtiter plates) οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ένα αυτόματο σύστημα Multi-mode microplate Reader (Synergy HT, BioTek) σε θερμοκρασία επώασης 30°C. Οι μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) ελήφθησαν σε κανονικά χρονικά διαστήματα (15min) στα 600nm, για συνολική χρονική περίοδο τέτοια ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση σημαντικής αλλαγής στην οπτική πυκνότητα, εφόσον ήταν δυνατόν, για όλες τις αραιώσεις της καλλιέργειας. Πριν από τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας οι μικροπλακέτες είχαν ανακινηθεί για 10sec σε μέτρια ένταση.



Εικόνα 2.1 Όργανο μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD)

2.1.2 Μέθοδος Υπολογισμού μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max})

Παίρνουμε τον άξονα $x(t)$ ως μία μεταβλητή που εξαρτάται από το χρόνο και που περιγράφει τη μεταβολή μιας συγκεκριμένης ουσίας όπως η βιομάζα ή η συγκέντρωση κυττάρων. Ο στιγμιαίος ρυθμός αύξησης της επεξεργασίας είναι η παράγωγος του $x(t)$: $dx(t)/dt$. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης, $\mu(t)$, ορίζεται ως :

$$\mu(t) = \frac{\frac{dx(t)}{dt}}{x(t)}$$

Εάν το $x(t)$ εκφράζει τη συγκέντρωση κυττάρων σε μία καλλιέργεια βακτηρίων, τότε ο ρυθμός ανάπτυξης εννοείται ως η απόλυτη ανάπτυξη της συγκέντρωσης κυττάρων ανά μονάδα χρόνου. Ένας απλός υπολογισμός δείχνει ότι, εάν $x(t)$ είναι θετικό, τότε :

$$\mu(t) = \frac{d(\ln x(t))}{dt}$$

Ως εκ τούτου, ο ειδικός ρυθμός αύξησης μπορεί να θεωρηθεί ως η κλίση της καμπύλης ανάπτυξης όπου, ο φυσικός λογάριθμος του $x(t)$ αναπαρίσταται γραφικά συναρτήσει του χρόνου. Εάν ο \log_{10} χρησιμοποιείται αντί του φυσικού λογαρίθμου τότε, η μετρηθείσα κλίση θα είναι $\ln(10) \approx 2.3$ φορές μικρότερη από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. (35)

- Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{\max}) του μικροοργανισμού στις διαφορετικές συνθήκες επώασης εκτιμήθηκε από τους χρόνους ανίχνευσης (DT) των διαδοχικά αραιωμένων καλλιεργειών (36). Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των δεκαδικών αραιώσεων, η οποία έχει αποδειχτεί ότι παρέχει ακριβείς εκτιμήσεις για τις τιμές του μ_{\max} , (36, 37), οι χρόνοι ανίχνευσης (ώρες) των πέντε διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων απεικονίστηκαν συναρτήσει του φυσικού λογάριθμου των αρχικών βακτηριακών συγκεντρώσεων ($\ln \text{cfu/well}$), και οι τιμές του μ_{\max} προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της γραμμικής παλινδρόμησης βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\ln(N_i) = k - \mu_{\max} \cdot DT_i$$

με το χρόνο ανίχνευσης (DT) να ορίζεται γενικά ως ο χρόνος που απαιτείται για να παρατηρηθεί μια συγκεκριμένη αύξηση οπτικής πυκνότητας. (38)

2.1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και σήμερα εφαρμόζεται ευρύτατα σε διαχωρισμούς και καθαρισμούς σε διάφορους τομείς συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών, βιοτεχνολογικών, περιβαλλοντικών βιομηχανιών και των βιομηχανιών τροφίμων.

Η HPLC αποτελεί πλέον την κύρια επιλογή για ανάλυση μια μεγάλης ποικιλίας συστατικών. Το κύριο πλεονέκτημα σε σχέση με την Αέρια Χρωματογραφία (GC) είναι ότι οι παράγοντες που αναλύονται, δε χρειάζεται να είναι πτητικοί και έτσι ακόμα και τα μακρομόρια είναι κατάλληλα για ανάλυση με HPLC. Η ανάλυση με HPLC επιτυγχάνεται με την έγχυση μικρής ποσότητας από το υγρό δείγμα μέσα στην κινητή φάση, η οποία περνάει μέσα από μία στήλη “πακεταρισμένη” με τη στατική φάση.

Γενικά, η HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό οργανικών, ανόργανων, βιολογικών ουσιών, πολυμερών και θερμικά ασταθών συστατικών με ποιοτικές και ποσοτικές μεθόδους.

➤ Στο εργαστήριο, τα κύρια καρβοξυλικά οξέα και η γλυκόζη των δειγμάτων προσδιορίστηκαν με χρωματογραφική μέθοδο αποκλεισμού ιόντων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παρακάτω άρθρο De Benedictis et al. (2011) (39).

Η οργανολογική διάταξη αποτελούταν από: μία αντλία PU-980 (Jasco), ένα φούρνο στήλης (μοντέλο 7990, Jones Chromatography), έναν αυτόματο δειγματολήπτη (AS-2055, Jasco), έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RI-2031 (Jasco), έναν ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) MD-910 (Jasco) στα 210nm και ένα σύστημα δεδομένων χρωματογραφίας ChromNav (Jasco). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε με χρήση στήλης Aminex HPX-87H (300 mm X 7.8 mm I.D., BIO-RAD). Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 65°C. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.045N H₂SO₄ με 6% ακετονιτρίλιο (v/v) και ο ρυθμός ροής ήταν 0.3 ml/λεπτό. Ο όγκος των ενέσιμων δειγμάτων ήταν 20μl.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με χρήση διαλυμάτων οξέων και σακχάρων βαθμού καθαρότητας HPLC (Merck) παρασκευασμένα με οξικό νάτριο (Merck), L-(+)-γαλακτικό οξύ (Supelco) και γλυκόζη (Supelco). Ο ποσοτικός και ο ποιοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στις μετρήσεις των εμβαδών των κορυφών και των χρόνων έκλουσης.

Όλα τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με RC φίλτρα των 0.22 μ m (Mini-UniPrep, Whatman)



Εικόνα 2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή PDA

2.1.4 Ενεργότητα Νερού (a_w)

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε διάφορα τρόφιμα χρειάζονται νερό στην κατάλληλη μορφή ώστε να αναπτυχθούν. Ο έλεγχος της 'υγρασίας' ενός τροφίμου, δηλαδή της περιεκτικότητάς του σε νερό, αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησης τροφίμων. Γενικά, οι μικροβιολόγοι περιγράφουν τις ανάγκες των μικροοργανισμών για νερό με τον όρο *ενεργότητα νερού* (a_w) του τροφίμου ή του περιβάλλοντος. Η ενεργότητα νερού καθορίζεται ως ο λόγος της πίεσης ατμών του

νερού του τροφίμου που μελετάμε ως προς την πίεση ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία (40):

$$a_w = p/p_o$$

όπου p η πίεση ατμών του διαλύματος και p_o η πίεση ατμών του διαλύτη (συνήθως νερό).

Η a_w του καθαρού νερού ισούται με 1.00 και η a_w ενός πλήρως αφυδατωμένου τροφίμου ισούται με 0.00. Η a_w ενός τροφίμου σε αυτήν την κλίμακα μεταξύ 0.00 και 1.00 σχετίζεται με την ισοδύναμη σχετική υγρασία αυτού σε μία κλίμακα 0-100%. Η a_w περιγράφει το βαθμό στον οποίο το νερό είναι προσδεδμεμένο στο τρόφιμο, τη διαθεσιμότητά του στο να συμμετέχει σε χημικές/βιοχημικές αντιδράσεις και τη διαθεσιμότητά του στην προαγωγή της ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Τα περισσότερα φρέσκα τρόφιμα όπως το φρέσκο κρέας, τα λαχανικά και τα φρούτα, έχουν τιμές a_w που βρίσκονται κοντά στο βέλτιστο επίπεδο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (0,97-0,99). Η a_w μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους όπως η προσθήκη υδατοδιαλυτών ουσιών (π.χ. αλάτι), φυσικής απομάκρυνσης του νερού μέσω ξήρανσης ή ψησίματος, ή με την πρόσδεση του νερού σε διάφορα μακρομοριακά συστατικά του τροφίμου(41).

Οι μικροοργανισμοί αντιδρούν διαφορετικά στην a_w του περιβάλλοντος ανάλογα με μια σειρά παραγόντων. Η μικροβιακή ανάπτυξη, και σε ορισμένες περιπτώσεις η παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών, μπορεί να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε αλλαγές της a_w . Γενικά υπάρχουν βέλτιστα και ελάχιστα επίπεδα a_w για την αύξηση των μικροοργανισμών σε συνάρτηση με τη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων στο περιβάλλον τους. Για παράδειγμα τα Gram(-) βακτήρια είναι γενικά πιο ευαίσθητα στις χαμηλές τιμές a_w σε σχέση με τα Gram(+) βακτήρια(41).

- Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο και συγκεκριμένα σε αυτά όπου προσθέσαμε ποσότητα σακχάρου και σε αυτά που προσθέσαμε ποσότητα NaCl, μετρήσαμε την ενεργότητα νερού των ρυθμισμένων TSB με μετρητή ενεργότητας νερού (Decagon Devices, Pawkit) ακρίβειας $\pm 0.02 a_w$ και εύρους 0.00-1.00 a_w .



Εικόνα 2.3 Μετρητής ενεργότητας νερού (a_w)

2.1.5 Σημασία του pH

Η αύξηση της οξύτητας των τροφίμων, είτε μέσω της ζύμωσης είτε μέσω της προσθήκης ασθενών οξέων σε αυτά, έχει χρησιμοποιηθεί συχνά στο παρελθόν ως μέθοδος συντήρησης. Στη φυσική τους κατάσταση, τα περισσότερα τρόφιμα όπως το κρέας, τα ψάρια και τα λαχανικά, είναι ελαφρώς όξινα ενώ τα περισσότερα φρούτα είναι μετρίως όξινα. Λίγα τρόφιμα όπως το ασπράδι του αυγού είναι αλκαλικά.

Το pH είναι δείκτης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου στο τρόφιμο σύμφωνα με τον τύπο:

$$pH = -\log_{10}([H^+])$$

Είναι πλέον γνωστό ότι οι διάφορες ομάδες μικροοργανισμών έχουν τιμές pH βέλτιστες, ελάχιστες και μεγίστων για την ανάπτυξή τους στα τρόφιμα αλλά και στο εργαστήριο. Το pH ενός τροφίμου αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες όπως η ενεργότητα νερού (a_w), η αλατότητα, η θερμοκρασία, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και

τα συντηρητικά, ώστε συνεργιστικά να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε αυτό. Επίσης το pH του τροφίμου επηρεάζει και την ευαισθησία στη θερμότητα των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αυτό (41).

Σε γενικές γραμμές, τα παθογόνα δεν αναπτύσσονται ή αναπτύσσονται πολύ αργά σε επίπεδα pH κάτω του 4.6 αν και υπάρχουν και εξαιρέσεις. Πολλά παθογόνα μπορούν να επιβιώσουν σε τρόφιμα όπου τα επίπεδα pH βρίσκονται εκτός των ελαχίστων και μέγιστων τιμών που απαιτούνται για την ανάπτυξή (42). Εύλογα προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η αλλαγή του pH ενός τροφίμου μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτό.

- Κατά την πειραματική διαδικασία, μετρήθηκε το pH στα διαλύματα χρησιμοποιώντας ψηφιακό πεχάμετρο με ηλεκτρόδιο για υγρά δείγματα (Russell model RL160).



