

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

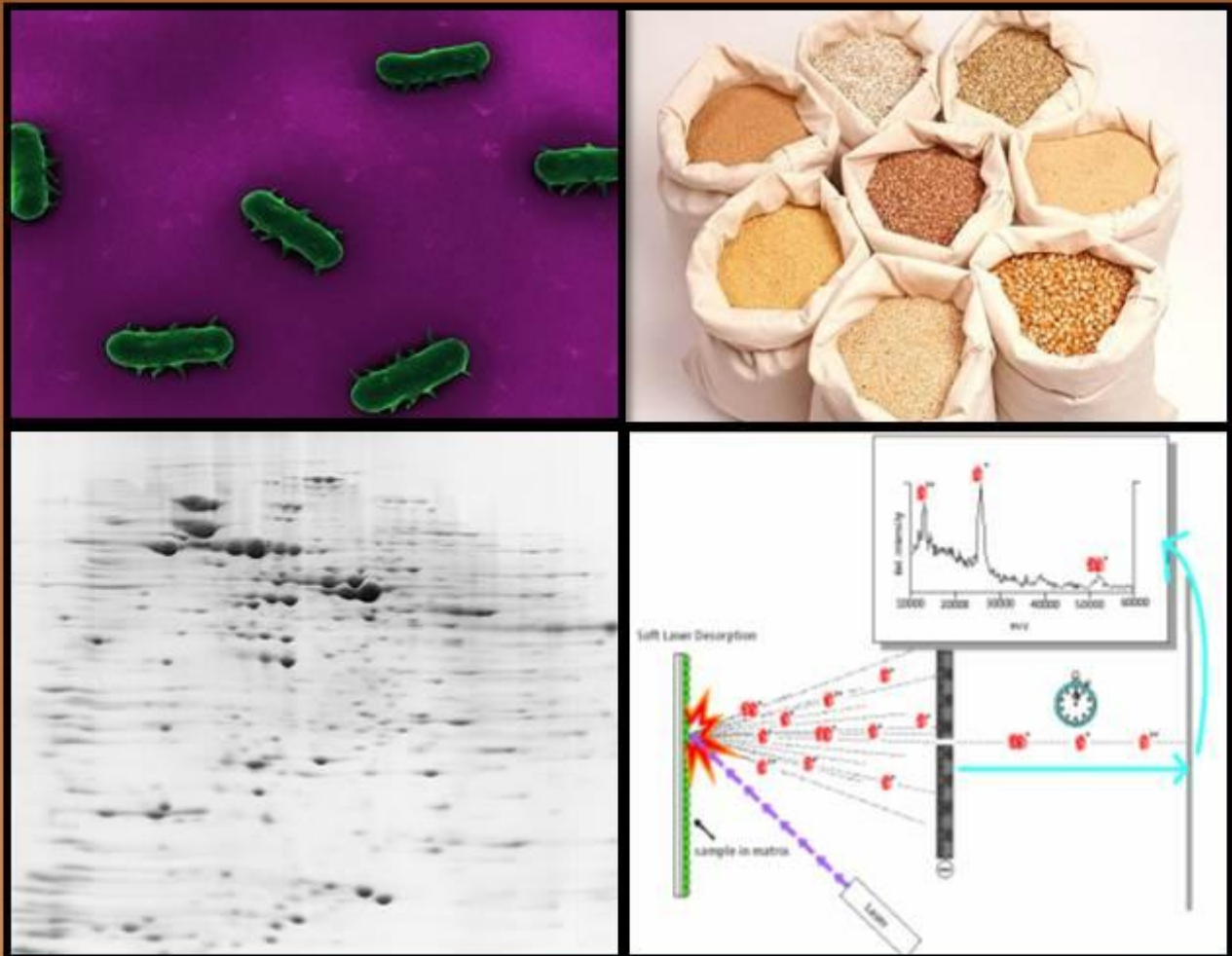
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη των ορίων ανάπτυξης και εν συνεχεία πρωτεομική
ανάλυση στελεχών σαλμονέλας απομονωμένων από ζωοτροφές»



ΓΡΙΒΟΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΑΘΗΝΑ 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ

ΓΡΙΒΟΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Μελέτη των ορίων ανάπτυξης και εν συνεχεία πρωτεομική ανάλυση
στελεγχών σαλμονέλας απομονωμένων από ζωοτροφές»**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Εξεταστική – Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Δροσινός Ελευθέριος (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Ακτύπης Αναστάσιος (Λέκτορας)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1.1 Η βιομηχανία ζωοτροφών	9
1.1.1 Γενικά.....	9
1.1.2 Οι κίνδυνοι των ζωοτροφών	10
1.1.3 Η σαλμονέλα στις ζωοτροφές	11
1.1.4 Αίτια-πηγές επιμόλυνσης των ζωοτροφών και τρόποι αντιμετώπισης.....	13
1.2 Ευθύνες και νομοθεσία σχετικά με την ασφάλεια των ζωοτροφών	16
1.3 Ο παθογόνος μικροοργανισμός salmonella spp.....	17
1.3.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία	17
1.3.2 Οικογένεια enterobacteriaceae	28
1.3.3 Μελέτη του γένους salmonella	19
1.3.4 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες	21
1.3.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	23
1.3.6 Συσχετισμός με τα τρόφιμα	26
1.3.7 Μέτρα προφύλαξης.....	27
1.3.8 Επιβίωση του μικροοργανισμού Salmonella spp. υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης	27
1.4 Οργανικά οξέα	28
1.4.1 Δράση των οργανικών οξέων.....	28
1.4.2 Παρεμπόδιση της παθογένειας από τα SCFAs	30

1.5	Πρωτεομική Ανάλυση.....	33
1.5.1	Εισαγωγή.....	33
1.5.2	Διαχωρισμός πρωτεϊνικού μίγματος με Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D Gel Electrophoresis)	34
1.6	Σκοπός της μελέτης.....	37
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1	Αναλώσιμα υλικά.....	38
2.1.1	Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια	38
2.1.2	Θρεπτικά υποστρώματα	38
2.2	Εργαστηριακός εξοπλισμός	39
2.3	Μικροβιακά στελέχη.....	39
2.4	Πειραματική διαδικασία	40
2.4.1	Ανανέωση των μικροοργανισμών.....	40
2.4.2	Υποστρώματα-συνθήκες.....	41
2.4.3	Ενοφθαλισμός.....	42
2.5	Πρωτεομική ανάλυση	43
2.5.1	Παραλαβή βιομάζας.....	43
2.5.2	Λύση των βακτηριακών κυττάρων	43
2.5.3	Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών	44
2.5.4	Κατακρήμνιση με τριγλωροξικό οξύ (TCA)	46
2.5.5	Ανάκτηση πρωτεΐνης	47
2.5.6	Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων	47
2.5.7	Προετοιμασία του δείγματος	47
2.5.8	Ισοηλεκτρικός εστιασμός.....	48
2.5.9	Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση	49

2.5.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Μοριακό Βάρος.....	51
2.5.11 Εμφάνιση πρωτεϊνών	52
2.5.12 Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου	53
2.5.13 Αποχρωματισμός των πηκτών	53
2.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	54
2.6.1 Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα 2Δ πηκτώματα	54
2.6.2 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων μέσω πεπτιδικών χαρτών (peptide maps) και φασματομετρία μάζας (ΦΜ) (Mass Spectrometry).....	54
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
3.1 Επίδραση των πειραματικών συνθηκών στην ανάπτυξη στελεχών σαλμονέλας	59
3.2 Πρωτεομική ανάλυση	71
3.3 Μελέτη των εντοπισμένων πρωτεϊνών	77
3.4 Συμπεράσματα-συζήτηση	85
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συγκριτική αξιολόγηση της οξεοανθεκτικότητας και ο προσδιορισμός των ορίων ανάπτυξης παρουσία οργανικών οξέων (growth/no growth limits) 10 στελεχών *Salmonella sp.* που έχουν απομονωθεί από ζωοτροφές χωρών της Βόρειας Ευρώπης τα τελευταία 15 χρόνια. Η ανάπτυξη των στελεχών έγινε σε διαλύματα θρεπτικού υποστρώματος BHI (Brain Heart Infusion Broth) με προσθήκη φορμικού και γαλακτικού οξέος σε διάφορες συγκεντρώσεις (25mM, 50mM και 100mM). Παρασκευάστηκαν υποστρώματα με pH από 4,2 έως 5,6 με διαβάθμιση 0,2, ρυθμισμένα με NaOH και HCl. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μελετήθηκε στους 10, 15, 20 και 25°C.

Παρατηρήθηκε ελαφριά διακύμανση της ανθεκτικότητας των διαφορετικών στελεχών έναντι των οργανικών οξέων στα διάφορα pH, καθώς επίσης παρατηρήθηκε και έντονη διαφοροποίηση της δράσης των δύο οργανικών οξέων στις διάφορες θερμοκρασίες επώασης.

Εν συνεχεία ακολούθησε ανάλυση του πρωτεόματος αντιπροσωπευτικών στελεχών για το κάθε οργανικό οξύ με χρήση της μεθόδου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (2-D Electrophoresis). Επιλέχθηκαν τέσσερα στελέχη που παρουσίαζαν τα μεγαλύτερα όρια ανάπτυξης παρουσία γαλακτικού οξέος, φορμικού οξέος, «ενδιάμεση» συμπεριφορά ανάπτυξης και ένα εργαστηριακό στέλεχος, με σκοπό τον εντοπισμό διαφορών στα πρωτεϊνικά τους προφίλ. Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του πρωτεϊνικού προφίλ μεταξύ των τεσσάρων στελεχών που επιλέχθηκαν για ανάλυση.

Μετέπειτα ακολούθησε η διαδικασία ταυτοποίησης των πρωτεϊνών των οποίων διέφερε η έκφραση χρησιμοποιώντας MALDI-TOF MS (Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών) και στη συνέχεια βιβλιογραφική έρευνα για τον βιολογικό ρόλο των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε κάποιες από τις εν λόγω πρωτεΐνες να εμπλέκονται σε κυτταρικούς μηχανισμούς απόκρισης σε συνθήκες στρες, γεγονός που πιθανόν να συσχετίζεται με ανθεκτικότητα σε συνθήκες όξινης καταπόνησης και στην εφαρμογή οργανικών οξέων. Τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα της εξυγίανσης των ζωοτροφών και ειδικότερα στη βελτιστοποίηση των όξινων μεταχειρίσεων τους, με σκοπό τη μείωση του κινδύνου επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών όπως η σαλμονέλα.

ABSTRACT

The purpose of this study is to comparatively evaluate the acid resistance and define the limits of growth in the presence of organic acids (growth / no growth limits of 10 *Salmonella* sp. strains isolated from Northern European countries feed samples over the past 15 years). The growth of the strains took place in broth nutrient medium BHI (Brain Heart Infusion Broth) supplemented with formate and lactate acid at different concentrations (25mM, 50mM and 100mM). The substrates prepared with pH between 4.2 to 5.6 (adjusted with NaOH and HCl) with a grade of 0.2. The growth of microorganisms was estimated at 10, 15, 20 and 25 ° C.

There was observed slight variation in the resistance of the ten different strains against the organic acids in various pH, and also significant modulation of the action of the organic acids at two different incubation temperatures.

This was followed by proteome analysis of representative strains for each organic acid using the method of two-dimensional protein electrophoresis (2-D Electrophoresis). Four strains were selected which showed the greatest growth rates in the presence of lactic acid, formic acid, intermediate growth behavior and a laboratory strain, in order to identify differences in their protein profiles. There was observed a variation of protein profile among the four strains that were selected for analysis.

Thereafter, proteins whose expression differed were at first identified using MALDI-TOF MS (Biological Research Academy of Athens) and then literately reviewed for their biological role. Some of these proteins were shown to be involved in the cellular mechanisms regarding stress response and subsequently they might be related to acid stress response and application of organic acids. These results could be applied to the feed decontamination sector and especially in the optimization of acid treatments in order to eliminate the risk of pathogens' survival such as *Salmonella*.

Ευχαριστίες

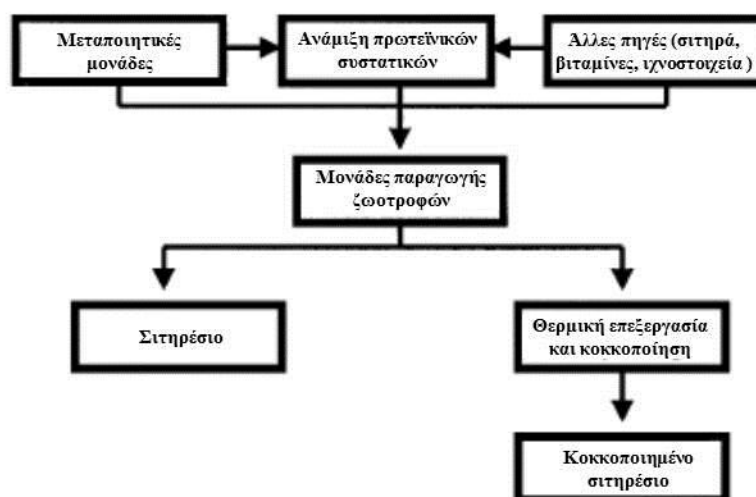
Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, όσον αφορά στη σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και εν γένει συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμότερων ευχαριστιών μου στο Δρ. Παραμυθιώτη Σπυρίδωνα, μέλος του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, για την προθυμία του και τη συμμετοχή του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες τόσο στους γονείς μου όσο και στους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

1.1.1 Γενικά

Τα τελευταία 50 χρόνια η γεωργία έχει εντατικοποιηθεί και έχει υποστεί ριζικές αλλαγές. Αυτό σε συνάρτηση με πληθώρα λοιπών παραγόντων (οικονομικοί, κοινωνικοί κ.α.) έχει οδηγήσει σε αύξηση της ζήτησης μεταποιημένων προϊόντων ζωοτροφών για εκτροφή ζώων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι επιχειρήσεις παραγωγής ζωοτροφών αξιοποιούν τρίμματα κρέατος και άλλα υποπροϊόντα σφαγής, αναμιγνύουν ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες με στόχο την παραγωγή ενός μίγματος ζωοτροφών κατάλληλο για τα εκτρεφόμενα ζώα ανάλογα με το είδος τους, την ηλικίας τους κ.α.



Εικόνα 1.1 Τα στάδια παραγωγής των ζωοτροφών

Οι ζωοτροφές και τα συστατικά τους διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο παγκόσμιο εμπόριο. Το 1999 περισσότερες από 100 χώρες που υποβάλλουν στον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών Τροφίμων και Γεωργίας δεδομένα, δήλωσαν εισαγωγές ζωικών προϊόντων περισσότερες από δύο εκατομμύρια τόνους. Στις Ηνωμένες Πολιτείες η βιομηχανία ζωοτροφών παρήγαγε περίπου 120 εκατομμύρια τόνους ζωοτροφών κατά το έτος 2000 και οι αγρότες δαπάνησαν περίπου 25 δις δολάρια για τις ζωοτροφές (περίπου το 80% αυτών των ζωοτροφών προήρχετο από φυτικής προέλευσης προϊόντα (FAO, 2002, Feedstuffs, 2001). Εκτιμάται ότι συνολικά υπάρχουν περίπου 8000 μονάδες παραγωγής ζωοτροφών και 264 μονάδες επεξεργασίας πρωτεϊνικών συστατικών των ζωοτροφών στις Ηνωμένες Πολιτείες.

1.1.2 Οι κίνδυνοι των ζωοτροφών

Οι ζωοτροφές είναι στην αρχή της αλυσίδας ασφάλειας των τροφίμων στο μοντέλο «από το αγρόκτημα στο τραπέζι».

Οι ζωοτροφές και τα εκτρεφόμενα ζώα είναι η βάση της παραγωγής των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Οι ζωοτροφές δεν είναι μόνο πηγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών (Coleman & Moore, 2003) αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν δυσμενώς την ποιότητα των τροφίμων, με διάφορους τρόπους, μέσω της παρουσίας ανεπιθύμητων ουσιών που μπορούν να περιέχουν. Συνεπώς, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην ασφάλεια των ζωοτροφών για τα ζώα και για τον καταναλωτή (Petersen & Flachowsky, 2004, Flachowsky & Danicke, 2005). Η υγιεινή των ζωοτροφών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την ασφάλεια των τροφίμων ζωικής προέλευσης (Kan & Meijer, 2007). Οι κίνδυνοι των ζωοτροφών περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την παρουσία μυκοτοξινών και την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων όπως η σαλμονέλα και η λιστέρια που είναι υπεύθυνα για τις τροφιμογενείς νόσους (Sofos, 2006). Αν και το ζήτημα της μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων έχει μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο, υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τη μικροβιολογική ασφάλεια των ζωοτροφών (Smulders et al., 2006).

Οι ζωοτροφές και το νερό αποτελούν τις πρωτογενείς πηγές παθογόνων μικροοργανισμών για τα ζώα και τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Hurst & Ward, 2001, Primm, 1998, Richardson & Weiss, 2000). Οι μολυσμένες ζωοτροφές έχουν επισημανθεί ως σημαντικός «φορέας» τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών που δύνανται να εισαχθούν στο ζωικό κεφάλαιο και στα πουλερικά μέσω της τροφής (Anderson et al., 2001, Boyer et al., 1962, Davis et al., 2003, Fedorka-Cray et al., 1997, Fox, 1974). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μολύνουν τα ζώα ή απλά ζουν σε αυτά ως ξενιστές περνώντας μετέπειτα, μέσω της τροφικής αλυσίδας, στον άνθρωπο και μπορούν δυνητικά να προκαλέσουν τροφιμογενείς νόσους (Hinton, 2002, Roberts et al., 1995).

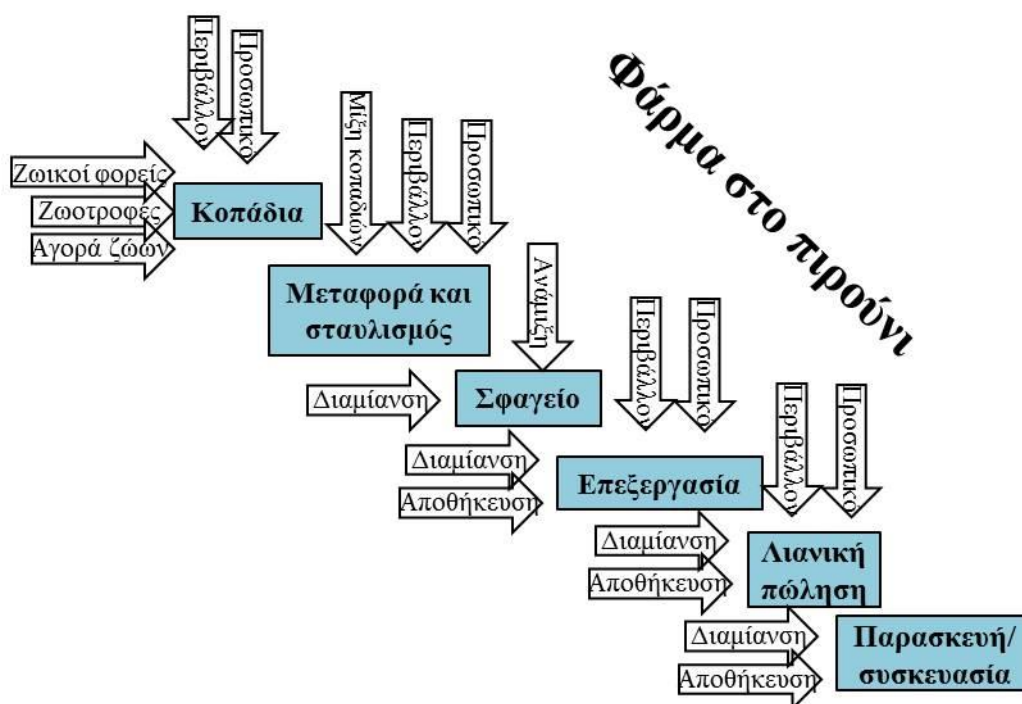
1.1.3 Η σαλμονέλα στις ζωοτροφές

Η αμερικάνικη υπηρεσία «Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine» (CVM) το 1993 δημοσίευσε αποτελέσματα ερευνών σύμφωνα με τα οποία, από δείγματα 151 ζωοτροφών, που είχαν συλλεχθεί από 124 βιομηχανίες ζωοτροφών, ο επιπολασμός σαλμονέλας των ζωικών συστατικών των ζωοτροφών ήταν 56% και των φυτικών πρωτεϊνών ήταν 36%.

Το 2003 σύμφωνα με το CVM, σε αντίστοιχη έρευνα, 122 ζωικής και 79 φυτικής προέλευσης πρωτεϊνικά δείγματα συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν για *Enterococcus*, *Salmonella* και *E. coli*. Ο επιπολασμός των ζωικής προέλευσης πρωτεϊνικών συστατικών των ζωοτροφών ήταν 84%, 34% και 40%, αντίστοιχα. Όσον αφορά στα φυτικής προέλευσης πρωτεϊνικά συστατικά, ο επιπολασμός ήταν 91%, 5% και 43%, αντίστοιχα (Wagner, 2004). Τα επίπεδα μόλυνσης των ζωοτροφών και των συστατικών τους, από σαλμονέλα κυμαίνονται από 0% μέχρι 6% (EE) (EFSA, 2006).

Η σαλμονέλα μπορεί να απομονωθεί τόσο από φυτικά συστατικά των ζωοτροφών (Williams, 1981, Jones et al., 1982, Davies, 1992, Kohler, 1992, Mc Chesney et al., 1995, Harris et al., 1997, Anonymous, 1999) όσο και από έτοιμες ζωοτροφές (Davies, 1992, MC chesney et al., 1995, Anonymous, 1999, Korsak et al., 2003). Για παράδειγμα, στην Ολλανδία το 5,11% των πρόσθετων φυτικών συστατικών, για αύξηση την πρωτεϊνικής περιεκτικότητας, των ζωοτροφών βρέθηκε θετικό για σαλμονέλα σε ελέγχους που διενεργήθηκαν το 1999-2000.

Στη ζωική παραγωγή, οι ζωοτροφές είναι ένα εν δυνάμει μονοπάτι μέσω του οποίου είναι δυνατή η εισαγωγή της σαλμονέλας στις κτηνοτροφικές μονάδες (Sharpcott, 1984, Blackman et al, 1992). Όσον αφορά στους χοίρους, οι μολυσμένες ζωοτροφές και οι νεοεισερχόμενοι στη μονάδα χοίροι θεωρούνται οι πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης (Oosterom, 1984, Berends et al, 1996, Neumann και Kniffen, 1999, Schwartz, 1999, Kranker et al, 2001). Οι νεαροί απογαλακτισμένοι χοίροι πλήττονται πιο συχνά από σαλμονέλα και συνήθως η μόλυνση τους προκαλεί και ασθένεια, όμως και οι ενήλικοι χοίροι είναι ευπαθής σε προσβολές από σαλμονέλα (Van der Wolf et al, 1999, von Altrock et al., 2000, Berends et al., 1996). Οι ενήλικοι χοίροι σπάνια παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, έτσι τα στελέχη σαλμονέλας μπορούν να εισέλθουν στη διαδικασία της σφαγής (Harris et al., 1997) χωρίς να γίνει αντιληπτό το πρόβλημα.



Εικόνα 1.2 Το μοντέλο "Από τη φάρμακο στο πιρούνι". Τα βέλη υποδεικνύουν πιθανές πηγές επιμόλυνσης με σαλμονέλα κατά την παραγωγική διαδικασία.

Η σαλμονέλα έχει αναγνωριστεί ως ο κυριότερος μικροβιολογικός κίνδυνος στις ζωοτροφές, αλλά οι συνέπειες αυτού για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου παραμένουν ασαφής (Davies et al., 2001, EFSA, 2006). Οι κυριότεροι ορότυποι σαλμονέλας που παρουσιάζονται στις ζωοτροφές είναι οι : *S. Livingstone*, *S. Senftenberg* και *S. Montevideo*. Ο ορότυπος *S. Enteritidis* που είναι και από τους πιο κοινούς όσον αφορά τον άνθρωπο, απομονώνεται πιο σπάνια από τις ζωοτροφές.

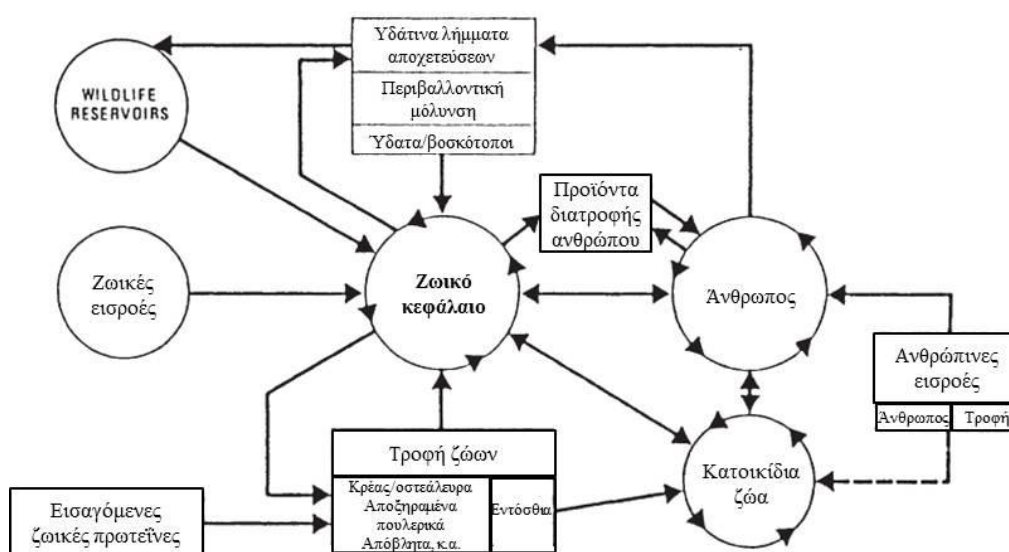
Σε χώρες με χαμηλό επιπολασμό σαλμονέλας στα ζώα, οι ζωοτροφές, θεωρούνται ότι είναι η κύρια πηγή αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο, είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθεί ο κίνδυνος για τη δημόσια υγεία που συνδέεται με την παρουσία σαλμονέλας σε ζωοτροφές στις χώρες με υψηλά ποσοστά επιπολασμού (EFSA, 2008). Παρόλο που μόνο ελάχιστοι από τους ορότυπους που απομονώνονται από τις ζωοτροφές προκαλούν παθολογία στα προσβεβλημένα ζώα, είναι πιθανό ακόμη και όλοι αυτοί οι ορότυποι να είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο.

1.1.4 Αίτια-πηγές επιμόλυνσης των ζωοτροφών και τρόποι αντιμετώπισης

Διάφοροι παράγοντες παίζουν ρόλο στην πιθανή επιμόλυνση των ζωοτροφών όπως η προέλευση των πρώτων υλών, οι διαδικασίες και ο τρόπος μεταφοράς τους, οι χειρισμοί μεταποίησης, οι συνθήκες αποθήκευσης κ.α. (Durand et al., 1990, Whyte et al., 2002).