Εικόνα 2.4 Ηλεκτρονικό πεχάμετρο με ηλεκτρόδιο.

2.2 Πειραματική Μέθοδος

2.2.1 Βακτηριακό στέλεχος και Προετοιμασία Εμβολίου

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είχε απομονωθεί από παστεριωμένη κρέμα με γεύση βανίλια και ταυτοποιηθεί ως *Bacillus subtilis*. Οι καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη (4°C) σε τρυβλία με Tryptone Soy Agar (0.5% NaCl) (TSA, Lab M). Το στέλεχος ενεργοποιήθηκε με μεταφορά 1 αποικίας σε 10ml Tryptic Soy Broth (0.5% NaCl, 0.25% Γλυκόζη) (TSB, Biolife) και επώαση για 24 ώρες στους 30°C. Ποσότητα 100μl μεταφέρθηκε σε 10ml φρέσκου TSB και επώαστηκε για 24 ώρες στους 30°C για να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των εμβολίων. Από το TSB ελήφθη 1ml και μεταφέρθηκε σε 9ml Ringer (Ringer's Solution (1/4 Strength) Tablets, Lab M) για περαιτέρω αραιώση και επίστρωση σε τρυβλία με TSA, ενώ τα υπόλοιπα 9ml TSB φυγοκεντρήθηκαν (6000rpm, 20min, 4°C). Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και έγινε επανασύσταση των βακτηριακών κυττάρων σε TSB (9ml) με χαρακτηριστικά ανάλογα του πειράματος ανάπτυξης που πραγματοποιήθηκε κάθε φορά.(38)

2.2.2 Πειράματα ανάπτυξης

Στοχεύοντας στην αξιολόγηση των επιδράσεων του pH και του NaCl στην αναπτυξιακή κινητική συμπεριφορά του γένους *Bacillus subtilis*, το τελευταίο αξιολογήθηκε σε TSB με: **(i)** pH 4.0, 4.5, 5.0, 7.0, 8.0, 9.0, 9.5 και 0.5% NaCl **(ii)** pH 7.0 και 0.5%(w/v) NaCl (βέλτιστες συνθήκες επώασης) **(iii)** pH 7.0 και σακχαρόζη σε συγκεντρώσεις 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%, 40.0% και **(iv)** pH 7.0 και NaCl σε συγκεντρώσεις 2.0%, 4.0%, 6.0% και 8.0%. Οι παραπάνω τιμές pH και συγκεντρώσεις σακχαρόζης και NaCl επιλέχθηκαν έτσι ώστε, οι περιοχές ανάπτυξης του *B. subtilis*, στις συνθήκες αυτών των τριών συνθηκών ανάπτυξης, να έχουν καλυφθεί στο μεγαλύτερο δυνατόν βαθμό. Το χαμηλότερο pH (4.0) και η υψηλότερη συγκέντρωση σακχαρόζης (40%) και NaCl (6.0%), τα οποία αξιολογήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, βασίστηκαν στα ευρήματα προκαταρκτικών πειραμάτων ως συνθήκες οι οποίες, στο πλαίσιο της μεθόδου των δεκαδικών αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, μπορούν να προσεγγίσουν περισσότερο τις ελάχιστες (minimum) απαιτήσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού.(38)

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια της μελέτης αυτής ήταν Tryptic Soy Broth (TSB) με pH 7.4 ± 0.2 και συγκέντρωση (w/v) NaCl 0.5% ως μέρος της βασικής σύνθεσης. Το pH του TSB ρυθμίστηκε στις παραπάνω τιμές με προσθήκη HCl (10N) ή NaOH (10N) πριν την αποστείρωση και μετρήθηκε πριν και μετά την αποστείρωση. Μετρήσεις του pH έγιναν επίσης στα πλαίσια κάθε δειγματοληψίας. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις σακχαρόζης παρασκευάστηκαν με προσθήκη σακχαρόζης (D(+)-Sucrose, BioChemica AppliChem Panreac ITW Reagents), ενώ οι συγκεντρώσεις του άλατος επιτεύχθηκαν με την προσθήκη, στο θρεπτικό υλικό, των απαιτούμενων ποσοτήτων NaCl. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές της ενεργότητας νερού (a_w) ήταν οι ακόλουθες (ενδεικτικά): 0.99 (20% Sucrose, 27.4°C), 0.99 (40% Sucrose, 27.4°C), 1.00 (2.0% NaCl, 27.4°C), 0.99 (4.0% NaCl, 27.4°C) και 0.98 (6% NaCl, 27.4°C). (38)

Κάθε καλλιέργεια αραιώθηκε δεκαδικά σε TSB με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, ανάλογα με το πείραμα ανάπτυξης που πραγματοποιήθηκε, σε συγκέντρωση περίπου 10^7 cfu/ml. Κατόπιν, 30ml από τις καλλιέργειες, οι οποίες είχαν υποστεί πέντε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, προστέθηκαν σε 270ml TSB με τα παραπάνω χαρακτηριστικά κατανομημένα σε μικροπλακέτες. Εξαιρώντας την πρώτη αραιώση, οι υπόλοιπες αραιώσεις για κάθε καλλιέργεια επιτεύχθηκαν με τη μεταφορά ποσότητας 30ml από το ένα βοθρίο στο επόμενο, ενώ 30ml από την πέμπτη αραιώση απορρίφθηκαν ούτως ώστε, όλα τα βοθρία να περιέχουν τον ίδιο όγκο καλλιέργειας (270ml). Με αυτό τον τρόπο, το εύρος των αρχικών συγκεντρώσεων των βακτηρίων που ελήφθησαν στις μικροπλακέτες ήταν περίπου 10^5 - 10^6 cfu/well. Στις περιπτώσεις των τριών διαλυμάτων όπου αναμενόταν μικρή ανάπτυξη του μικροοργανισμού [pH 4.5 (0.5% NaCl), pH 9.0 (0.5% NaCl) και 8.0% NaCl (pH 7.0)] πραγματοποιήθηκαν δυαδικές αραιώσεις και όχι δεκαδικές, προκειμένου να είναι δυνατή η καταγραφή της μεταβολής αυτής. Έτσι, κάνοντας δυαδικές αραιώσεις, μεταφέρθηκαν 150ml ρυθμισμένου TSB και 150ml από τις καλλιέργειες.

Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα σε κάθε μία συνθήκη ανάπτυξης και αναλύθηκαν δύο δείγματα σε κάθε πείραμα ($n=4$). (38)

2.2.3 Ανάλυση δειγμάτων με HPLC

Στα πλαίσια κάθε δειγματοληψίας, ελήφθησαν 5-10ml εμβολιασμένου TSB και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη. Στο τέλος όλων των πειραμάτων, τα δείγματα αυτά επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια 1ml από το καθένα μεταφέρθηκε σε πλαστικά vials μέγιστης χωρητικότητας 2ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (6000rpm, 10λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο υγρό φιλτραρίστηκε με φίλτρα και τοποθετήθηκε σε γυάλινα vials κατάλληλα για χρήση στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για διαφορετικές τιμές pH. Ο όρος *cfu/ml* περιγράφει τη μέση τιμή των αποικιών που μετρήθηκαν στις καλλιέργειες των τρυβλίων, μετά από αναγωγή της στον όγκο του 1ml. Το μ_{max} υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2 Μέθοδος Υπολογισμού μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}).

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα δεδομένα από τις δειγματοληψίες του πειράματος ανάπτυξης του *B. Subtilis* στις βέλτιστες (optimum) συνθήκες, δηλαδή σε θρεπτικό υλικό (TSB) με pH 7.0, 0.5% NaCl και επώαση στους 30°C. Σε κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε μετρήθηκε παράλληλα και το pH.

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα δεδομένα των πειραμάτων που περιελάμβαναν προσθήκη ποσότητας σακχαρόζης στο θρεπτικό υλικό (TSB). Οι συγκεντρώσεις σακχαρόζης που παρασκευάστηκαν ήταν: 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0% και 40.0%. Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της σακχαρόζης, δεν μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών καθώς τα διαλύματα είχαν μεγάλο ιξώδες και θα υπήρχε μεγάλο σφάλμα στα αποτελέσματα του οργάνου.

Στο Γράφημα 3.1 απεικονίζεται η μεταβολή του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) του *B. subtilis* συναρτήσεως του pH (0.5% NaCl, 30°C), σύμφωνα με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Στο Γράφημα 3.2 απεικονίζεται η μεταβολή του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) του *B. subtilis* συναρτήσεως της συγκέντρωσης NaCl (%) (pH 7.0, 30°C), σύμφωνα με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Στο Γράφημα 3.3 απεικονίζεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου (ώρες), όταν ο *B. subtilis* αναπτύσσεται σε TSB με pH 7.0, 0.5% NaCl και σε θερμοκρασία 30°C, σύμφωνα με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Στο Γράφημα 3.4 απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού του *B. subtilis* συναρτήσει του χρόνου (ώρες) όταν αναπτύσσεται σε TSB με pH 7.0, 0.5% NaCl και σε θερμοκρασία 30°C, σύμφωνα με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν. Ο πληθυσμός που μετρήθηκε στις καλλιέργειες εκφράζεται ως log(cfu/ml).

Στο Γράφημα 3.5 απεικονίζεται με μορφή καμπύλης η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών συναρτήσει του χρόνου, σε συνθήκες ανάπτυξης pH 7.0, 0.5% NaCl και θερμοκρασία επώασης 30°C.

<i>pH</i>	<i>Χρόνος (ώρες)</i>	<i>cfu/ml</i>	<i>Log (cfu/ml)</i>	$\mu_{\max}(\text{ώρες}^{-1})$
4	0	87	1.94	-
	24	1	0.00	
4.5	0	65	1.81	-
	24	1793	3.25	
5	0	133	2.12	0.97306644
	24	3733334	6.57	
7	0	88	1.94	1.29573814
	24	8100000	6.91	
8	0	53	1.72	1.27564107
	24	35200000	7.55	
9	0	120	2.08	-
	24	34150000	7.53	
9.5	0	50	1.70	-
	24	μη μετρήσιμα	-	

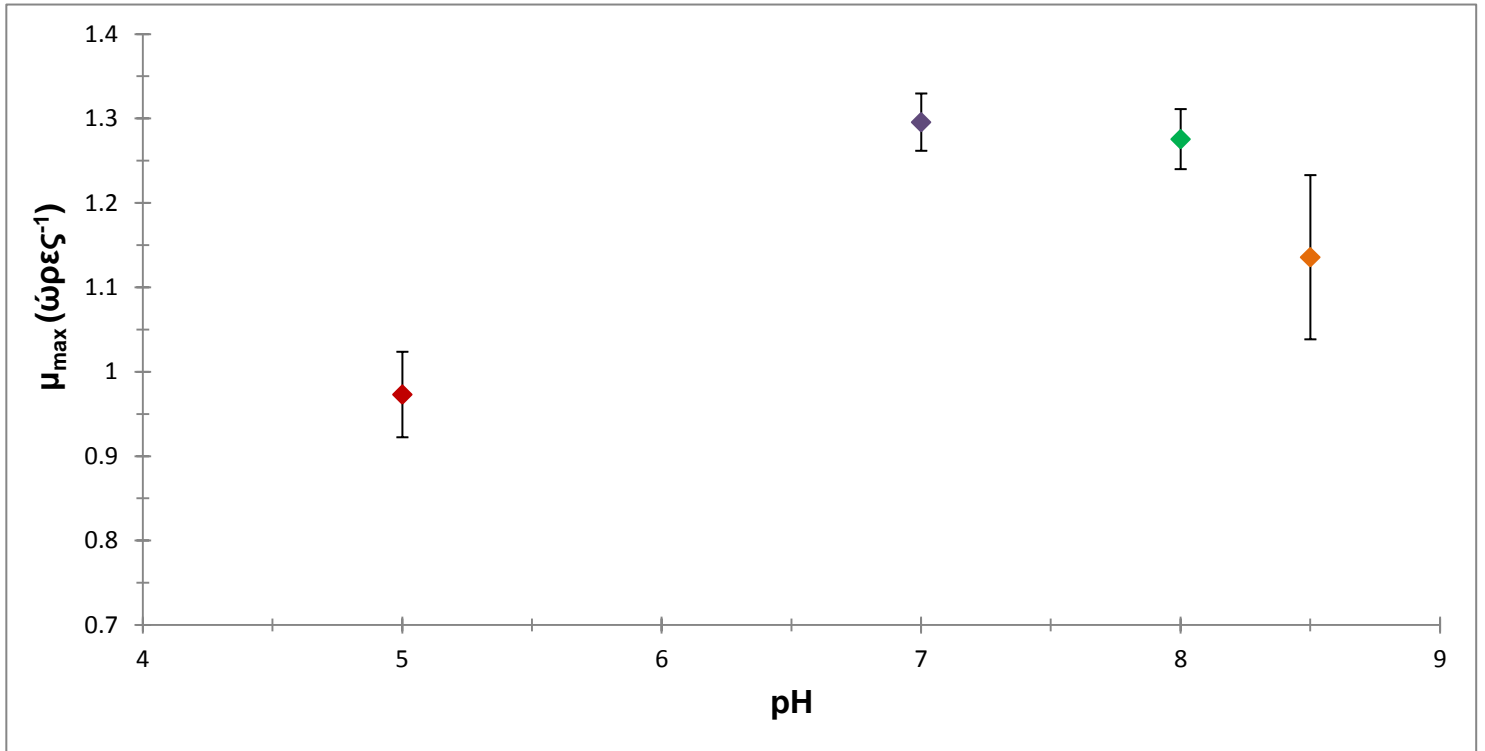
Πίνακας 3.1 Δεδομένα πειραμάτων ανάπτυξης του *B. subtilis* σε TSB με διαφορετικές τιμές pH και 0.5% NaCl.

Χρόνος (ώρες)	cfu/ml	Log(cfu/ml)	pH
0	270	2.43	6.99
2	418	2.62	6.95
4	3800	3.58	6.95
6	33000	4.52	6.96
8	256584	5.41	6.96
10	1743334	6.24	6.97
24	221500000	8.35	6.07
30	270000000	8.43	6.23

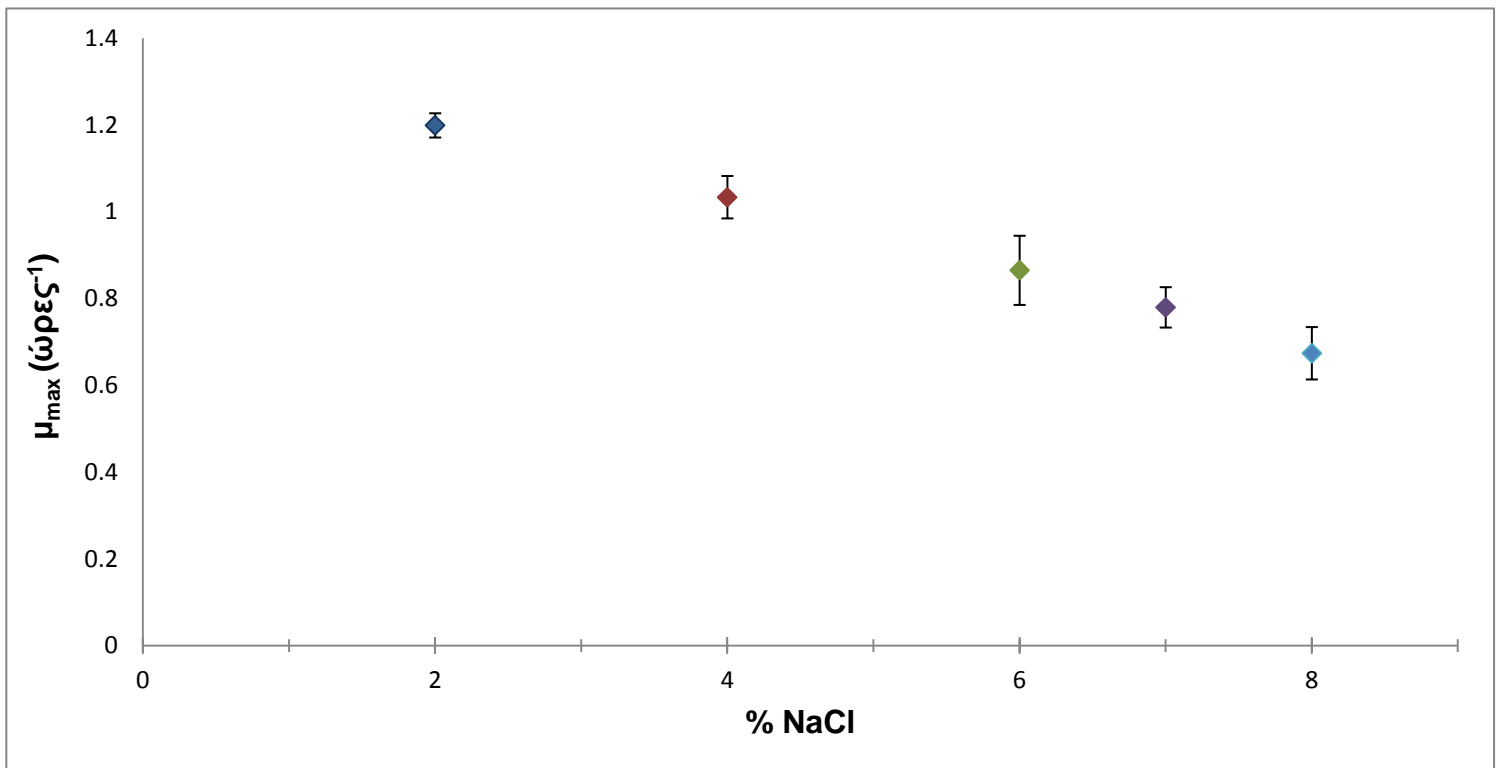
Πίνακας 3.2 Δεδομένα πειράματος ανάπτυξης του *B. subtilis* σε TSB με pH 7.0, 0.5% NaCl και θερμοκρασία επώασης 30°C.

Σακχαρόζη (%)	Χρόνος (ώρες)	cfu/ml	Log (cfu/ml)
2.5	0	108	2.03
	12	8960000	6.95
	24	91750000	7.96
	36	23250000	7.37
5	0	83	1.92
	6	1700	3.23
	12	7217500	6.86
	24	67250000	7.83
	36	31000000	7.49
10	0	86	1.93
	6	3000	3.48
	12	3465000	6.54
	24	69750000	7.84
	36	49000000	7.69
20	0	210	2.32
	6	3400	3.53
	12	1186667	6.07
	24	72333334	7.86
40	0	375	2.57
	6	264	2.42
	12	185500	5.27
	24	89000000	7.95

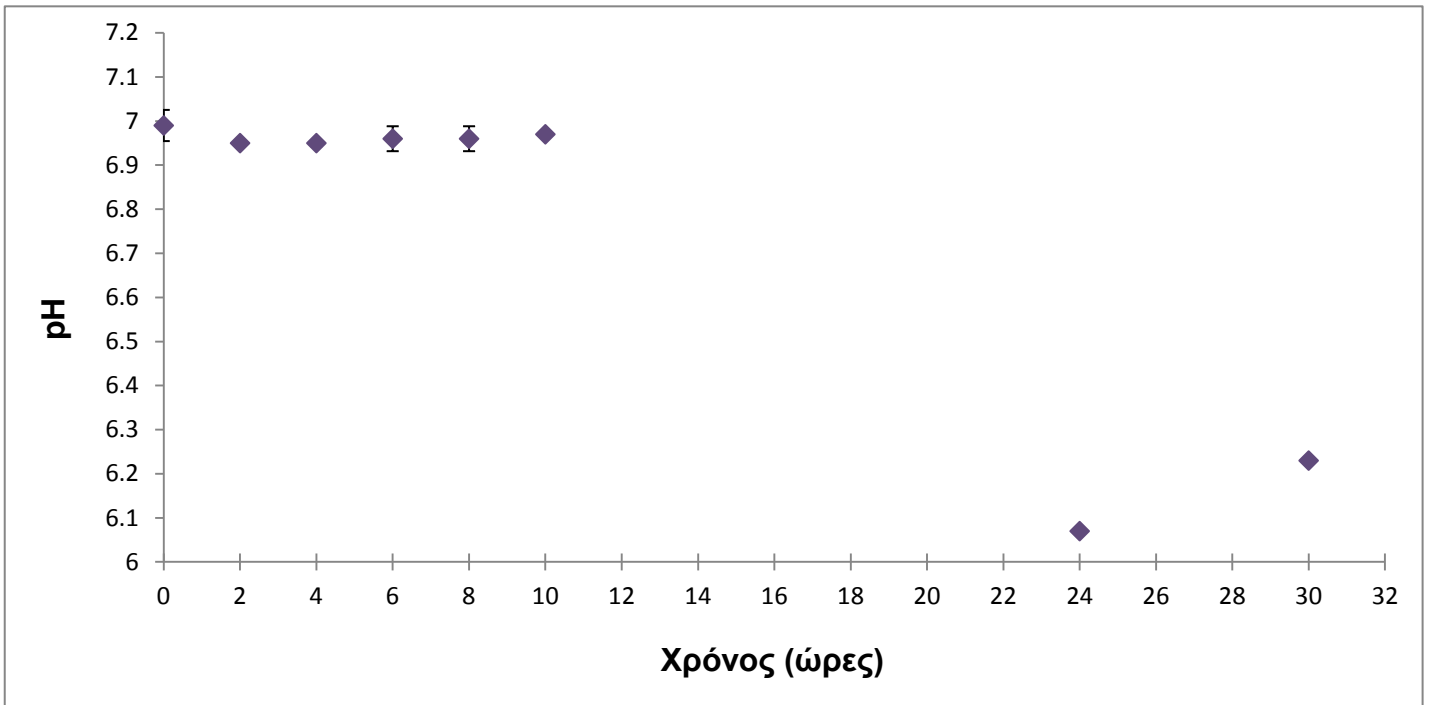
Πίνακας 3.3 Δεδομένα πειράματος ανάπτυξης του *B. subtilis* σε θρεπτικό υλικό που περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης.