Όσον αφορά στις παραγωγικές μονάδες ζωοτροφών, η μόλυνση με σαλμονέλα μπορεί να συνδέεται με διάφορους παράγοντες όπως: μόλυνση μέσω της σκόνης κατά την φόρτωση-εκφόρτωση (Davies & Wray, 1996, Whyte et al., 2002), παρουσία μολυσματικών φορέων (έντομα, πουλιά κ.α.), (Maciorowski et al., 2006) και κακές συνθήκες υγιεινής (ESFA, 2008). Οι συνθήκες παραγωγής όπως η υγρασία και η θερμοκρασία έχουν επίσης επιπτώσεις στο επίπεδο της επιμόλυνσης των ζωοτροφών. Η κοκκοποίηση, σαν μέτρο ελέγχου, δεν είναι σε θέση να απαλείψει εντελώς τις μικροβιακές μολύνσεις αλλά σαφώς μειώνει το μικροβιολογικό φορτίο των ζωοτροφών (Hacking et al., 1978, McCapes et al., 1989).

Πολλές πρωτεϊνούχες πρώτες ύλες των ζωοτροφών είναι πιθανές πηγές μόλυνσης σαλμονέλας (EFSA, 2009, Hoszowski et al., 2008, Malmqvist et al., 1995) και μπορεί μέσω αυτών των πρώτων υλών να εισαχθεί ο παθογόνος στις βιομηχανίες παρασκευής ζωοτροφών ή και στα εκτροφεία χοίρων. Μέσω των συστατικών των ζωοτροφών θα μπορούσαν να εισαχθούν στην τροφική αλυσίδα νέα στελέχη, όπως παράδειγμα η *S. Agona* η οποία βρισκονταν σε μολυσμένα ιχθυάλευρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγή ζωοτροφών πουλερικών (Clark et al., 1973).



Εικόνα 1.3 Ο “κύκλος” επιμόλυνσης των ζωοτροφών με σαλμονέλα (WHO, 1983)

Η παρουσία παθογόνων βακτηρίων στις ζωοτροφές και ιδιαίτερα η παρουσία σαλμονέλας μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση των τροφίμων που προέρχονται από τα ζώα που έχουν τραφεί με τις μολυσμένες ζωοτροφές καθώς είναι πιθανό τα βακτήρια να μολύνουν τα σφάγια των ζώων ή μπορεί να προκληθεί διασταυρούμενη επιμόλυνση άλλων ειδών διατροφής, που μπορεί να οδηγήσει σε ανθρώπινη ασθένεια. Αν και ο εντοπισμός την αρχικής πηγής της μόλυνσης είναι δύσκολος, αρκετές διατροφικές κρίσεις (outbreaks) έχουν αναχθεί σε μολυσμένες ζωοτροφές (Paramithiotis et al., 2009). Οι βελτιώσεις που αφορούν στην ασφάλεια των ζωοτροφών θα πρέπει να περιλαμβάνουν αφενός την ενίσχυση των ελέγχων των ίδιων ζωοτροφών και των συστατικών τους και αφετέρου την παρακολούθηση και το συσχετισμό τους με την ανθρώπινη τροφική αλυσίδα.

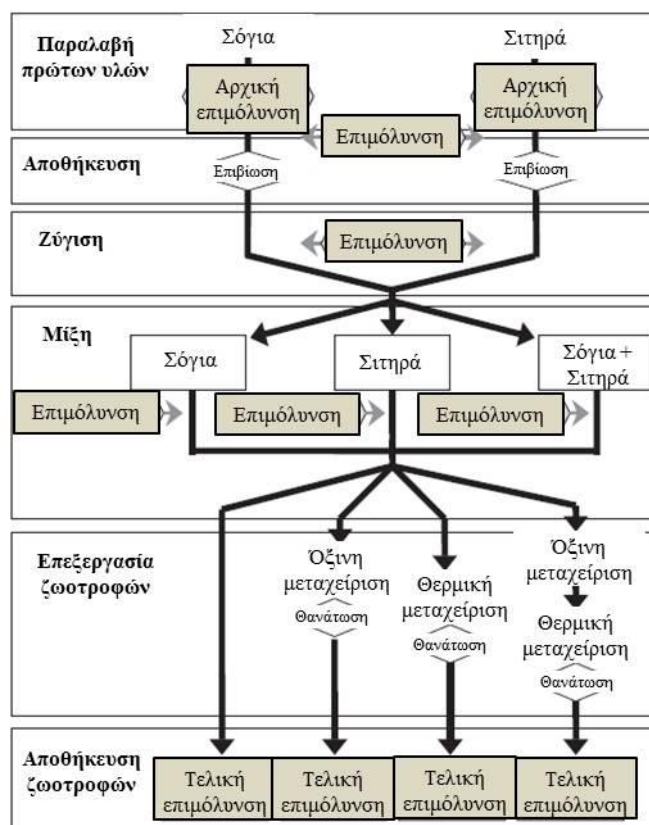
Η δημόσια υγεία και το επίπεδο κινδύνου που συνδέονται με την παρουσία σαλμονέλας στις ζωοτροφές εξαρτώνται και από τα στελέχη που είναι υπεύθυνα για την μόλυνση (Herikstad et al., 2002, EFSA, 2008). Η ΕΕ στους «στόχους» της περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και τον έλεγχο για στελέχη σαλμονέλας όπως τα Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow και Hadar δεδομένου ότι είναι υπεύθυνα για τα περισσότερα κρούσματα ανθρώπινων μολύνσεων (EFSA, 2009a).

Δεδομένου ότι όλες οι πρώτες ύλες και τα συστατικά των ζωοτροφών πρέπει να θεωρηθούν ως πιθανές πηγές σαλμονέλας, είναι απαραίτητη η θέσπιση διαδικασιών ελέγχου και εξυγίανσης ώστε να αποτραπεί η εξάπλωση της μόλυνσης (Nielsen and Wegener, 1997, Anonymous, 2000b). Διάφορα στάδια κατά τη διαδικασία παραγωγής των ζωοτροφών στοχεύουν στη μείωση ή εξάλειψη της σαλμονέλας: η εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας (Vanderwal, 1979, Sreenivas, 1990, Hansen & Israelsen, 1998, Beal et al., 2002), η χρήση οργανικών οξέων (Vanderwal, 1979, Hinton and Linton, 1988, Van Winsen et al., 1999), ή άλλων χημικών συντηρητικών (Rouse et al., 1988). Σήμερα, οι περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες διενεργούν κάποιο είδος τακτικών ελέγχων των πρώτων υλών κατά τη διαδικασία παραγωγής ή στο τελικό προϊόν (Anonymous, 1999). Ορισμένες δε χώρες έχουν θεσπίσει υποχρεωτικά προγράμματα για τον έλεγχο της σαλμονέλας κατά την παραγωγή ζωοτροφών για χοίρους. Στη Δανία και τη Νορβηγία για παράδειγμα, οι ζωοτροφές των χοίρων πρέπει να είναι θερμικά επεξεργασμένες (Nielsen and Wegener, 1997, Anonymous, 2002b).

Η κατανομή της σαλμονέλας στις μολυσμένες ζωοτροφές δεν είναι ενιαία και καθολική. Έτσι, τα δειγματοληπτικά πρωτόκολλα πρέπει να σχεδιάζονται σύμφωνα με μια κατάλληλη στατιστική ανάλυση (Legan et al., 2001). Το πρότυπο ISO 6579:2002, με ευαισθησία μέχρι και 65% και ακρίβεια μέχρι και 97% (Koyuncu & Haggblom, 2009), εγκρίθηκε από την ΕΕ ως πρότυπο για την παρακολούθηση της παρουσίας σαλμονέλας σε δείγματα ζωοτροφών (EFSA, 2008).

Γενικότερα ο κίνδυνος επιμόλυνσης των ζωοτροφών με σαλμονέλλα μπορεί να μειωθεί με διάφορες διαδικασίες στα αρχικά στάδια παραγωγής τους (στο αγρόκτημα) όπως:

- Αποθήκευση του λιπάσματος για περισσότερο από 2 μήνες, χωρίς καμία νέα εισροή,
- κομποστοποίηση,
- οργωμα μετά την εφαρμογή του λιπάσματος,
- αύξηση του παρερχόμενου χρόνου μεταξύ εφαρμογής των λιπασμάτων και της βοσκής των ζώων ή την συγκομιδή της καλλιέργειας,
- θερμική επεξεργασία των λιπασμάτων πριν από τη χρήση,
- επεξεργασία των λιπασμάτων με την προσθήκη ασβέστη (lime).



Εικόνα 1.4 Διάγραμμα ροής με τις πηγές επιμόλυνσης με σαλμονέλλα κατά τα στάδια παραγωγής των ζωοτροφών και τα αντίστοιχα μέτρα ελέγχου.

Όσον αφορά στις διαδικασίες επεξεργασίας και μεταποίησης των ζωοτροφών, για μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης τους με σαλμονέλλα μπορεί να εφαρμοστούν τα παρακάτω (EFSA 2008):

- θερμική επεξεργασία
- χρήση χημικών (οργανικά οξέα κ.α.)
- καθαρισμός και απολύμανση των εγκαταστάσεων επεξεργασίας και έλεγχος της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών εξυγίανσης,
- εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής,
- έλεγχος της περιεκτικότητας υγρασίας και ανάλογες ενέργειες
- διενέργεια τακτικών μικροβιολογικών ελέγχων στις πρώτες ύλες και στα παραγόμενα προϊόντα,
- καθαρισμός και απολύμανση των εγκαταστάσεων των σιλό και των αποθηκευτικών χώρων για τον εξοπλισμό,
- διατήρηση καλού εξαερισμού των σιλό,
- έλεγχος ζυυφίων -εντόμων κατά την αποθήκευση και μεταφορά.

1.2 ΕΥΘΥΝΕΣ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Σχετικά με την ασφάλεια των ζωοτροφών

Τα ζώα που προορίζονται για παραγωγή τροφής είναι οι κύριες πηγές μη τυφοειδών οροτύπων της *S. enterica*, οι οποίοι υπολογίζεται ότι προκαλούν 1.412.498 ανθρώπινων ασθενειών, 16.430 εισαγωγές σε νοσοκομεία, και 582 θανάτους ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες. Είναι λοιπόν εμφανής η ανάγκη θέσπισης νόμων και κανόνων για αύξηση της ασφάλειας των ζωοτροφών.

Όσον αφορά στην Ευρώπη, μετά τις κρίσεις που αφορούσαν στα τρόφιμα (σκάνδαλο σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας (BSE), σκάνδαλο διοξινών, διχογνωμία όσον αφορά τα GMOs, διασταυρούμενη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, κ.α.) στο δεύτερο ήμισυ της δεκαετίας του 1990, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) υιοθέτησε ένα νομικό πλαίσιο, τη "γενική νομοθεσία περί τροφίμων" (EU, 2002a), 'General Food Law', η οποία έθεσε τις ζωοτροφές στο ίδιο επίπεδο με εκείνο των τροφίμων όσον αφορά την ασφάλεια των καταναλωτών. Ο παρών κανονισμός, μεταξύ άλλων,

καθιέρωσε το στοιχείο της ανιχνευσιμότητας κατά την τροφική αλυσίδα. Επιπλέον, πρόσφατα, η ΕΕ υιοθέτησε ένα πολύ σημαντικό κανονισμό περί υγιεινής των ζωοτροφών (ΕΥ, 2005). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, οι παραγωγοί ζωοτροφών είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ασφαλών ζωοτροφών (ΕΚ 183/2005) και για την ανιχνευσιμότητα των ζωοτροφών και πρώτων υλών τους (ΕΚ/178/2002). Λόγω της άμεσης συνάρτησης των ζωοτροφών με τα τελικά προϊόντα πρέπει να διασφαλίζεται η ασφάλεια κατά την παραγωγή τους μέσω εφαρμογής αρχών του HACCP, των GHP και GMP, καθ' όλα τα στάδια παραγωγής, από τις πρώτες ύλες και τις εγκαταστάσεις-εξοπλισμούς μέχρι τα τελικά προϊόντα.

Στην Αμερική αρκετές εθνικές - ομοσπονδιακές υπηρεσίες είναι αρμόδιες για τις διάφορες συνιστώσες της ασφάλειας των ζωοτροφών. Σύμφωνα με την «Federal Food, Drug, and Cosmetic Act» του 1906, όπως τροποποιήθηκε, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει την εξουσία να διασφαλίζει ότι οι ζωοτροφές είναι κατάλληλα επισημασμένες, είναι ασφαλείς για την προοριζόμενη χρήση τους και δε βλάπτουν την υγεία των καταναλωτών, όταν τραφούν με αυτές τα ζώα. Επιπλέον, το Υπουργείο Μεταφορών των ΗΠΑ έχει την εξουσία να επιβάλει κανονισμούς για την ασφαλή μεταφορά των ζωοτροφών. Το αμερικανικό υπουργείο Γεωργίας (τμήμα Animal και Plant Health Inspection Service) είναι υπεύθυνο για τη διασφάλιση της υγείας και φροντίδας των ζώων και για τη βελτίωση της παραγωγικότητας της γεωργίας, συμβάλλοντας παράλληλα στην διασφάλιση της δημόσιας υγείας και οικονομίας.

1.3 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ SALMONELLA SPP.

1.3.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Τα περισσότερα στελέχη του είδους *Salmonella spp.* θεωρούνται ως ανθρώπινα παθογόνα, αν και διαφέρουν στα χαρακτηριστικά και τη δριμύτητα της ασθένειας που προκαλούν. Ο τυφοειδής πυρετός είναι το πιο δριμύ αλλά και το πρώτο χαρακτηριστικό της μόλυνσης από σαλμονέλα που περιγράφηκε αξιόπιστα. Αυτό οφείλεται στο γάλλο παθολόγο Bretonneau και στη μελέτη του το 1829 για τον τυφοειδή πυρετό. Το 1856, ο άγγλος παθολόγος William Budd κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κάθε περίπτωση τυφοειδούς προσβολής συνδέεται επιδημιολογικά

με μια προηγούμενη περίπτωση και ότι μια συγκεκριμένη τοξίνη αποβάλλεται με τα περιττώματα των ασθενών.