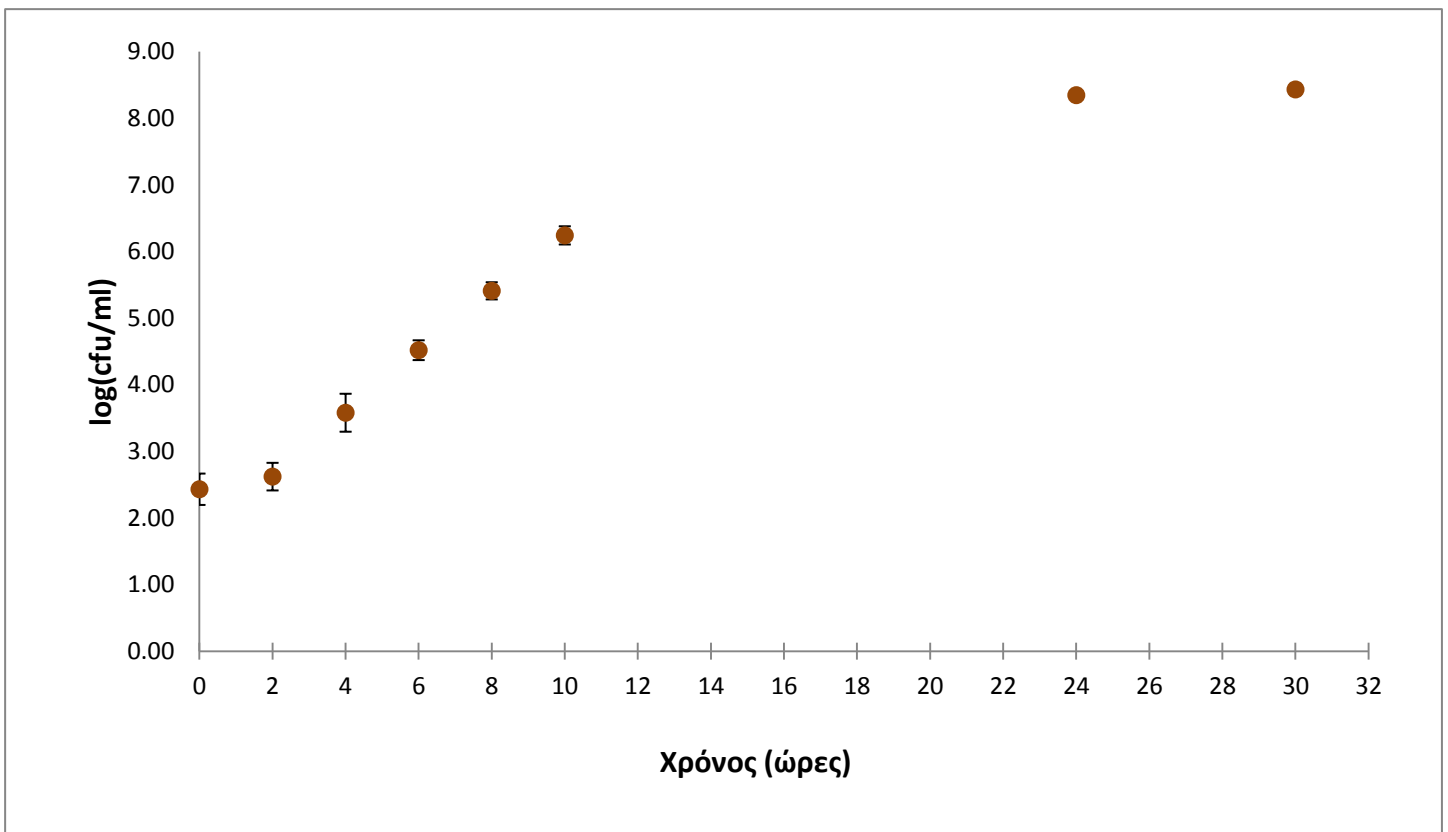
Γράφημα 3.1 Μεταβολή του ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) συναρτήσει του pH



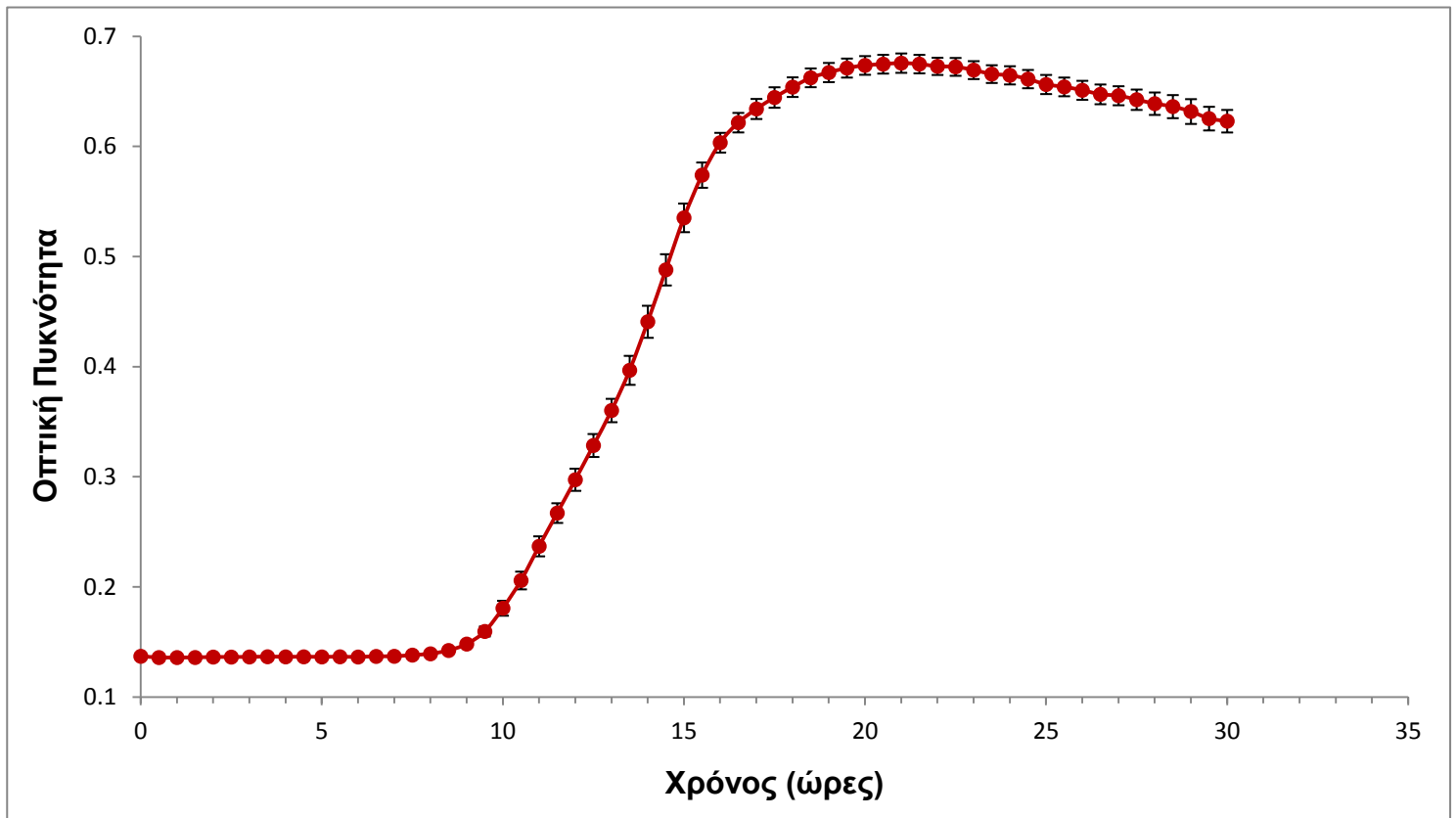
Γράφημα 3.2 Μεταβολή του ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) συναρτήσει της συγκέντρωσης NaCl (%)



Γράφημα 3.3 Μεταβολή του pH του θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου (ώρες) σε συνθήκες ανάπτυξης: pH 7.0, 0.5% NaCl, 30°C.



Γράφημα 3.4 Μεταβολή του πληθυσμού του *B. subtilis* συναρτήσει του χρόνου (ώρες) σε συνθήκες ανάπτυξης: pH 7.0, 0.5% NaCl, 30°C.



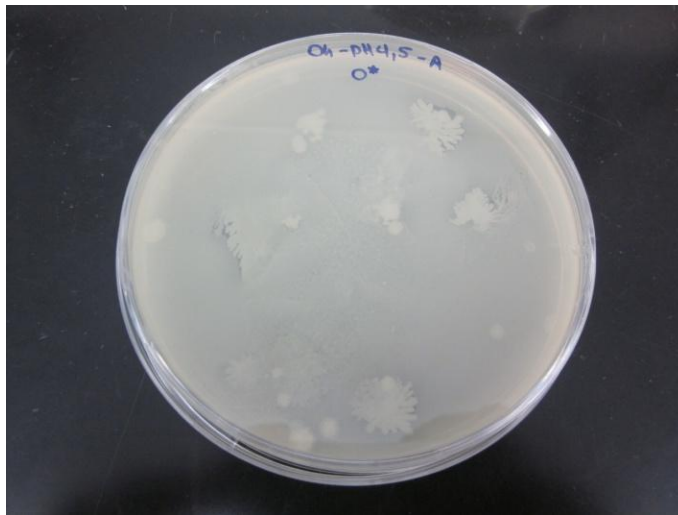
Γράφημα 3.5 Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών συναρτήσει του χρόνου (ώρες) σε συνθήκες ανάπτυξης: pH 7.0, 0.5% NaCl, 30°C.

Στο πείραμα με καλλιέργειες σε TSB με pH **4.0** (0.5%NaCl) παρατηρήθηκε μείωση (σχεδόν στο 0) του πληθυσμού του *B. subtilis* και η οπτική πυκνότητα που μετρήθηκε δεν έδειξε ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

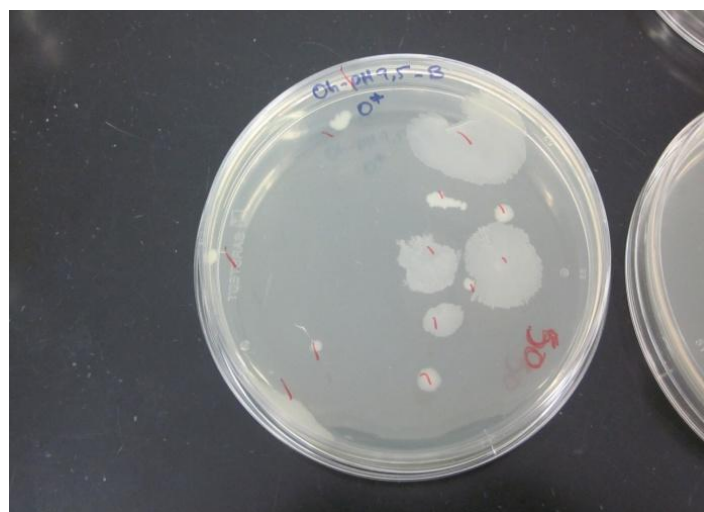
Στα πειράματα όπου το pH ήταν **9.5** δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ούτε στα τρυβλία, ούτε κατά τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Πιο συγκεκριμένα, κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο των καλλιεργειών του *B. subtilis* σε TSB με pH 9.5 (0.5% NaCl) δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν οι αποικίες διότι οι μορφολογία τους ήταν αλλοιωμένη και οι αποικίες καταλάμβαναν όλο το τρυβλίο ή αλληλεπικαλύπτονταν. Το πρόβλημα αυτό παρουσιάστηκε και στην περίπτωση του pH **4.5**, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1 και στην Εικόνα 3.2.

Στην Εικόνα 3.3 που ακολουθεί απεικονίζονται φιάλες Duran (100ml) (Δείγμα A και Δείγμα B) που περιέχουν καλλιέργειες του μικροοργανισμού, μετά από 24ωρη επώαση στους 30°C. Το περιεχόμενο των φιαλών είναι εμβολιασμένο TSB με ρυθμισμένο pH

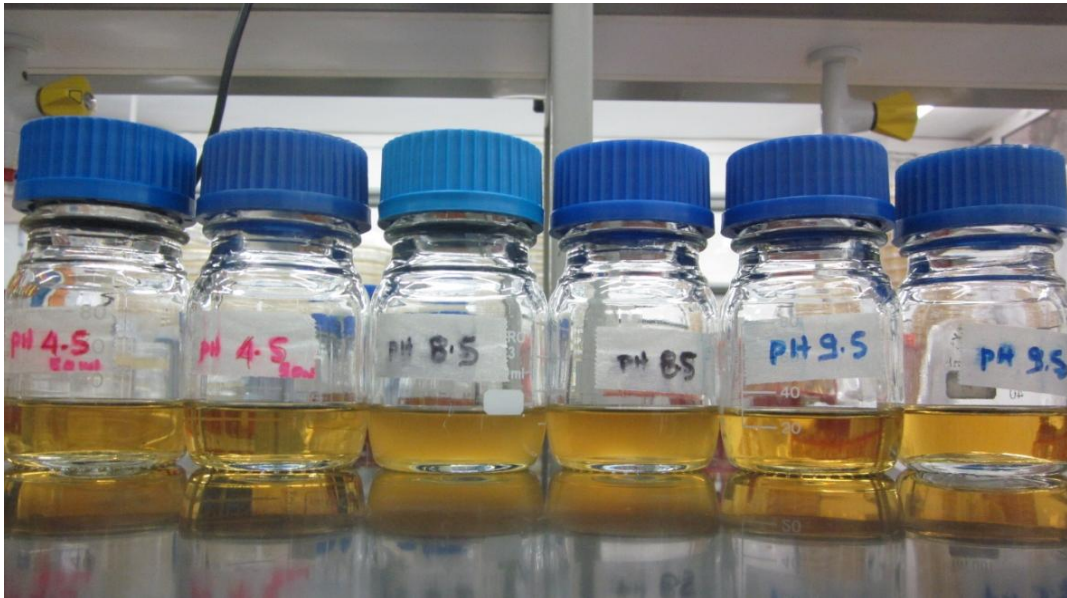
(4.5, 8.5, 9.5). Παρατηρείται έντονη θολερότητα στις φιάλες με TSB pH 8.5 λόγω αυξημένου κυτταρικού πληθυσμού, ενώ στις φιάλες όπου το pH είναι 4.5 και 9.5 δεν παρατηρείται θολερότητα διότι δεν υπάρχει ανάπτυξη ή τα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί είναι πολύ λίγα και δεν διακρίνονται ως αιωρούμενα σωματίδια στο υγρό θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 3.1 Τρυβλίο επιστρωμένο με εμβολιασμένο TSB με pH 4.5 (0.5%NaCl), μετά από επώαση στους 30°C για 24 ώρες. (Δειγματοληψία για χρόνο= 0 ώρες)



Εικόνα 3.2 Τρυβλία επιστρωμένα με εμβολιασμένο TSB με pH 9.5 (0.5% NaCl), μετά από επώαση στους 30°C για 24 ώρες. (Δειγματοληψία για χρόνο= 0 ώρες).



Εικόνα 3.3 Φιάλες Duran (100ml) που περιέχουν καλλιέργειες του *B. subtilis* μετά από επώαση στους 30°C για 24 ώρες. Δείγματα A και B για κάθε συνθήκη (pH 4.5, 8.5, 9.5).

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συμπεράσματα

Στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (pH 7.0, 0.5% NaCl, 30°C) με βάση τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας παρατηρήθηκαν, όπως αναμενόταν, μικρή μείωση του pH με την πάροδο του χρόνου και φυσιολογική ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Στα πειράματα όπου ρυθμίσαμε το pH σε διαφορετικές τιμές, μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων που πήραμε, συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του *B. subtilis* είναι pH 7.0-8.0, ενώ τιμές pH < 4.0 και pH > 9.5 δεν επιτρέπουν στο μικροοργανισμό να αναπτυχθεί και επομένως τρόφιμα με αρκετά όξινο ή αρκετά βασικό χαρακτήρα μπορούν να θεωρηθούν ασφαλή.

Στην περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης, ο *B. subtilis* αρχικά αργεί να αναπτυχθεί αλλά τελικά, μετά από 48 ώρες, ο κυτταρικός πληθυσμός φτάνει σε υψηλά επίπεδα.

Τέλος, σε θρεπτικό υλικό ή τρόφιμο όπου η περιεκτικότητα NaCl είναι μεγάλη, ο ρυθμός ανάπτυξης του *B. subtilis* μειώνεται, χωρίς αυτό να σημαίνει όμως ότι δεν αναπτύσσεται. Ειδικότερα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση NaCl, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού, δηλαδή είναι μεγέθη αντιστρόφως ανάλογα.

4.2 Μελλοντική Εργασία

Τα πειραματικά δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελούν τη βάση για το χαρακτηρισμό της αυξητικής κινητικής συμπεριφοράς του βακτηρίου *Bacillus subtilis*, το οποίο και έχει αναγνωριστεί ως η ειδική αλλοιογόνος μικροχλωρίδα του προϊόντος από το οποίο απομονώθηκε (παστεριωμένη κρέμα με γεύση βανίλια). Δεδομένου ότι τα συλλεχθέντα δεδομένα αφορούν στον προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{max}) του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες

(pH, αλατότητα), θα μπορούσαν, αφού προηγουμένως εμπλουτιστούν με αντίστοιχα δεδομένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες, να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τη δευτερογενή μοντελοποίηση αυτής της κινητικής παραμέτρου, στη μαθηματική περιγραφή δηλαδή της σχέσης που συνδέει αυτή την παράμετρο με διαφορετικά επίπεδα σημαντικών περιβαλλοντικών παραμέτρων. Τέλος, τα ληφθέντα μικροβιολογικά δεδομένα σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα χρωματογραφικά, αποτελούν πρώτες ενδεικτικές πληροφορίες οι οποίες θα μπορούσαν ενδεχομένως να φανούν χρήσιμες, μαζί με δεδομένα συμπληρωματικών χημικών αναλύσεων (π.χ. αέρια χρωματογραφία), στην αναγνώριση μεταβολιτών ενδεικτικών της ανάπτυξης του συγκεκριμένου αλλοιογόνου μικροοργανισμού (προσδιορισμός χημικών δεικτών αλλοίωσης).

5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

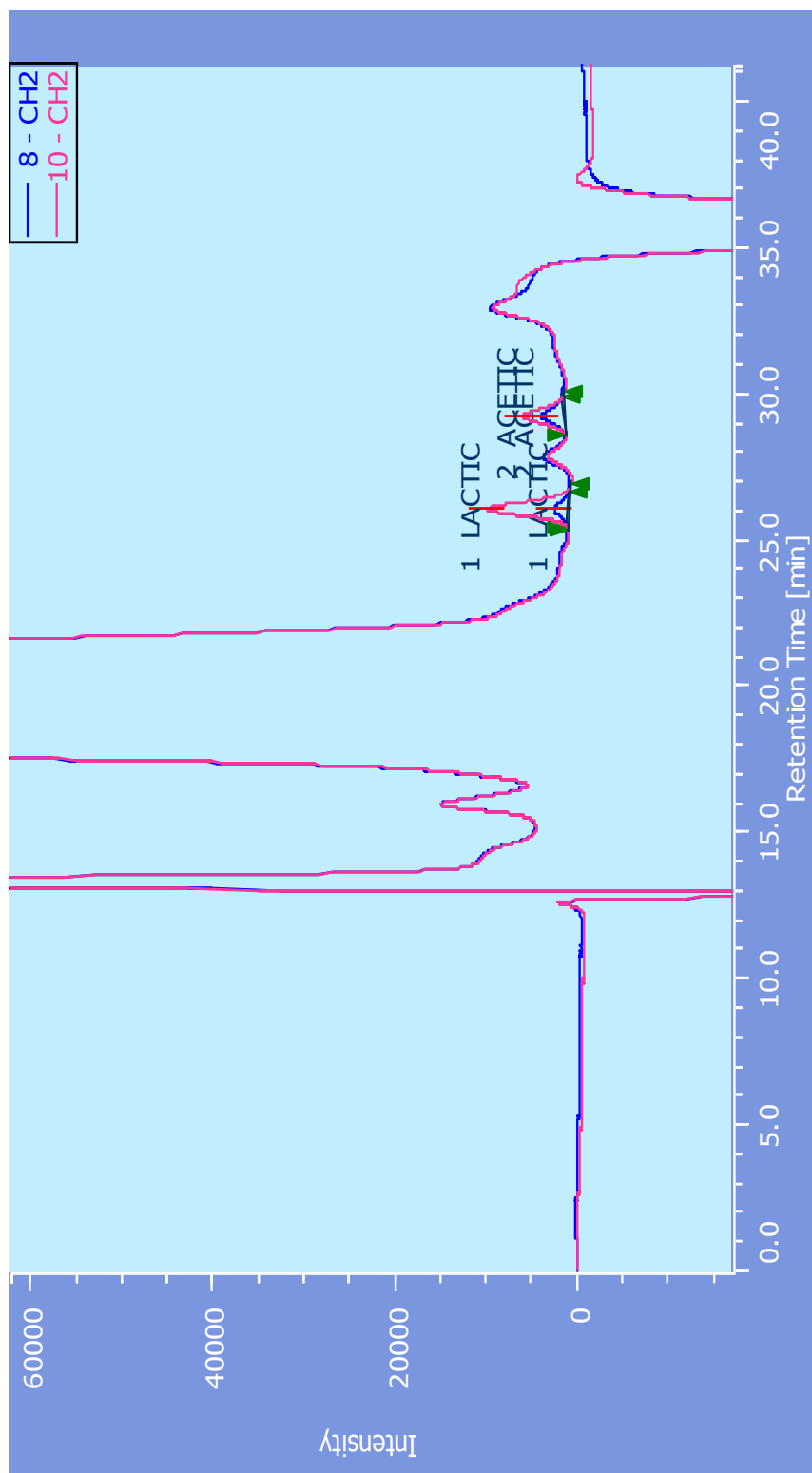
5.1 Αρκτικόλεξα - Συντμήσεις

TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
OD	Optical Density
CFU	Colony-forming unit
DT	Detection Time
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
rpm	Rounds per minute