Οι Salmon και Smith το 1885 απομόνωσαν το μικροοργανισμό *Salmonella enterica* var. *Choleraesuis* από άρρωστους χοίρους με χολέρα (μια ασθένεια που τώρα είναι γνωστό ότι έχει ιογενή προέλευση) και μια πληθώρα άλλων στελεχών που προκαλούσαν τροφιμογενείς ασθένειες και ζωικές προσβολές. Το γένος *Salmonella* spp. «ανακαλύφθηκε» τελικά το 1900 από τον Lignieres και ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του αμερικανού παθολόγου κτηνίατρου D.E. Salmon, που ήταν ο επικεφαλής του προγράμματος του USDA το 1885 που περιέγραψε το μικροοργανισμό *Salmonella enterica* var. *Choleraesuis*. Η σαλμονέλα έχει πλέον καθιερωθεί ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως

1.3.2 Οικογένεια *Enterobacteriaceae*

Η οικογένεια αυτή είναι η μεγαλύτερη ομάδα από τα μη φωτοσυνθετικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Χαρακτηριστικά τους είναι το ραβδοειδές ευθύγραμμο ή καμπυλοειδές σχήμα, έχουν διαστάσεις 0,3-1,0 x 1,0-6,0 μm. Ορισμένα είναι ανίκανα για κίνηση ενώ τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια που μπορεί να είναι περίτριχα, πολικά ή μεικτού τύπου (πολικά και περίτριχα). Σε αναερόβιες συνθήκες η ενέργεια προέρχεται από τη ζύμωση σακχάρων ενώ σε αερόβιες συνθήκες, για την οξειδωτική αναπνοή, χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων (οργανικά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες). Ο πιο συνηθισμένος τύπος ζύμωσης στα εντεροβακτήρια είναι η ζύμωση με την οποία σχηματίζονται τα οξέα γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και μυρμηκικό (ή CO₂ και H₂) καθώς και αιθυλική αλκοόλη (mixed acid fermentation), (Holt, 1974). Ο σχηματισμός ποσοτήτων αερίων σαν αποτέλεσμα της ζύμωσης του σακχάρου είναι ιδιότητα χρήσιμη για την ταυτοποίηση των διάφορων μελών των εντεροβακτηρίων: το γένος *Escherichia* που συσσωρεύει αέρια, διαχωρίζεται από τα παθογόνα του γένους *Shigella* και από το είδος *Salmonella* Typhi τα οποία ζυμώνουν τα σάκχαρα χωρίς να δημιουργούν αέρια. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλά στους 37°C. Ωστόσο πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C και είναι συχνά περισσότερο ενεργά μεταβολικά σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά στη

δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, εκτός από τη *Yersinia dysenteriae* και είδη του γένους *Xenorhabdus* όπως το *X. luminescens*.

Η κατανομή τους ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και τα δέντρα και στα ζώα από τα σκουλήκια και τα έντομα μέχρι και τον άνθρωπο (Vassos, 2004). Με βάση κριτήρια βιοχημικά (αντίδραση καταλάσης και οξειδάσης), μορφολογικά (τύπος μαστιγίων) και γενετικά (ομόλογες αλληλουχίες βάσεων), η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη (Holt, 1974): *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Habnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluuyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Prividencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenorhabdus*. Ενδιαφέρον για την μικροβιολογία τροφίμων παρουσιάζουν κυρίως τα γένη : *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* και *Erwinia*.

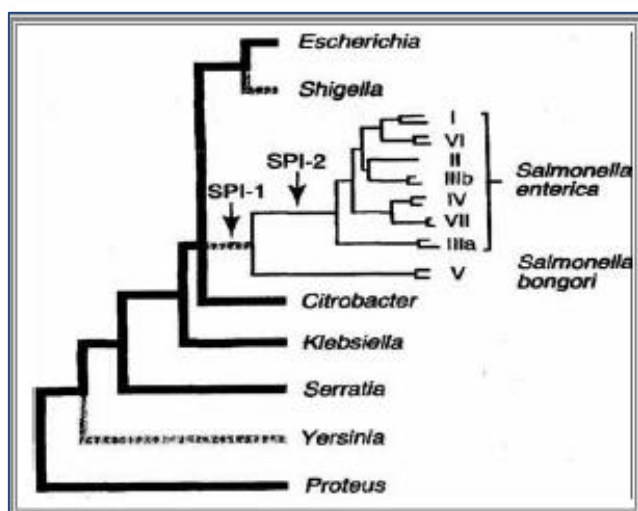
1.3.3 Μελέτη του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* έχει ευρεία εξάπλωση. Ανιχνεύεται στο εντερικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου, στα κόπρανα, στα ούρα, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Η ονοματολογία των ειδών του γένους *Salmonella* είναι αμφισβητούμενη, δεδομένου ότι η αρχική ταξινόμηση του γένους δεν βασίστηκε στην ομολογία DNA, αλλά τα ονόματα δόθηκαν σύμφωνα με τις κλινικές εκτιμήσεις, π.χ., *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *S. abortus-ovis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. dublin*, *S. bongor* ή την γεωγραφική θέση που η ασθένεια εμφανίστηκε. Έχουν περιγραφεί πολλοί ορότυποι του γένους *Salmonella*. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White έχει αποδειχτεί η πιο χρήσιμη τεχνική για ορισμό διαφοροποιήσεων εντός του γένους. Αυτή η τεχνική περιγράφει τους μικροοργανισμούς βάσει των σωματικών αντιγόνων τους (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) αλλά και βάσει των αντιγόνων των καψιδίων (Vi) που διαθέτουν τα στελέχη *S. typhi*, *S. dublin* και σε μερικές περιπτώσεις τα στελέχη *S. paratyphi*. Η τεχνική αυτή διέκρινε 100 διαφορετικούς ορότυπους το έτος 1941. Σήμερα αυτή η ταξινόμηση ανά ορότυπο διακρίνει 2463 ορότυπους (Kaufmann, 1966).

Πίνακας 1		
Είδη <i>σαλμονέλων</i> , υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποι τους ,σχέδιο Kaufmann-White		
Είδη και υποείδη <i>σαλμονέλων</i>	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος βιότοπος
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i> (V)	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
Total	2463	

Πίνακας 1.1 Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White.

Τελικά διαπιστώθηκε ότι όλοι οι ορότυποι του γένους *Salmonella* αποτελούν μια ενιαία ομάδα υβριδοποίησης DNA, δηλαδή ένα ενιαίο είδος που αποτελείται από επτά υποείδη. Για να αποφευχθεί η σύγχυση με τα γνωστά ονόματα των ορότυπων, το είδος *Salmonella enterica* προτάθηκε με τα ακόλουθα ονόματα για τα υποείδη: *enterica* I, *salamae* II, *houtenae* IV, *bongori* B, *diarizonae* IIIb, *arizonae* IIIa, *Indica* V I (Holt, 1974).



Εικόνα 1.5 Φυλογενετικό δέντρο της εξέλιξης των βακτηριακών ειδών

1.3.4 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Στο γένος *Salmonella* ανήκουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Εξαιρέση αποτελούν οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. dublin*, που έχουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα και οι *S. gallinarum*, *S. pullorum*, που είναι ακίνητες. Είναι χημειοαυτότροφα και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στην ευνοϊκή θερμοκρασία των 37° C. Η D- γλυκόζη και άλλοι υδρογονάνθρακες καταβολίζονται με τη παραγωγή οξέος και συχνά παράγωγη αερίου. Είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, αρνητικά στις δοκιμές της ινδόλης και τη Voges-Proskauer και θετικά στις δοκιμές ερυθρού του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων του Simmon (Holt, 1974). Παράγουν H₂S και δεν υδρολύουν την ουρία. Οι υδατάνθρακες που συνήθως ζυμώνονται είναι οι εξής:

- L- αραβινόζη
- μαλτόζη
- D-μανιτόλη
- D-μανόζη
- L- ραμνόζη
- D-σορβιτόλη
- D-ξυλόζη
- Τρεχαλόζη.

Οι υδατάνθρακες αυτοί φέρουν σημαντικά αντιγόνα που είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται στα σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O), βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K).

➤ Σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O). Είναι λιποπολυσακχαρίτες και αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα αντιγόνα O είναι ανθεκτικά (2 ½ ώρες σε 100°C) και δεν καταστρέφονται από την αλκοόλη και τα οξέα. Αποτελούνται από διάφορα αντιγονικά συστατικά που χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς.

➤ Βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H). Είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, ευαίσθητες στη θερμότητα, στην αλκοόλη και στα οξέα. Τα βλεφαριδικά αντιγόνα αποτελούνται από περισσότερα αντιγονικά συστατικά. Οι διάφοροι ορότυποι του γένους *Salmonella* έχουν διαφορετικό συνδυασμό αντιγονικών συστατικών, τα οποία σύμφωνα με το σχήμα Kauffmann-White χωρίζονται σε δύο είδη που ονομάζονται

φάση 1 (ειδική φάση) και φάση 2 (μη ειδική φάση). Ένας ορότυπος σαλμονέλας είναι δυνατό να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης, όπως η *S. enteritidis*, ή να έχει αντιγόνα και των δύο φάσεων, όπως η *S. typhimurium* και η *S. cholerae-suis*. Οι *S. gallinarum* και *S. pullorum*, στερούνται βλεφαρίδων, επομένως δεν έχουν βλεφαριδικά αντιγόνα.

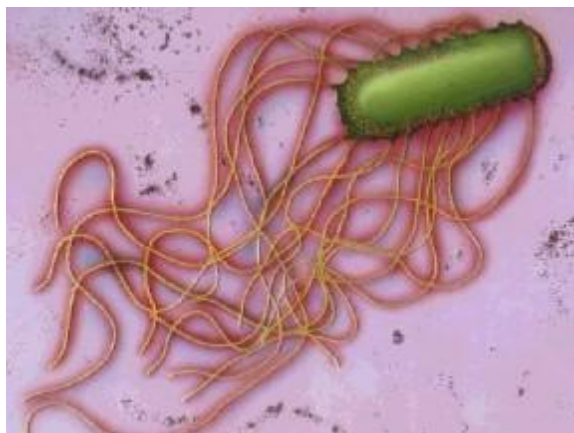
➤ Αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K). Τα αντιγόνα αυτά παρατηρούνται μόνο στους παθογόνους για τον άνθρωπο ορότυπους *S. typhi* και *S. paratyphi*. Είναι αντιγόνα του βακτηριδιακού ελύτρου, πολυσακχαριδικής φύσεως. Εμποδίζουν τον προσδιορισμό του αντιγόνου O, επειδή περιβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό πριν από την ταυτοποίηση του αντιγόνου O πρέπει να προηγηθεί καταστροφή των αντιγόνων της κάψας με κατάλληλο τρόπο. Από τα περισσότερο γνωστά αντιγόνα του ελύτρου, είναι το αντιγόνο Vi (ονομασία που προέρχεται από τη λέξη Virulent =λοιμογόνος). Καταστρέφεται υπό την επίδραση της φαινόλης όταν θερμανθεί στους 60°C για μία ώρα. Τα είδη του γένους *Salmonella* που έχουν το αντιγόνο Vi θεωρούνται περισσότερο λοιμογόνα (Moise, 1978). Στο γένος *Salmonella* η λεπτομερής ανάλυση των αντιγόνων O και H είχε σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση πολλών εκατοντάδων διαφορετικών ορότυπων. Η αντιγονική αυτή ταυτοποίηση αν και δεν έχει μεγάλη ταξινομική αξία είναι σημαντική από επιδημιολογική άποψη. Ο ορότυπος ενός παθογονικού στελέχους *Salmonella*, αποτελεί δείκτη αναγνώρισης του και έτσι γίνεται δυνατή η παρακολούθηση και ταυτοποίηση του στελέχους σε περιπτώσεις μαζικών τροφικών δηλητηριάσεων.

Τα στελέχη σαλμονέλας επίσης ταξινομούνται σε διάφορους τύπους με βάση την ευαισθησία τους στους βακτηριοφάγους.

Η σαλμονέλα είναι ανθεκτικός μικροοργανισμός και επιζεί ακόμη και όταν στερείται των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για το μεταβολισμό της. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανθεκτικότητά τους σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Αναπτύσσονται σε pH 4-9 και σε άλμη πυκνότητας μέχρι 7 έως 8% NaCl. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το κυτταρικό τοίχωμα τους περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με τη λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαρίτες ελευθερώνονται και ενεργούν ως ενδοτοξίνες. Η σαλμονέλα δεν παράγει εξωτοξίνες και ο μηχανισμός παθογένειας της φαίνεται ότι έχει σχέση με το O αντιγόνο της που δρα ως ενδοτοξίνη (Holt, 2000).



Εικόνα 1.6 Αποικίες σαλμονέλας σε υπόστρωμα XLD



Εικόνα 1.7 Μικρογραφία αναπαράστασης του βακτηρίου σαλμονέλας

1.3.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Salmonella spp.* είναι υπεύθυνος για έναν αριθμό διαφορετικών κλινικών συνδρόμων.

Εντερίτιδα. Οι γαστρεντερικές μολύνσεις είναι κυρίως συνδεδεμένες με εκείνους τους ορότυπους που εμφανίζονται ευρέως στα ζώα και τους ανθρώπους. Μπορούν να κυμανθούν από πλευράς δριμύτητας από ασυμπτωματική μεταφορά μέχρι διάρροια που είναι και ο πιο κοινός τύπος σαλμονέλωσης. Η περίοδος επώασης για εντερίτιδα είναι μεταξύ 6 και 48 ωρών. Τα κύρια συμπτώματα του ήπιου πυρετού, της ναυτίας, του εμετού, των κοιλιακών πόνων και της διάρροιας διαρκούν για μερικές ημέρες αλλά σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να εμμείνουν για μια εβδομάδα ή περισσότερο. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να καταστεί πιο σοβαρή στις ιδιαίτερα ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως στους πολύ νέους, στους πολύ ηλικιωμένους και στους ήδη ασθενείς. Κατόπιν κατάποσης, ο μικροοργανισμός θα επιζήσει της διέλευσης μέσω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, θα προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω συνδέσμων ανθεκτικών στη μανόζη. Στη συνέχεια εισάγονται εντός των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκύττωση μέσω δέκτη (receptor mediated endocytosis). Η ικανότητα της *Salmonella spp.* να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα προσδίδει ουσιαστική δυναμικότητα στην παθογένειά της. Η κατανόηση της μοριακής βάσης αυτής της διαδικασίας έχει αυξηθεί αρκετά με την

ανακάλυψη ότι κωδικοποιείται κατά ένα μεγάλο μέρος από μια περιοχή 35-40 kb του χρωμοσώματος, που περιγράφεται ως περιοχή παθογένειας. Αυτή η περιοχή του DNA κωδικοποιεί ένα σύνθετο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III, που απαιτούνται για την αποστολή σημάτων που αποσυντονίζουν τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Τέτοια συστήματα υπάρχουν επίσης και σε διάφορους άλλους εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως τα είδη *Shigella*, *Yersinia* και τα εντεροπαθογόνα και εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli*. Η σαλμονέλα που έχει εισαχθεί με ενδοκύτωση περνά μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου ενός συνδεδεμένου στη μεμβράνη χυμοτοπίου, όπου πολλαπλασιάζονται και απελευθερώνονται έπειτα στο μεμβρανώδες βλεννογόνο. Αυτό προκαλεί μια ροή φλεγμονωδών κυττάρων που οδηγούν στην απελευθέρωση προσταγλαδινών που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία προκαλεί έκκριση ρευστών στον εντερικό αυλό. Η εικόνα είναι λίγο πιο σύνθετη αν αναλογιστεί κανείς ότι υπάρχουν τουλάχιστον άλλες τέσσερις περιοχές παθογένειας που συμβάλλουν κι αυτές στην όλη παθογένεια του μικροοργανισμού.

Συστηματική νόσος. Οι ορότυποι *Salmonella spp.* που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή είναι πιο επιθετικοί και τείνουν να προκαλέσουν συστηματικές νόσους στους ξενιστές τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα τους που συνδέεται με την ανθεκτικότητά τους στην καταπολέμηση από τα φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, αυτό ισχύει για τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βακίλους *S. typhi* και *S. Paratyphi* A, B, και C, οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό. Ο τυφοειδής πυρετός έχει μια περίοδο επώασης από 3 έως 56 ημέρες, αν και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Ο επιτιθέμενος μικροοργανισμός *Salmonella spp.* διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και έπειτα μεταφέρεται από τα λεμφικά κύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του το παθογόνο στα μακροφάγα, απελευθερώνεται στη ροή του αίματος και διαδίδεται σε ολόκληρο το σώμα. Αφαιρούνται από το αίμα και πάλι με χρήση των μακροφάγων αλλά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια καταστροφή τελικά των μακροφάγων τα οποία απελευθερώνουν με τη σειρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ροή του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ασθένειας, ο μικροοργανισμός φθάνει στη χοληδόχο κύστη όπου πολλαπλασιάζεται στη χολή. Η ροή μολυσμένης

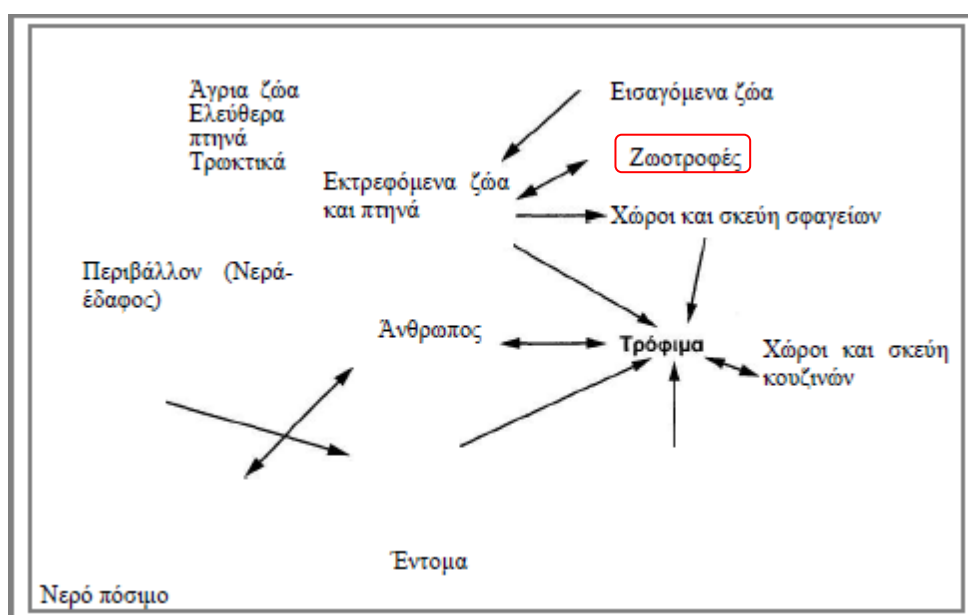
χολής επιμολύνει το λεπτό έντερο οπότε και προκαλείται φλεγμονή και έλκος. Ο πυρετός εμμένει με παράλληλη διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί αιμορραγία των ελκών και διάτρηση του εντέρου που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Σε ηπιότερες περιπτώσεις, τα έλκη θεραπεύονται και ο πυρετός πέφτει σταδιακά μετά από 4-5 εβδομάδες ανάρρωσης. Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella spp.* εντός των κυττάρων των ξενιστών και η εν γένει παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμοτοξικότητα του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman και Ochman, 1997). Αρκετά από αυτά τα γονίδια εδρεύουν ως οπερόνιο σε ένα μεγάλο πλασμίδιο κοινό για τους περισσότερους οροτύπους *Salmonella spp.* ενώ ακόμη ένας μεγάλος αριθμός βρίσκεται σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος μέσα σε ζώνες παθογονικότητας (pathogenicity islands). Η ζώνη παθογονικότητας της οποίας η δράση έχει αναλυθεί περισσότερο είναι η SPI-1, μια περιοχή 40 kb που διαθέτει πάνω από 30 γονίδια και κωδικοποιεί δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς ρόλους, την InvF και HilA. Επίσης κωδικοποιεί και τα στοιχεία του συστήματος έκκρισης τύπου III, που καλούνται Inv/SPA και είναι απαραίτητα για την προσβολή και τη λοιμοτοξικότητα που προκαλούν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μια δεύτερη ζώνη παθογένειας 40 kb, η SPI-2, έχει εντοπιστεί σε χρωμόσωμα στο στέλεχος *S. enterica serovar Typhimurium* (Ochman et al., 1996· Shea et al., 1996). Η ζώνη SPI-2 που ευθύνεται για την πρόκληση συστηματικών νοσημάτων (systemic disease), περιέχει τουλάχιστον 17 γονίδια που κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων και ένα σύστημα έκκρισης τύπου III που καλείται σύστημα Spi/SsA. Αυτά τα συστήματα ξεχωρίζουν από πλευράς δομής και λειτουργίας από το σύστημα SPI-1 Inv/Spa και το σύστημα έκκρισης τύπου III που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη λειτουργία των μαστιγίων σε άλλα βακτηριακά γένη. Μια ακόμα περιοχή 7.8 kb η οποία εντοπίζεται στο μεγάλο πλασμίδιο λοιμοτοξικότητας (large virulence plasmid) του βακτηρίου *Salmonella spp* και κωδικοποιεί πέντε γονίδια *spvRABCD*, είναι επίσης υπεύθυνη για την λοιμοτοξικότητα που προκαλεί το παθογόνο.

1.3.6 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η σαλμονέλωση περιγράφεται ως μόλυνση προερχόμενη από τα ζώα, δεδομένου ότι η σημαντικότερη αιτία της ασθένειας αυτής στον άνθρωπο είναι η επαφή με τα μολυσμένα ζώα ή τα προϊόντα τους. Ανεπαρκής ή απύουσα τελική θερμική επεξεργασία είναι οι πιο κοινοί παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόκληση κρουσμάτων σαλμονέλωσης και επιτρέπουν στο παθογόνο να αναπτυχθεί στα τρόφιμα. Το κρέας, το γάλα, τα πουλερικά και τα αυγά είναι εν δυνάμει φορείς του βακτηρίου, οι οποίοι αν δεν δεχτούν την απαιτούμενη επεξεργασία επιτρέπουν στη σαλμονέλα να επιζήσει και δύνανται να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση άλλων τροφίμων που καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Η διαμείωση μπορεί να εμφανιστεί μέσω της άμεσης επαφής ή έμμεσα μέσω του μολυσμένου εξοπλισμού.

Τα τρόφιμα μπορούν να μολυνθούν με:

- τα κόπρανα των ζώων.
- τα χέρια ατόμων φορέων που ασχολούνται με την επεξεργασία των τροφίμων.
- την επαφή τους με μολυσμένα εργαλεία και σκεύη.
- μολυσμένα ζώα ή κτηνοτροφικά προϊόντα (π.χ. αυγά) (Doyle et al., 2001).



Εικόνα 1.8 Διάγραμμα μεταφοράς-επιμόλυνσης με σαλμονέλα.

1.3.7 Μέτρα προφύλαξης

Τα μέτρα που προτείνονται για τον περιορισμό της παρουσίας του μικροοργανισμού σαλμονέλας και την αποφυγή των τροφολοιμώξεων είναι πολλαπλά. Αυτά εκτείνονται από ελέγχους των Κρατικών Υπηρεσιών και Προγράμματα σε Εθνικό και Διεθνές Επίπεδο με ρεαλιστικά κριτήρια και ανάλυση στατιστικών δεδομένων, μέχρι απλές ενέργειες που πρέπει να έχει υπόψη του ο κάθε άνθρωπος. Έτσι διακρίνουμε τα παρακάτω ζωοτεχνικά μέτρα:

- Εκπόνηση Προγραμμάτων σε Εθνικό Επίπεδο πρόληψης της μετάδοσης της σαλμονέλας στα ζώα και στα πτηνά.
- Έλεγχος των ζωοτροφών.
- Προληπτική υγιεινή των ζώων και των πτηνών και του περιβάλλοντος στους στάβλους και τις φάρμες.
- Παραγωγή ζώων απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η σαλμονέλα (specific pathogen free).
- Εκπαίδευση του προσωπικού των σταβλικών εγκαταστάσεων.
- Αποτελεσματικός έλεγχος πριν την σφαγή των ζώων και των πτηνών.
- Πληροφοριακή σύνδεση των ευρημάτων των σφαγείων με όλο το κύκλωμα παραγωγής και διακίνησης του κρέατος (Εθνικό και Διεθνές Επίπεδο).
- Αντιμετώπιση των ασθενειών με χρήση κατάλληλων φαρμάκων.

1.3.8 Επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella spp.* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η ομοιόσταση του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella spp.* όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινες τιμές pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός έχει προηγουμένως υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση. Αυτό επιτρέπει τη σύνθεση εκ μέρους του βακτηριακού κυττάρου πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid stress proteins) όταν βρεθεί αργότερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH περιβάλλοντος, κάτι το οποίο θα ήταν ανέφικτο σε κύτταρα που δεν θα είχαν υποστεί

αυτή την αρχική προσαρμογή και θα εκτίθονταν απευθείας σε ακραία όξινες τιμές pH. Ένα από τα συστήματα που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (lysine decarboxylase - CadA) το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνης:καδαβερίνης (CadB) (Park et al., 1996). Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. μπορεί να επιζήσει πολλών διαφορετικών συνθηκών όξινης καταπόνησης, αφού η επιβίωσή του εξαρτάται από το ποιά αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ανάπτυξης (λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη) οπότε και θέτει σε «λειτουργία» το αντίστοιχο σύστημα επαγωγής οξεοανθεκτικότητας. Έχουν αναγνωριστεί τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι RpoS, Fur και PhoP, που ελέγχουν διάφορα συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση και προκαλούν την έκφραση μιας ομάδας πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες. Ακόμη ο παράγοντας σίγμα, σ^S , που κωδικοποιείται από το *rpoS* ρυθμίζει ένα μέρος της οξεοανθεκτικότητας της *Salmonella* spp. και αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο ρυθμιστή της φυσιολογίας του κυττάρου κατά την στατική φάση ανάπτυξης αλλά έχει αποδειχτεί η χρησιμότητά του και κατά την εκθετική φάση (Hengge-Aronis, 1996). Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ανωτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγούν σε πιθανή μείωση της ανθεκτικότητας του κυττάρου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, αποδεικνύοντας το σπουδαίο ρόλο που επιτελούν σ' αυτό τον τομέα.

1.4 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

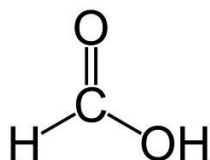
1.4.1 Δράση των οργανικών οξέων

Είναι πλέον σαφές ότι είναι απαραίτητη η εξυγίανση των ζωοτρόφων με στόχο την ασφάλεια των τελικών προϊόντων – τροφίμων. Για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου σαλμονέλας των ζωοτρόφων πέρα των άλλων μεθόδων γίνεται και χρήση οργανικών οξέων, κυρίως φορμικού, προπιονικού και γαλακτικού καθώς και μίξη αυτών.