5.2 Χρωματογραφήματα

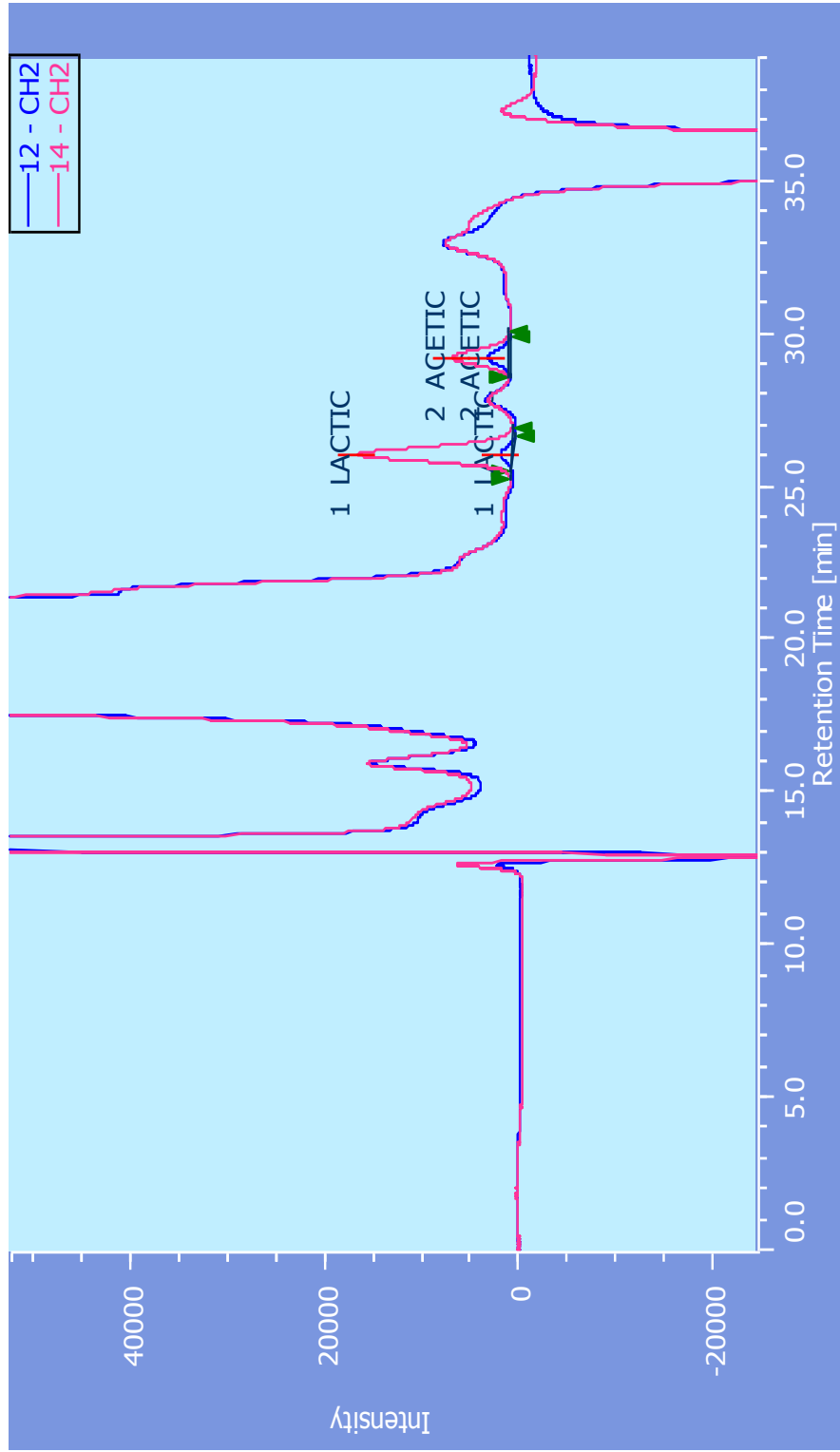
Συστατικό	Χρόνος έκλουσης (λεπτά)
Γλυκόζη	19.25
Γαλακτικό οξύ	25.65
Οξικό οξύ	28.85

Πίνακας 5.1 Χρόνοι έκλουσης πρότυπων ουσιών κατά τον προσδιορισμό τους με HPLC



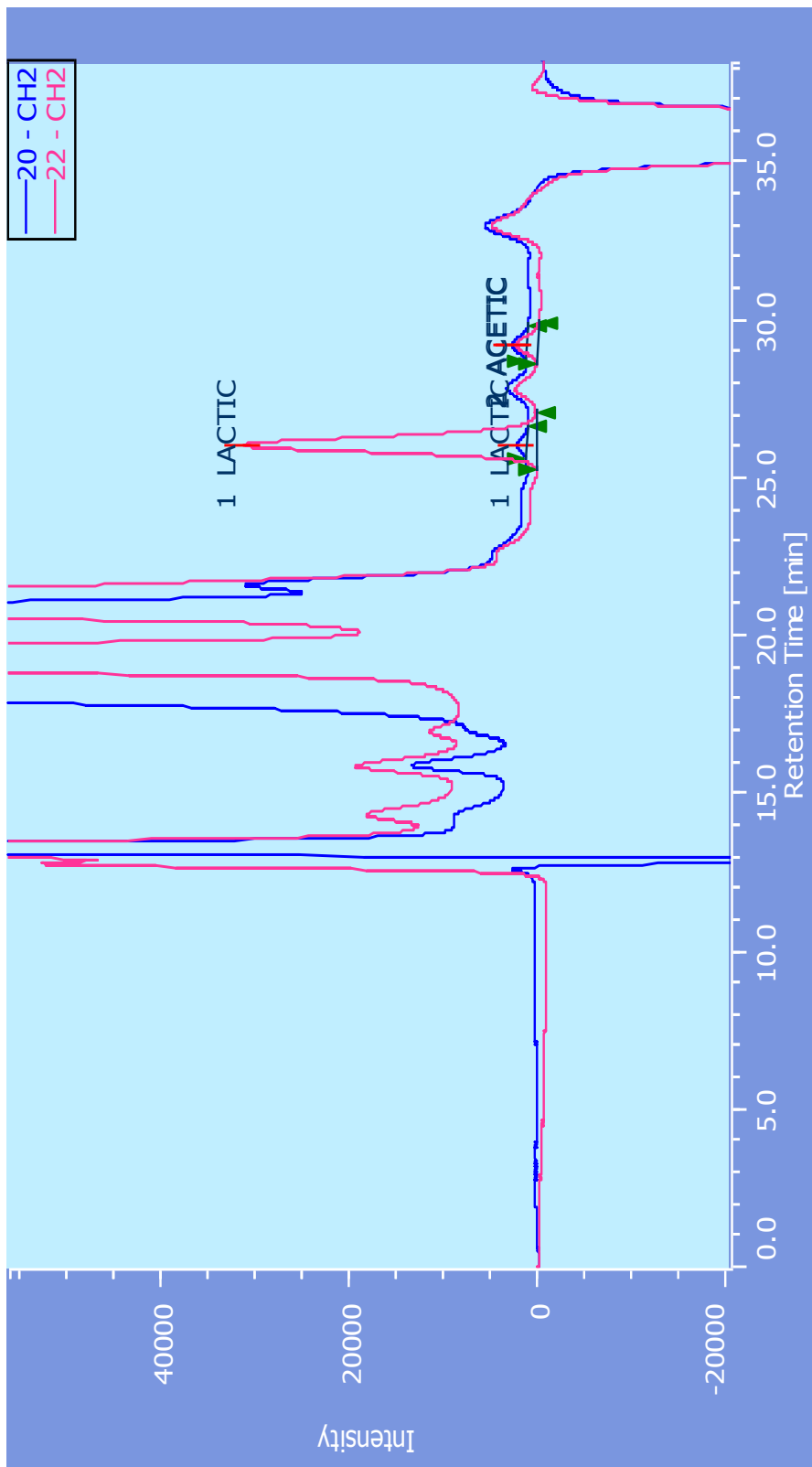
Γράφημα 5.1 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας με συγκέντρωση σακχαρόζης 40% (6 ώρες και 24 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
7	40%sucrose_0h	0.000000	0.000000	Μη ανιχνεύσιμη
8	40%sucrose_6h	0.060301	0.163047	Μη ανιχνεύσιμη
9	40%sucrose_12h	0.065139	0.164526	Μη ανιχνεύσιμη
10	40%sucrose_24h	0.434082	0.334325	Μη ανιχνεύσιμη



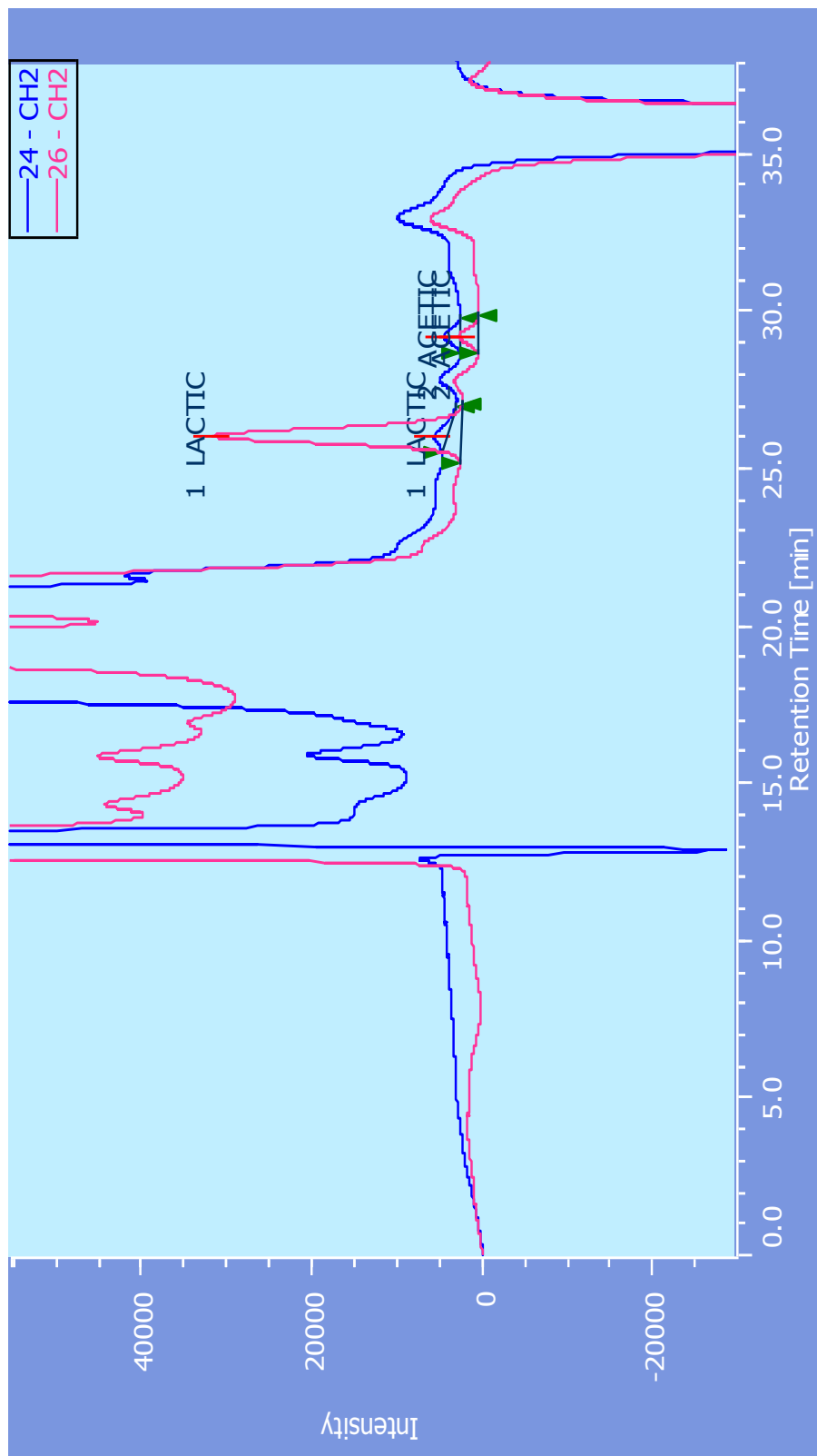
Γράφημα 5.2 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας με συγκέντρωση σακχαρόζης 20% (6 ώρες και 24 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
11	20% sucrose_0h	0.000000	0.000000	Μη ανιχνεύσιμη
12	20% sucrose_6h	0.060851	0.157654	Μη ανιχνεύσιμη
13	20% sucrose_12h	0.055734	0.163582	Μη ανιχνεύσιμη
14	20% sucrose_24h	0.749064	0.316597	Μη ανιχνεύσιμη



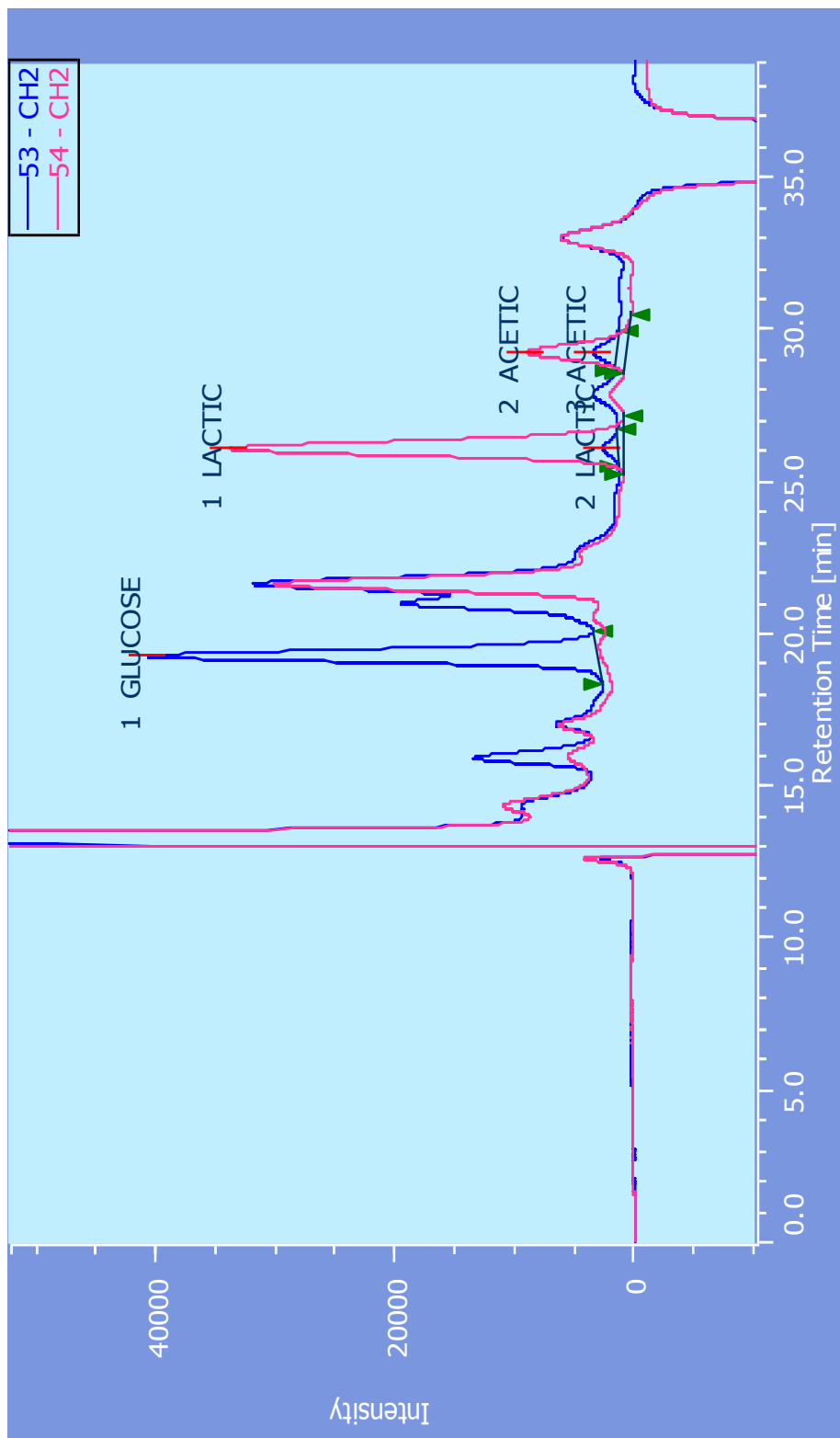
Γράφημα 5.3 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας με συγκέντρωση σακχαρόζης 5% (6 ώρες και 24 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
19	5% sucrose_0h	0.000000	0.000000	Μη ανιχνεύσιμη
20	5% sucrose_6h	0.043563	0.107774	Μη ανιχνεύσιμη
21	5% sucrose_12h	0.091505	0.148606	Μη ανιχνεύσιμη
22	5% sucrose_24h	1.686810	0.159676	Μη ανιχνεύσιμη



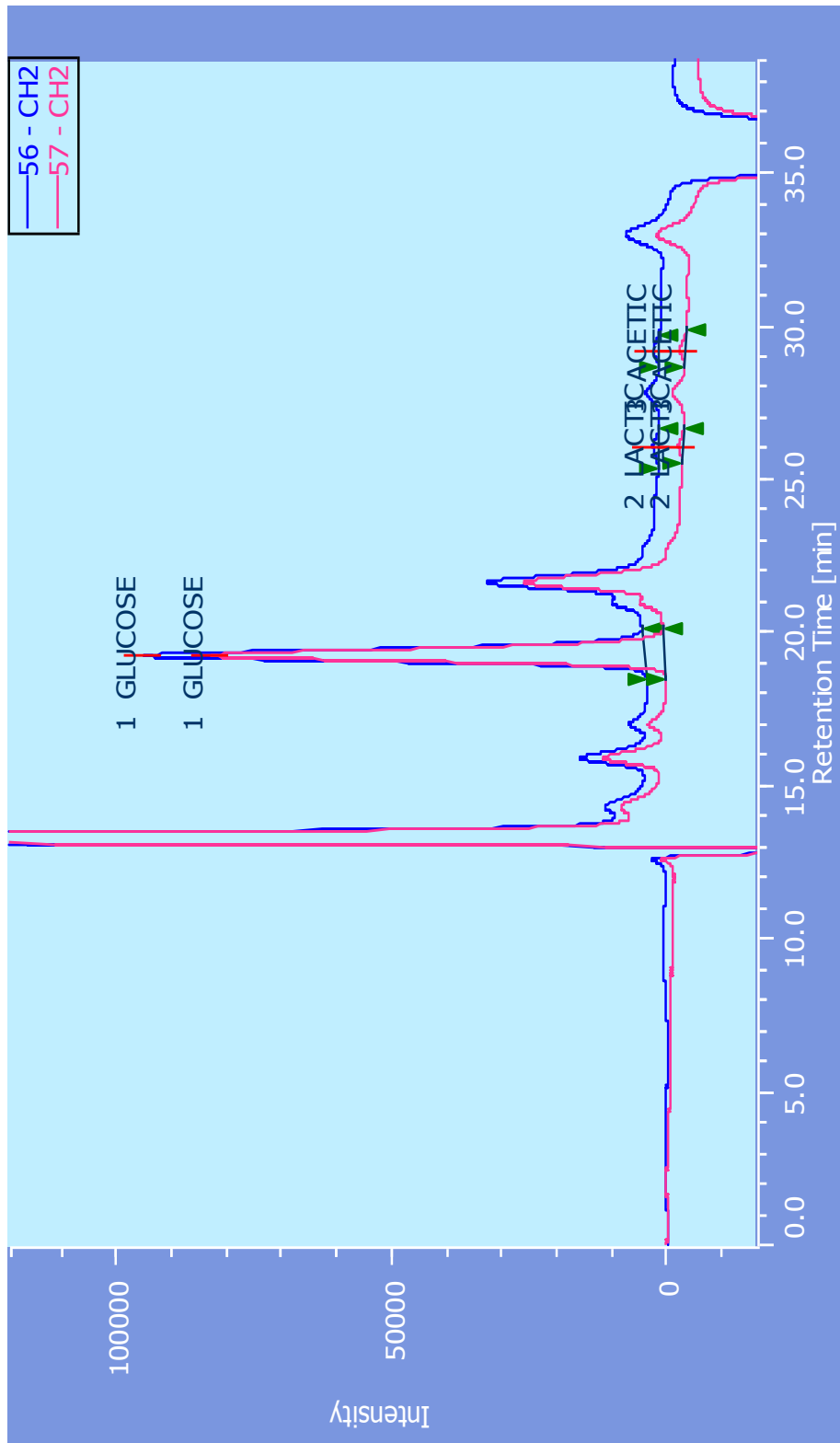
Γράφημα 5.4 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας με συγκέντρωση σακχαρόζης 10% (6 ώρες και 24 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
23	10% sucrose_0h	0.000000	0.000000	Μη ανιχνεύσιμη
24	10% sucrose_6h	0.043563	0.107774	Μη ανιχνεύσιμη
25	10% sucrose_12h	0.091505	0.148606	Μη ανιχνεύσιμη
26	10% sucrose_24h	1.686810	0.159676	Μη ανιχνεύσιμη



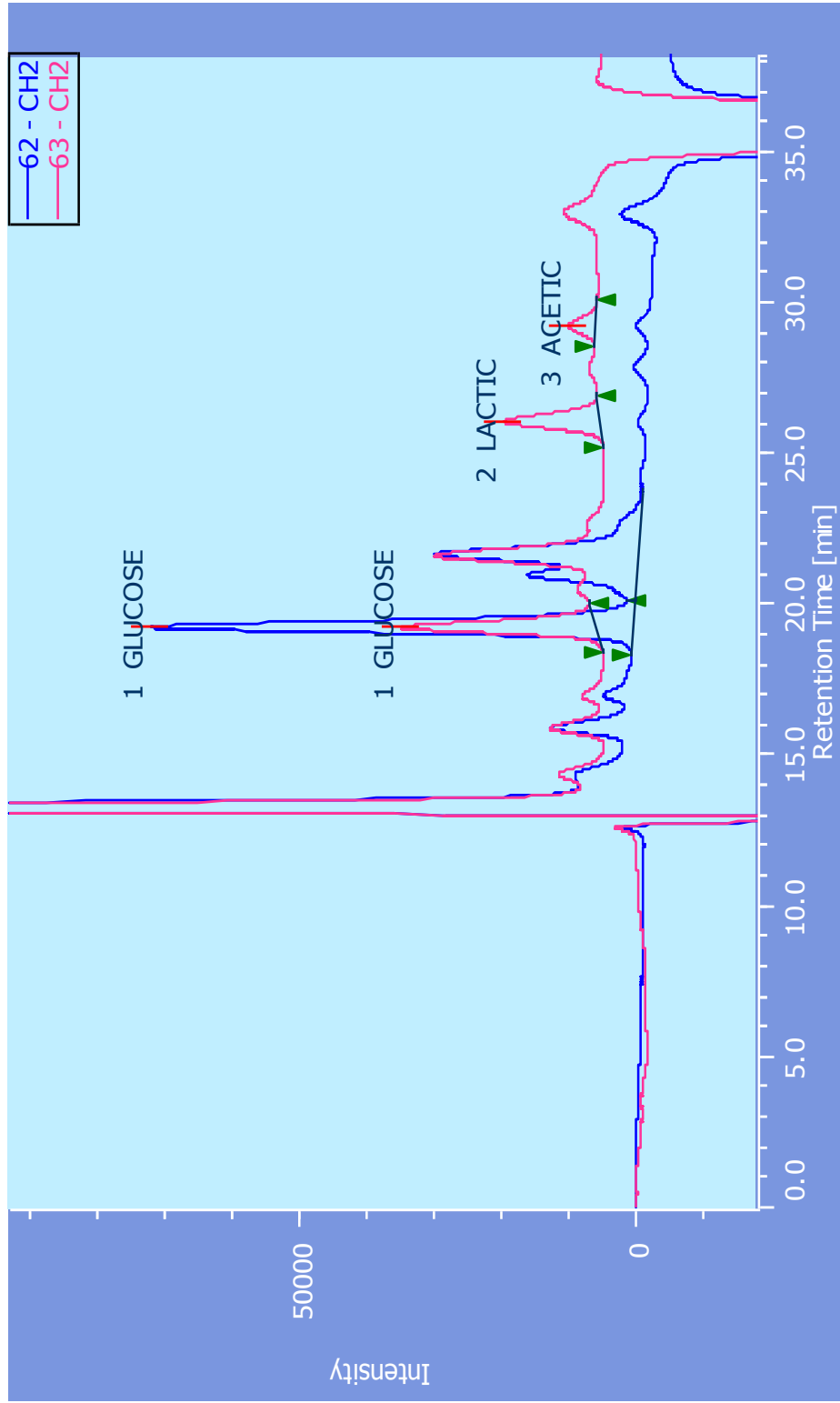
Γράφημα 5.5 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό με pH 9 (24ώρες και 48 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
52	pH9_0h	0.000000	0.000000	1.0820
53	pH9_24h	0.060175	0.140483	1.0976
54	pH9_48h	1.596616	0.634152	0.0000