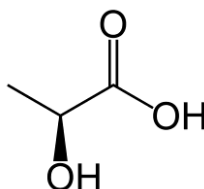
Τα οργανικά οξέα με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα (short-chain fatty acids, SCFAs) όπως μυρμηκικό (φορμικό), οξικό, προπιονικό, βενζοϊκό, κιτρικό και γαλακτικό είναι γνωστό ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Bergeim, 1940). Η βακτηριοστατική δράση των SCFAs έχει μελετηθεί εκτενέστερα στα εντεροβακτήρια, όπως η *Salmonella* spp., η *Escherichia coli* και η *Shigella flexneri*, με

αποτελεσματική συγκέντρωση των οξέων μεταξύ 10 και 100 mM (Van immerseel et al., 2003).

Η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων οφείλεται στο αδιάστατο μόριο τους. Στην αδιάστατη μορφή τους ορισμένα οργανικά οξέα είναι πολύ διαλυτά στις κυτταρικές μεμβράνες. Επίσης, μόνο τα λιπόφιλα οξέα παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Η pK_a ενός οξέος είναι η τιμή pH στην οποία το 50% του συνολικού οξέος είναι αδιάστατο. Τα οργανικά οξέα, όντας ασθενή οξέα, έχουν pK_a υψηλή, επομένως βρίσκονται κυρίως στην αδιάστατη (άρα και λιπόφιλη) μορφή τους, ιδίως στα όξινα περιβάλλοντα. Δεδομένου ότι η κυτταρική μεμβράνη δεν είναι διαπερατή από ενώσεις στην ιοντική μορφή τους, τα οργανικά οξέα είναι περισσότερο δραστικά από τα ισχυρά ανόργανα οξέα γιατί διαπερνούν ευκολότερα τις κυτταρικές μεμβράνες και αυξάνουν περισσότερο τη διαπερατότητα τους. Έτσι, τα οργανικά οξέα μπορούν και διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς έχουν λιπόφυλο χαρακτήρα (αφορά το ποσοστό που βρίσκεται στην αδιάστατη μορφή του) και είναι χημικά συγγενή με τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης των κυττάρων. Επίσης έχουν επαρκή διαλυτότητα και στα υδάτινα μέσα, ούτως ώστε να παραμένουν δραστικά στο υδάτινο έσω- αλλά και έξω-κυτταρικό περιβάλλον. Αυτό ισχύει για τα οργανικά οξέα με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα.



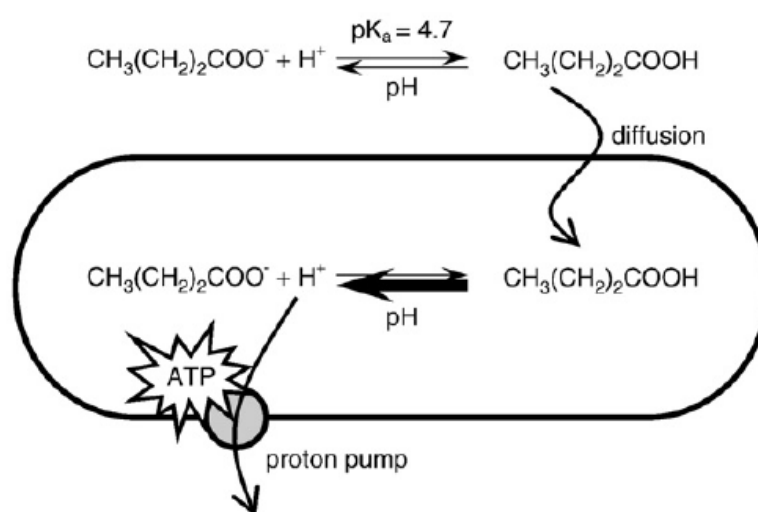
Εικόνα 1.2 Φορμικό οξύ



Εικόνα 1.3 Γαλακτικό οξύ

Το αδιάστατο οργανικό οξύ ως λιπόφιλο εισχωρεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου δίσταται, απελευθερώνει H^+ , μειώνοντας έτσι το pH στο εσωτερικό του κυττάρου. Το κύτταρο προκειμένου να επαναποκτήσει το αρχικό του pH αποβάλλει την περίσσεια πρωτονίων. Η αποβολή αυτή όμως απαιτεί ενέργεια διότι η κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών είναι αδιαπέρατη στα H^+ , και γίνεται μόνο με ενεργό μεταφορά. Οι αναερόβιοι οργανισμοί παράγουν την ενέργεια αυτή (υπό μορφή ATP) μέσω της γλυκόλυσης ενώ οι αναερόβιοι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα οργανικά οξέα αυτό που προκαλούν είναι ένα stress H^+ στο κύτταρο, με συνέπεια την εξάντληση του ηλεκτροχημικού δυναμικού (μηδενισμός του ΔpH), διαταραχή της οξεοβασικής ισορροπίας και αποσύζευξη της ενεργούς μεταφοράς από το μονοπάτι της παραγωγής ενέργειας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης αλλοδομούνται, με συνέπεια τις δομικές αλλαγές στη μεμβράνη και αύξηση της διαπερατότητάς της. Το κύτταρο αδυνατεί να προσλάβει θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον του ενώ συγχρόνως διαρρέουν εσωκυτταρικά συστατικά, χάνεται η ισορροπία και εν τέλει το κύτταρο καταστρέφεται.



Εικόνα 1.11 Μηχανισμός δράσης των οργανικών οξέων. Η αδιάστατη μορφή του οξέος εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου διάμεσου της μεμβράνης. Σαν συνέπεια αυτού το κύτταρο πρέπει να δαπανήσει ενέργεια (ATP) προκειμένου να αποβάλλει την περίσσεια πρωτονίων.

1.4.2 Παρεμπόδιση της παθογένειας από τα SCFAs

Εκτός από την ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα οργανικά οξέα με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα (SCFA) έχει επίσης διαπιστωθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν παράγοντες παθογένειας των βακτηρίων (virulence factors). Για παράδειγμα, όσον αφορά στη *Salmonella enterica*, όταν αναπτύχθηκε σε υποστρώματα στα οποία είχε προστεθεί προπιονικό ή βουτυρικό οξύ παρατηρήθηκε μειωμένη παθογένεια προς τα HEp-2 κύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα (Van immerseel et al., 2003). Χρησιμοποιώντας μεθόδους συγκριτικής μεταγραφικής ανάλυσης αποδείχτηκε ότι το βουτυρικό οξύ μπορεί να

προκαλέσει μείωση στην έκφραση του παράγοντα παθογένειας « island 1» (Gantois et al., 2006).

Όσον αφορά στον συσχετισμό δράσης των οργανικών οξέων και τους παράγοντες παθογένειας των βακτηρίων εκτός από τις άμεσες επιδράσεις των οξέων, πιθανόν να σχετίζονται με τις απαιτήσεις των βακτηρίων για ενέργεια. Ειδικότερα, στα βακτήρια για την ενεργοποίηση των μηχανισμών παθογένειας σημαντικό ρόλο παίζουν μηχανισμοί επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων (quorum sensing) (Defoirdt et al.2008). Για την ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών και για την παραγωγή των «μηνυμάτων» απαιτείται ενέργεια (Keller and Surette, 2006), που ίσως δεν είναι διαθέσιμη, καθώς παρουσία οξέων τα κύτταρα προσπαθούν να εξισορροπήσουν το εσωτερικό pH τους με αποτέλεσμα την κατανάλωση ενέργειας και συνεπώς αδυναμία παραγωγής των «μηνυμάτων-σινιάλων» επικοινωνίας και ακολούθως μειωμένη εμφάνιση παθογένειας.

1.5 Πρωτεομική Ανάλυση

1.5.1 Εισαγωγή

Η πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα της δομής και λειτουργίας τους (Anderson και Anderson, 1998, Blackstock και Weir, 1999). Είναι η μελέτη των πρωτεομάτων, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών ενός βιολογικού συστήματος (οργανισμός, όργανο, ιστός, κ.ά.), των δομών τους, των αλληλεπιδράσεων, των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων και των αλλαγών στα επίπεδα τους.

Η τεχνολογία της Πρωτεομικής (Proteomics) αναπτύχθηκε κυρίως λόγω της αλματώδους προόδου τεχνολογίας οργάνων αυτοματοποιημένης ανάλυσης σε συνδυασμό με τις γνώσεις και τις τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών που προϋπήρχαν.

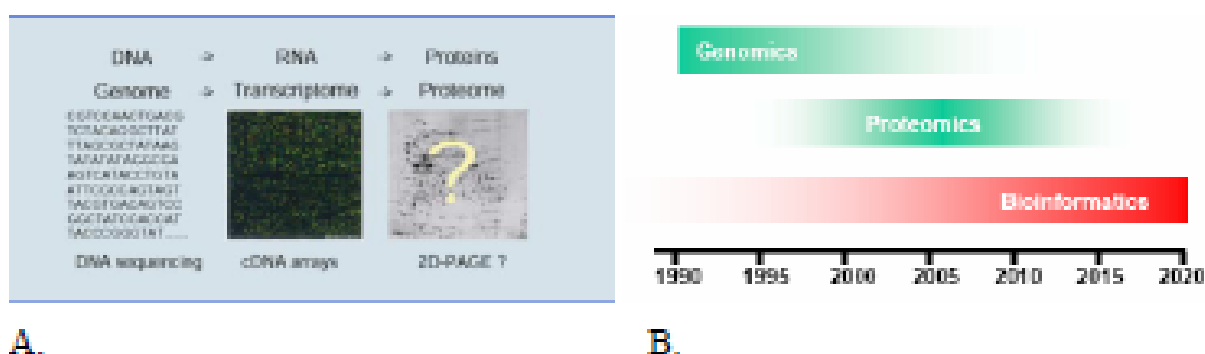
Οι πρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας συστατικά των ζωντανών οργανισμών, αφού είναι τα κύρια συστατικά των φυσιολογικών μεταβολικών μονοπατιών των κυττάρων. Ο όρος «proteomics» παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1997 (James, 1997) ως ανάλογος του όρου genomics, της μελέτης δηλαδή των γονιδίων. Η λέξη «πρωτέωμα» είναι μια μίξη των λέξεων «πρωτεΐνης» και «γονιδίωμα», και κατασκευάστηκε από τον καθηγητή Marc Wilkins το 1994. Το πρωτέωμα είναι

ολόκληρο το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών που παράγεται από έναν οργανισμό ή ένα σύστημα (Wilkins et al., 1996), συμπεριλαμβανομένων των χωροχρονικών τροποποιήσεων και μεταβολών που επισυμβαίνουν σε αυτό. Το γονιδίωμα είναι σχεδόν στατική εικόνα για τους πιθανούς τρόπους που ένα κύτταρο χρησιμοποιεί τα γονίδιά του, παρόμοιο για όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού, με μικρές διαφοροποιήσεις εντός του ίδιου είδους. Αντιθέτως, το πρωτέωμα εμφανίζει χρονική και εξαρτώμενη από εξωτερικούς παράγοντες δυναμική, ενώ διαφέρει και ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η Πρωτεομική μπορεί να αναλύσει ακριβώς αυτή τη δυναμική προσδιορίζοντας όχι μόνο γονιδιακά προϊόντα, αλλά όπως αναφέραμε παραπάνω και την πληθώρα τροποποιήσεων των προϊόντων αυτών. Ένα παράδειγμα του όγκου πληροφορίας που καλείται να αναλύσει η Πρωτεομική και ταυτόχρονα ειδοποιός διαφορά με την Γονιδιωματική είναι το εξής: Έχει βρεθεί ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα εμπεριέχει 30.000 – 40.000 γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ο θεωρητικός όμως αριθμός γονιδιακών πρωτεϊνικών προϊόντων σε κάθε δεδομένη στιγμή μπορεί να ανέλθει στο 1.000.000, ενώ σε ολόκληρη τη ζωή του ανθρώπου δύναται να φτάσει έως και 10.000.000. Επιπλέον, περίπου το 60% των ανθρώπινων γονιδίων υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα κατά τη μεταγραφή τους, πολλές πρωτεΐνες υφίστανται πρωτεόλυση δίνοντας περισσότερα του ενός λειτουργικά προϊόντα, ενώ και οι διάφορες τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, γλυκοζυλίωση, φαινυλίωση, κ. ά.) μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση του συνολικού αριθμού λειτουργικών πρωτεϊνικών μορίων.

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την πρωτεομική είναι τεράστιο λόγω του ότι παρέχει καλύτερη κατανόηση ενός οργανισμού από τη γονιδιωματική. Πρώτον, το επίπεδο μεταγραφής ενός γονιδίου δίνει μόνο μια κατά προσέγγιση εκτίμηση του επιπέδου έκφρασής του σε πρωτεΐνη. Ένα mRNA που παράγεται σε αφθονία μπορεί να αλλοιωθεί γρήγορα ή να μεταφραστεί ανεπαρκώς, με συνέπεια παραγωγή μικρών ποσοτήτων μιας πρωτεΐνης. Δεύτερον, πολλές πρωτεΐνες υφίστανται τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση που έχουν προφανείς επιπτώσεις στη λειτουργία τους. Παραδείγματος χάριν μερικές πρωτεΐνες δεν είναι ενεργές έως ότου φωσφορυλιωθούν. Τρίτον, η μεταγραφή δύναται να δώσει περισσότερες από μια πρωτεΐνες, μέσω εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) ή των εναλλακτικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Τέταρτον, πολλές πρωτεΐνες διαμορφώνουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA και λειτουργούν μόνο παρουσία αυτών

των μορίων. Τέλος, ο ρυθμός μείωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του δείγματος (Belle et al., 2006). Ένας τρόπος βάσει του οποίου μπορεί να μελετηθεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η ανάπτυξη ενός αντισώματος που είναι εξειδικευμένο για εκείνη την πρωτεΐνη.

Ένας πιο κοινός τρόπος να καθοριστεί η μετα-μεταφραστική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης είναι με την υποβολή ενός σύνθετου μίγματος πρωτεϊνών σε ηλεκτροφόρηση «δύο-διαστάσεων», κατά την οποία οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται πρώτα κατά μια διάσταση (π.χ. κατά ισοηλεκτρικό σημείο) και έπειτα κατά την άλλη (π.χ. κατά μοριακό βάρος), μέσω ενός διαδοχικού συνδυασμού ισοηλεκτρικού εστιασμού (isoelectric focusing, IEF) και ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθεικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), που επιτρέπει την απεικόνιση των μικρών διαφορών που εντοπίζονται σε μια πρωτεΐνη πραγματοποιώντας διαχωρισμό της τροποποιημένης μορφής της από τη μη τροποποιημένη. Στις μέρες μας, η τεχνική 2D ηλεκτροφόρηση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην πρωτεομική έρευνα που αφορά στην επιστήμη και τεχνολογία των τροφίμων αν και πρόσφατα, μια άλλη προσέγγιση έχει αναπτυχθεί και η οποία ονομάζεται PROTOMAP και συνδυάζει την SDS-PAGE με το λεγόμενο shotgun proteomics που χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry) (Hu et al., 2007, Fournier et al., 2007, Nesvizhskii, 2007).



Εικόνα 1.4 Α) Η αλληλούχιση γονιδιωμάτων και η μελέτη μεταγραφωμάτων τροφοδότησε την πρόοδο της Πρωτεομικής. Β) Στις μέρες μας παρατηρείται μια σημαντική κίνηση από τη Γενομική στην Πρωτεομική, η οποία και αποτελεί το επόμενο βήμα στην προσπάθεια να αποκαλύψουμε πως σχετίζονται γονίδια με βιολογικές λειτουργίες και παθογενείς καταστάσεις [10]. Το πλήθος δεδομένων και των δυο αυτών τεχνολογιών έρχεται να αναλύσει η Βιοπληροφορική

Οι κλάδοι που ασχολούνται με τη δομή των πρωτεϊνών, τη λειτουργία και την έκφραση τους ονομάζονται αντίστοιχα:

- ❖ Δομική Πρωτεομική - Υψηλής ρυθμοαπόδοσης Κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- ❖ Λειτουργική Πρωτεομική – Σύστημα διπλού Υβριδίου στη ζύμη (Yeast Two-hybrid), Ανάλυση Μοτίβων (Motif Analysis), Ανάλυση Απαλοιφής (Deletion Analysis), Τσιπ Συνδετών (Ligand Chips)
- ❖ Πρωτεομική Έκφρασης ή Αναλυτική Πρωτεομική - Ηλεκτροφόρηση, Πρωτεϊνικά τσιπ, DNA τσιπ, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry).

Στη συγκεκριμένη εργασία εφαρμόστηκαν τεχνικές και τεχνολογίες της Αναλυτικής Πρωτεομικής και συγκεκριμένα Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων και Φασματομετρία Μάζας. Ειδικότερα, ακολουθήθηκε η τυπική διαδικασία για Πρωτεομική ανάλυση : 1) Διαχωρισμός μίγματος ολικών πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων, 2) Ανάλυση εικόνας πηκτωμάτων, 3) Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα πηκτώματα και ταυτοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με Φασματομετρία μάζας, 4) Βιοπληροφορική ανάλυση μέσω έρευνας στις on line βάσεις δεδομένων.

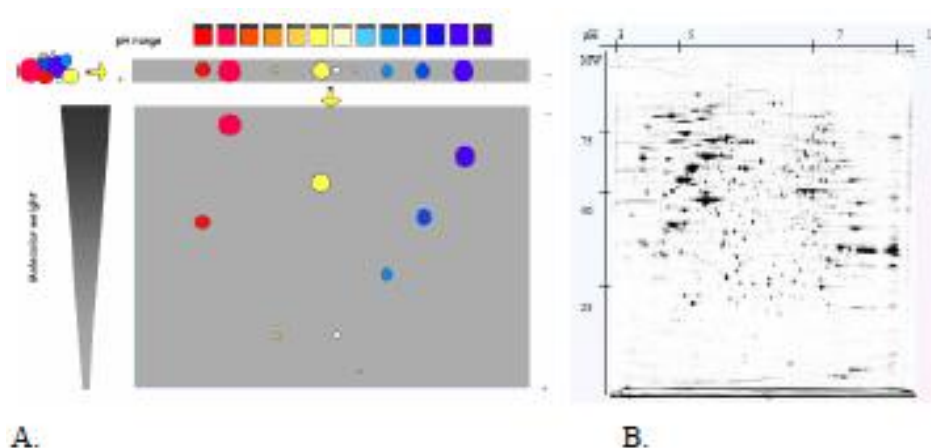
1.5.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνικού μίγματος με Ηλεκτροφόρηση

2 διαστάσεων (2D Gel Electrophoresis)

Ένα από τα πρώτα βήματα στην Πρωτεομική ανάλυση είναι ο διαχωρισμός μίγματος πρωτεϊνών . Η ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων είναι το βασικό και κλασικό πλέον εργαλείο για τη σκιαγράφηση του πρωτεϊνικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων καθώς μας δίνει την ικανότητα να αναλύουμε χιλιάδες πρωτεΐνες σε κάθε πείραμα ταυτόχρονα. Οι αρχές της τεχνικής θεμελιώθηκαν το 1975.

Στην Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το καθαρό τους φορτίο, μέσω ΙσοΗλεκτρικής Εστίασης (IIE) και ακολούθως βάσει του μοριακού τους βάρους με τυπική ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE). Στο τέλος της διαδικασίας έχουμε μια εικόνα πηκτώματος με

διάσπαρτες κηλίδες, κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύει μια πρωτεΐνη (λέμε πρωτεΐνη κι όχι γονιδιακό προϊόν καθώς πολλές κηλίδες μπορεί να αντιστοιχούν στο ίδιο γονιδιακό προϊόν, αλλά σε διαφορετικές ισομορφές ή και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις).



Εικόνα 1.13 Α) Σχηματική αναπαράσταση της Ηλεκτροφόρησης 2 διαστάσεων (H2D). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται πρώτα βάσει των ισοηλεκτρικών τους σημείων και στη συνέχεια βάσει των μοριακών τους βαρών. Β) Η εικόνα ενός πήκτωματος πολυακρυλαμιδίου με τις πρωτεϊνικές κηλίδες.

Στον ΙΗΕ εκμεταλλευόμαστε την ιδιότητα των πρωτεϊνών να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες αναλόγως του pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Γενικά, είναι θετικά φορτισμένες σε $\text{pH} < \text{pI}$, ενώ είναι αρνητικά φορτισμένες σε $\text{pH} > \text{pI}$. Οπότε υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης μετακινούνται σε μια διαβαθμισμένη κλίμακα pH και σταματούν (εστιάζουν) στο σημείο εκείνο που το φορτίο τους είναι 0, οπότε και δεν μπορούν πλέον να κινηθούν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αν για κάποιο λόγο η εκάστοτε πρωτεΐνη φύγει από το σημείο όπου έχει εστιαστεί, τότε αμέσως φορτίζεται και επανέρχεται σε αυτό.

Η διαβαθμισμένη κλίμακα pH που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν ουσιαστικά μια λεπτή επιμήκης πλαστική ταινία στη μία πλευρά της οποίας υπάρχει πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στο πήκτωμα έχουν ενσωματωθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς, όξινης και βασικής ομάδες χημικών ουσιών ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, όπου R είναι μια ασθενής όξινη ή βασική ομάδα) που ονομάζονται acrylamido buffers, οι οποίες δημιουργούν μία ακινητοποιημένη διαβάθμιση pH. Οι ταινίες που περιγράφηκαν ονομάζονται Ταινίες Ακινητοποιημένης Διαβάθμισης pH (Immobilised

pH Gradient Strips ή IPG Strips) (Εικ. 1.14) και χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην ΙΗΕ.



Εικόνα 1.14 Ταινία ακινητοποιημένης κλίσης pH (IPG strip). Οι ταινίες αυτές εμφανίζουν πλεονεκτήματα όπως αυξημένη επαναληψιμότητα και ικανότητα να εστιάζουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών.

Στο τέλος της ΙΕΗ, έχουμε πετύχει έναν πρώτο διαχωρισμό του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βάσει των ισοηλεκτρικών σημείων των συστατικών του. Ακολουθεί η δεύτερη διάσταση, όπου ο διαχωρισμός γίνεται βάσει του MB, κάθετα στην πρώτη διάσταση, καθώς οι ΤΑΚ εφαρμόζονται σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Πλέον οι πρωτεΐνες έχουν όλες το ίδιο φορτίο (αρνητικό) λόγω της προσθήκης περίσσειας φορτίων από τον ιοντικό αποδιατακτικό παράγοντα SDS.

Βασικά πλεονεκτήματα της παραπάνω τεχνικής είναι η ικανότητα ταυτόχρονου διαχωρισμού και απεικόνισης χιλιάδων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών μορφών σε ένα και μόνο πείραμα, καθώς και η αναλυτική της αξία, αφού μπορούν να υπολογιστούν το MB, το ισοηλεκτρικό σημείο και το σχετικό ποσοστό μιας πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Μειονεκτήματα αποτελούν η μειωμένη ικανότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών μικρής αφθονίας, ακραίων μοριακών βαρών (για πρωτεΐνες με MB πάνω από 200kb και κάτω από 10kb απαιτείται ρύθμιση της συγκέντρωσης της πηκτής πολυακρυλαμιδίου), ακραίων ισοηλεκτρικών σημείων (μικρότερα του 3 και μεγαλύτερα του 10) και μεγάλης υδροφοβικότητας (π.χ. διαμεμβρανικά μόρια).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Λαμβάνοντας υπόψη μας πως τα μελετώμενα στελέχη σαλμονέλας έχουν απομονωθεί από ζωοτροφές χωρών της Βόρειας Ευρώπης τα τελευταία 15 χρόνια και ότι σύμφωνα με τα προαναφερθέντα η σαλμονέλα αποτελεί κύριο παράγοντα επιμόλυνσης των ζωοτροφών, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συγκριτική αξιολόγηση της ανάπτυξης, και ειδικότερα της ανθεκτικότητας παρουσία των οργανικών οξέων γαλακτικό και φορμικό (μυρμηκικό) 10 στελεχών *Salmonella sp.*. Στόχος επίσης είναι ο προσδιορισμός των ορίων ανάπτυξης (growth/no growth limits) των στελεχών και εν συνεχεία η μελέτη του πρωτεϊνικού προφίλ συγκεκριμένων στελεχών των οποίων διέφερε το προφίλ ανάπτυξης τους. Απώτερος στόχος είναι η εξήγηση των διαφορών ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών παρουσία οργανικών οξέων βάσει του πρωτεόματος του καθενός καθώς και η εύρεση των πιθανών πρωτεϊνών που εμπλέκονται και ευθύνονται για τη διαφοροποίηση αυτή.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής και η περαιτέρω διερεύνηση των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση των όξινων μεταχειρίσεων για εξυγίανση των ζωοτροφών και τη μείωση του κινδύνου επιβίωσης της σαλμονέλας σε αυτές, καθώς επίσης και τη αποφυγή εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σαλμονέλας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναλώσιμα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών, ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια αλλά και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

2.1.1 Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια

Από πλευράς ανόργανων χημικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) (SDS, Peypin, France), το όξινο φωσφορικό κάλιο (dipotassium hydrogen phosphate) (MERCK, Darmstadt, Germany), το ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (monosodium dihydrogen phosphate) (MERCK) και το διυδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο (disodium hydrogen phosphate) (MERCK). Τα στοιχεία των υπόλοιπων οργανικών χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται όπου αυτά χρησιμοποιήθηκαν.

2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Ως θρεπτικό υλικό σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το στερεό σε μορφή σκόνης υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Biolife, 4012302, Milano, Italia) του οποίου το pH σε υδατικό διάλυμα ρυθμίζονταν είτε με καυστικό νάτριο (NaOH) είτε με υδροχλωρικό οξύ (HCl).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα:

- Tryptic Soy Agar-Yeast Extract (TSAYE) και
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD)

Το XLD Agar (Άγαρ Ξυλόξης Λυσίνης Δεσοξυχολικού άλατος) είναι ένα μετρίως εκλεκτικό και διαφορικό υλικό για την απομόνωση και διαφοροποίηση αρνητικών κατά Gram εντερικών παθογόνων (Salmonella και Shigella). Περιέχει εκχύλισμα ζυμομυκήτων ως πηγή θρεπτικών συστατικών και βιταμινών.

Χρησιμοποιεί δεσοξυχολικό νάτριο ως εκλεκτικό παράγοντα και, συνεπώς, είναι ανασταλτικό για θετικούς κατά Gram μικροοργανισμούς. Η ξυλόζη ενσωματώνεται στο υλικό γιατί ζυμώνεται από όλους σχεδόν τους εντερικούς οργανισμούς εκτός από τα είδη του γένους *Shigella* και η ιδιότητά της αυτή επιτρέπει τη διαφοροποίησή τους. Η λυσίνη περιλαμβάνεται ώστε να επιτρέπεται η διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Salmonella* από τους μη παθογόνους οργανισμούς, γιατί χωρίς τη λυσίνη, τα είδη του γένους *Salmonella* θα ζύμωναν ταχέως την ξυλόζη και δεν θα διακρίνονταν από τα μη παθογόνα είδη. Αφού εξαντλήσουν τα είδη *Salmonella* την προμήθεια ξυλόζης, στη συνέχεια χρησιμοποιούν τη λυσίνη μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, με αναστροφή σε αλκαλικό pH που μιμείται την αντίδραση του *Shigella*.