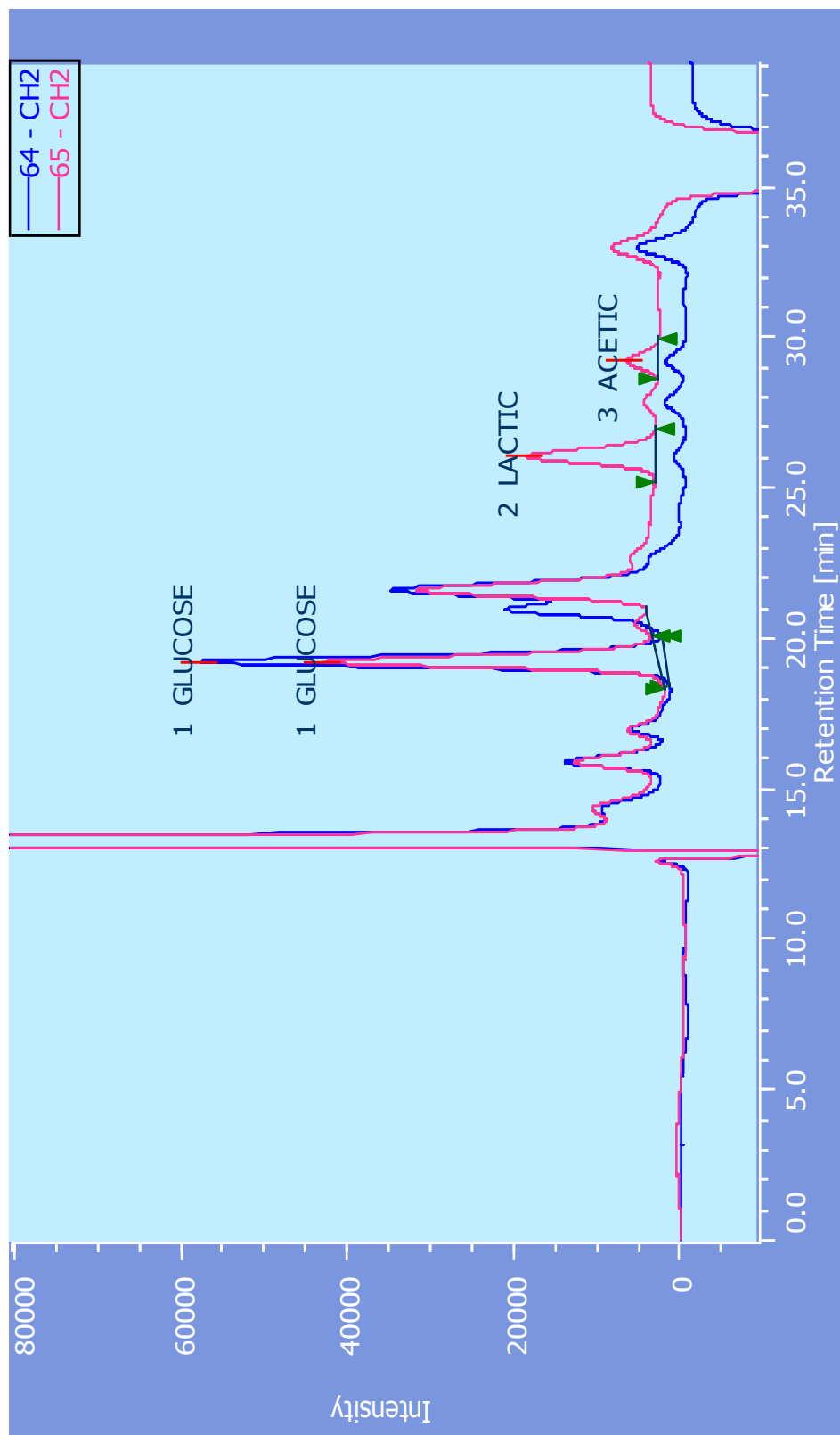
Γράφημα 5.7 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό με pH 4.5 (24 ώρες και 48 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
55	pH4.5_0h	0.000000	0.000000	2.4752
56	pH4.5_24h	0.044269	0.061919	2.6692
57	pH4.5_48h	0.036962	0.067954	2.3475



Γράφημα 5.8 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας σε θερεπτικό υλικό με pH 7 (24 ώρες και 48 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
62	pH7_0h	0.000000	0.000000	2.0171
63	pH7_24h	0.689113	0.294755	1.1669



Γράφημα 5.9 Χρωματογράφημα δείγματος καλλιέργειας σε θερμοκρασία με pH 8 (24 ώρες και 48 ώρες)

α/α	Δείγμα	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Γλυκόζη
64	pH8_0h	0.000000	0.000000	1.6280
65	pH8_24h	0.747600	0.262161	1.2414

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γ. Μπαλατσούρας, *Μικροβιολογία τροφίμων*. (ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ, 2006), pp. 562.
2. S. F. Ron Sender, Ron Milo, Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. (Jan. 6, 2016) <http://dx.doi.org/10.1101/036103>).
3. T. den Blaauwen, M. A. de Pedro, M. Nguyen-Disteche, J. A. Ayala, Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS microbiology reviews* **32**, 321-344 (2008); published online EpubMar (10.1111/j.1574-6976.2007.00090.x).
4. H. Fujikawa, Diversity of the growth patterns of *Bacillus subtilis* colonies on agar plates. *FEMS Microbiology Ecology* **13**, 159-167 (1994); published online Epub1// (<http://dx.doi.org/>).
5. F. U. Battistuzzi, A. Feijao, S. B. Hedges, A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC evolutionary biology* **4**, 44 (2004); published online EpubNov 9 (10.1186/1471-2148-4-44).
6. C. J. Paredes, K. V. Alsaker, E. T. Papoutsakis, A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature reviews. Microbiology* **3**, 969-978 (2005); published online EpubDec (10.1038/nrmicro1288).
7. D. Higgins, J. Dworkin, Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS microbiology reviews* **36**, 131-148 (2012); published online EpubJan (10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x).
8. W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, P. Setlow, Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 548-572 (2000); published online EpubSep
9. P. Setlow, Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology* **101**, 514-525 (2006); published online EpubSep (10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x).
10. V. K. Viswanathan, M. J. Mallozzi, G. Vedantam, *Clostridium difficile* infection: An overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. *Gut microbes* **1**, 234-242 (2010); published online EpubJul (10.4161/gmic.1.4.12706).
11. P. K. Talukdar, V. Olguín-Araneda, M. Alnoman, D. Paredes-Sabja, M. R. Sarker, Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology* **166**, 225-235 (2015); published online Epub5// (<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001>).
12. R. Leuschner, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Ed. (Academic Press, Oxford, 2003), pp. 355-358.
13. P. E. Granum, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Ed. (Academic Press, Oxford, 2003), pp. 365-371.
14. W. a. P. Aehle, *Enzymes in Industry: Production and Applications*. W. Aehle, Ed., (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ed. Second Edition, 2003).
15. P. C. B. Turnbull, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Ed. (Galveston (TX), 1996).
16. N. T. Hoa, L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P. H. Van, S. Ammendola, E. Ricca, A. S. Cutting, Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. *Applied*

- and environmental microbiology* **66**, 5241-5247 (2000); published online EpubDec
17. M. K. Dahl, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. (Elsevier, Oxford, 1999), pp. 113-119.
 18. R. L. Armstrong, N. Harford, R. H. Kennett, M. L. St. Pierre, N. Sueoka, in *Methods in Enzymology*. (Academic Press, 1970), vol. Volume 17, Part A, pp. 36-59.
 19. M. K. Dahl, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, R. K. Robinson, Ed. (Elsevier, Oxford, 1999), pp. 135-141.
 20. C. V. Rao, G. D. Glekas, G. W. Ordal, The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends in microbiology* **16**, 480-487 (2008); published online EpubOct (10.1016/j.tim.2008.07.003).
 21. H. Vlamakis, Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, R. Kolter, Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 157-168 (2013); published online EpubMar (10.1038/nrmicro2960).
 22. B. Burton, D. Dubnau, Membrane-associated DNA transport machines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a000406 (2010); published online EpubJul (10.1101/cshperspect.a000406).
 23. O. Schilling, O. Frick, C. Herzberg, A. Ehrenreich, E. Heinzle, C. Wittmann, J. Stulke, Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation. *Applied and environmental microbiology* **73**, 499-507 (2007); published online EpubJan (10.1128/AEM.02084-06).
 24. I. Moszer, The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Letters* **430**, 28-36 (1998); published online Epub6/23/ ([http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00620-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00620-6)).
 25. M. Ongena, P. Jacques, Y. Toure, J. Destain, A. Jabrane, P. Thonart, Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology* **69**, 29-38 (2005); published online EpubNov (10.1007/s00253-005-1940-3).
 26. H. P. Bais, R. Fall, J. M. Vivanco, Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* **134**, 307-319 (2004); published online EpubJan (10.1104/pp.103.028712).
 27. S. Timmusk, N. Grantcharova, E. G. Wagner, *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and environmental microbiology* **71**, 7292-7300 (2005); published online EpubNov (10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005).
 28. T. Stein, *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology* **56**, 845-857 (2005); published online EpubMay (10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x).
 29. G. I. Souto, O. S. Correa, M. S. Montecchia, N. L. Kerber, N. L. Pucheu, M. Bachur, A. F. Garcia, Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of applied microbiology* **97**, 1247-1256 (2004)10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x).

30. R. Finking, M. A. Marahiel, Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annual review of microbiology* **58**, 453-488 (2004)10.1146/annurev.micro.58.030603.123615).
31. S. A. Sieber, M. A. Marahiel, Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *Journal of bacteriology* **185**, 7036-7043 (2003); published online EpubDec
32. K. Nagorska, M. Bikowski, M. Obuchowski, Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta biochimica Polonica* **54**, 495-508 (2007).
33. J. A. Shapiro, Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual review of microbiology* **52**, 81-104 (1998)10.1146/annurev.micro.52.1.81).
34. X. L. Robin C. McKellar, *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC, Ed., Contemporary Food Science (CRC Press, 2003), pp. 360
35. J. Baranyi, T. A. Roberts, Mathematics of predictive food microbiology. *International journal of food microbiology* **26**, 199-218 (1995); published online Epub7// ([http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)).
36. P. Dalgaard, K. Koutsoumanis, Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of microbiological methods* **43**, 183-196 (2001); published online EpubJan
37. R. Lindqvist, Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4862-4870 (2006); published online EpubJul (10.1128/AEM.00251-06).
38. A. Lianou, K. P. Koutsoumanis, Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food microbiology* **28**, 828-837 (2011); published online EpubJun (10.1016/j.fm.2010.04.006).
39. G. Bleve, M. Tufariello, M. Durante, F. Grieco, F. A. Ramires, G. Mita, M. Tasioula-Margari, A. F. Logrieco, Physico-chemical characterization of natural fermentation process of *Conservolea* and *Kalamàta* table olives and developement of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food microbiology* **46**, 368-382 (2015); published online Epub4// (<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.021>).
40. J. M. Jay, *Modern Food Microbiology*. (ASPEN Publications, Gaithersburg, Maryland, ed. 6th, 2000).
41. J. E. L. C. D.A.A. Mossel , C.B. Struijk , R.M. Baird, *Essentials of the Microbiology of Foods : A Textbook for Advanced Studies*. (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, 1995), pp. 736.
42. J. P. Smelt, G. J. Raatjes, J. S. Crowther, C. T. Verrips, Growth and toxin formation by *Clostridium botulinum* at low pH values. *The Journal of applied bacteriology* **52**, 75-82 (1982); published online EpubFeb