Για να ενισχυθεί η ικανότητα διαφοροποίησης της σύνθεσης, στο υλικό περιλαμβάνεται ένα σύστημα δείκτη H_2S , που αποτελείται από θειοθειικό νάτριο και κιτρικό σίδηρο(III)αμμώνιο, για την οπτικοποίηση της παραγωγής υδρόθειου, που οδηγεί στο σχηματισμό αποικιών με μαύρο κέντρο. Οι μη παθογόνοι οργανισμοί που παράγουν H_2S δεν επιτυγχάνουν αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης, συνεπώς, η όξινη αντίδραση που παράγεται από αυτά τα εμποδίζει να δημιουργήσουν το μαύρο χρώμα στις αποικίες, το οποίο προκύπτει μόνο σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH (Taylor, 1965).

2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε διάφορα σκεύη, όργανα και συσκευές που αναφέρονται και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται όπου αυτά χρησιμοποιήθηκαν.

2.3 Μικροβιακά στελέχη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά δέκα στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. υπό συγκεκριμένες συνθήκες εμποδίων και καταπόνησης. Τα εννέα στελέχη έχουν απομονωθεί από ζωοτροφές χωρών της Βόρειας Ευρώπης τα τελευταία 15 χρόνια ενώ μελετήθηκε παράλληλα και ένα στέλεχος που έχει απομονωθεί από δείγματα τροφίμων (πουλερικά) και διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων (Πίνακας 2.1). Οι

μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

Πίνακας 2.1 Τα 10 στελέχη σαλμονέλας που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, με έντονο χρώμα επισημαίνονται αυτά των οποίων μελετήθηκε και το πρωτεϊνικό προφίλ.

Εργαστηριακός αριθμός	Ορότυπος	Έτος απομόνωσης	Πρώτη ύλη	Κωδικός
167	S. Infantis	2007	αγριοκράμβη (ρέβα)	A
297	S. Putten	2007	αγριοκράμβη (ρέβα)	B
23	S. Agona	1992	αγριοκράμβη (ρέβα)	C
355	S. Putten	2007	αγριοκράμβη (ρέβα)	D
860	S. Livingstone	1993	αγριοκράμβη (ρέβα)	E
252	S. Senftenberg	1995	σόγια	F
98	S. Cubana	1991	αγριοκράμβη (ρέβα)	G
782	S. Emek	2007	Φοίνικας (πυρήνας)	H
655	S. Reading	2007	σόγια	I
15100	S. Typhimurium	Lab strain, poultry isolated		St

2.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν – σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες – παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής (Εικόνα 2.1).

2.4.1 Ανανέωση των μικροοργανισμών

Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Η ανανέωση διαρκεί 18 – 24 ώρες οπότε και οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό

θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Συγκεκριμένα, εισάγεται ποσότητα ενοφθαλμίσματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν περίπου 10 ml BHI broth και ακολουθεί σε κάθε περίπτωση επώαση στους 37°C για 18 - 24 ώρες.

Προετοιμασία εμβολίων

Έγιναν δύο ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):

- Η πρώτη περιλάμβανε λήψη κυττάρων *Salmonella* από την τράπεζα κυττάρων μικροοργανισμών του εργαστηρίου (stock) με τη χρήση κρίκου και την προσθήκη τους σε σωλήνες με 10 ml BHI και εν συνεχεία επώαση στους 37°C για 18 h
- Η δεύτερη περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μl από τους σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε σωλήνες που περιείχαν 10 ml BHI και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h
- Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 min στους 4°C
- Εκπλύσεις για απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10ml Maximum Recovery Diluent (MRD).

2.4.2 Υποστρώματα-συνθήκες

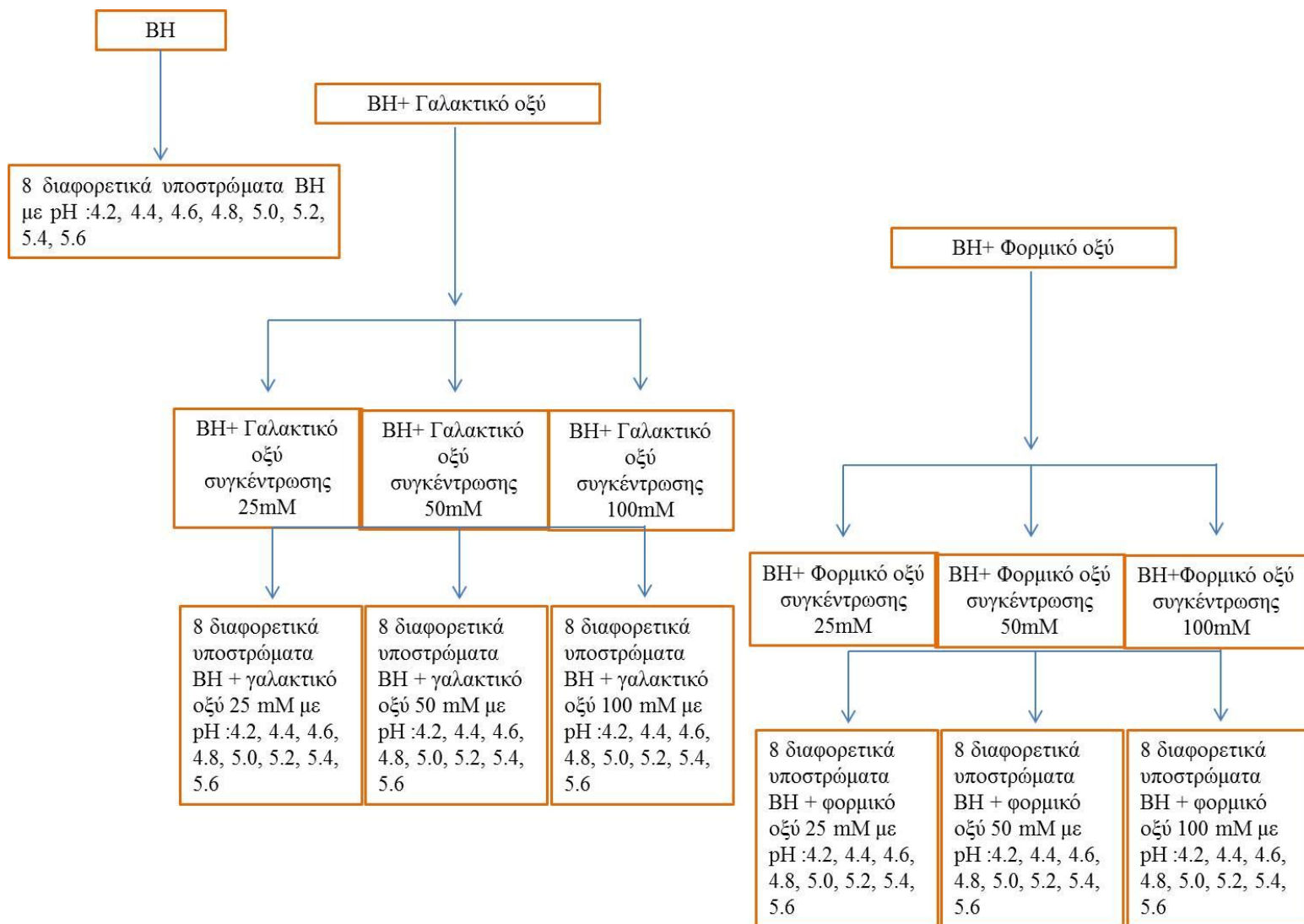
Παρασκευάστηκαν τρεις βασικές ομάδες θρεπτικών υποστρωμάτων, μία με θρεπτικό υπόστρωμα BH, μία με θρεπτικό υπόστρωμα BH και προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (SIGMA L1250), και τέλος μία με θρεπτικό υπόστρωμα BH και προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων φορμικού οξέος (MERCCK, 100264). Κάθε μία ομάδα υποστρωμάτων χωρίζονταν σε 8 επιμέρους υποστρώματα με βάση το pH (από 4,2 έως 5,6)(Πεχάμετρο pH 526 WTW).

Το σύνολο των υποστρωμάτων που παρασκευάστηκαν φαίνεται στο σχεδιάγραμμα (Εικόνα 2.1) λαμβάνοντας υπόψη ότι εφαρμόστηκε κατά τον ίδιο τρόπο και για τις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (10, 15, 20, 25 °C).

Το pH κάθε υποστρώματος ρυθμίστηκε με προσθήκη HCl ή NaOH.

2.4.3 Ενοφθαλμισμός

Αφού έχουν προετοιμασθεί τα εμβόλια και έχουν εκπλυθεί, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός των υποστρωμάτων, που είχαν εισαχθεί εκ των προτέρων στις οπές του microplate (ποσότητα 250 μl υποστρώματος σε κάθε οπή), με ποσότητα 2-6 μl από το εμβόλιο. Τα microplates με τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα τίθενται προς επώαση στις εκάστοτε θερμοκρασίες (10,15,20,25 °C) και από τη στιγμή του ενοφθαλμισμού τους παρακολουθείται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (Optical Density - OD) στα 620 nm (φωτόμετρο 6100 Spectrophotometer Sunrise Remote Jeniway Tecan), με κύριο στόχο τον καθορισμό αυτών των συνθηκών-υποστρωμάτων που επιτρέπουν την ανάπτυξη (growth) και αυτών που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη (no growth).



Εικόνα 2.1 Διάγραμμα πειραματικού σχεδιασμού των υποστρωμάτων

2.5 Πρωτεομική ανάλυση

2.5.1 Παραλαβή βιομάζας

Ποσότητα ενοφθαλμίσματος ίση με 100 ml λαμβάνεται από την τελευταία ανανέωση των μικροοργανισμών και μεταφέρεται σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες, 1 για το κάθε στέλεχος, έκαστος εκ των οποίων περιέχει 10 ml BHI broth. Με την παρέλευση 18 – 24 ωρών επώασης στους 37°C, μεταφέρονται 100 ml από τον κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα σε 10 νέους για το κάθε στέλεχος, έχοντας πλέον σαράντα δοκιμαστικούς σωλήνες, δέκα για το κάθε ένα από τα τέσσερα στελέχη. Στη συνέχεια τα εμβόλια υφίστανται διαδικασία έκπλυσης, ώστε να απομακρυνθούν τα τελικά προϊόντα μεταβολισμού που τυχόν βρίσκονται δεσμευμένα επί των κυττάρων του μικροοργανισμού. Η έκπλυση πραγματοποιείται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος MRD. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

Μετά την έκπλυση, το σύνολο της βιομάζας για κάθε διαφορετική περίπτωση συλλέγεται και μεταφέρεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων (sample buffer), περιεκτικότητας 20 mmol/l σε Tris-HCl με pH 8.8.

Πίνακας 2.2: Σύσταση 20 mmol/l φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS) με pH 7.3

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο	0.1928 % (w/v)
Επταϋδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο	0.1616 % (w/v)
Χλωριούχο νάτριο	0.8% (w/v)

2.5.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων

Στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, εκτός των επιθυμητών πρωτεϊνών περιέχονται και πολλά άλλα βιολογικά μακρομόρια (π.χ. νουκλεϊκά οξέα). Σε κάθε περίπτωση τα συστατικά αυτά

απελευθερώνονται στο διάλυμα, μέσω της λύσης των κυττάρων η οποία προκαλείται εξαιτίας της αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος. Η λήψη των ενδοκυτταρικών προϊόντων από το εσωτερικό των μικροοργανισμών στην παρούσα μελέτη έγινε με μηχανικές μεθόδους (υπέρηχοι (50 W x 5 min)), (συσκευή υπερήχων: UP50H Hielscher), όπου το περίβλημα του κυττάρου αποδιοργανώνεται χωρίς την παρουσία πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν στη συνέχεια το αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας.

Οι υπέρηχοι αποτελούν μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μηχανική μέθοδο λύσης κυττάρων. Πρόκειται για ήχους υψηλής συχνότητας παραγόμενους ηλεκτρονικά, οι οποίοι μεταφέρονται μέσω ενός μεταλλικού ρύγχους σε κυτταρικό εναιώρημα κατάλληλης συγκέντρωσης. Η φιλοσοφία της λύσης με υπερήχους στηρίζεται στη δημιουργία κοιλοτήτων στο κυτταρικό εναιώρημα (Tzannis, 1991). Εντούτοις, εφιστάται η προσοχή κατά την εφαρμογή της μεθόδου, καθότι παρατηρείται ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, ικανών να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μετουσιώσεις στις πρωτεΐνες. Γι' αυτό και όλη η διαδικασία διεξάγεται υπό ψύξη σε λουτρό υπερήχων, με ενδιάμεσες διακοπές ενός λεπτού.

2.5.3 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών



Εικόνα 2.2 Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε κατά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε με τη βοήθεια του φωτόμετρου (NanoPhotometer™ Implen) είναι μια φασματοσκοπική αναλυτική διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, με την οποία μετράται η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάποιο διάλυμα.

Πρόκειται για μια αντικειμενική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών, αφού υπάρχει άμεση εξάρτηση μεταξύ της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης και της σύστασής της σε πεπτίδια. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητος προκειμένου η ποσότητα της πρωτεΐνης που θα λάβουμε και θα υποστεί εν συνεχεία ηλεκτροφόρηση να είναι ίδια σε κάθε περίπτωση για τα δείγματά μας.

Όπως συμβαίνει με όλες τις φασματοσκοπικές μεθόδους, είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η χρήση ενός προτύπου (BSA, APPLICHEM A 1391,0025, Darmstadt, Germany). Η πρότυπη καμπύλη είναι γραμμική για ένα εύρος τιμών, το οποίο εκτείνεται από 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ μέχρι 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (μg BSA/ μl Tris-HCl).

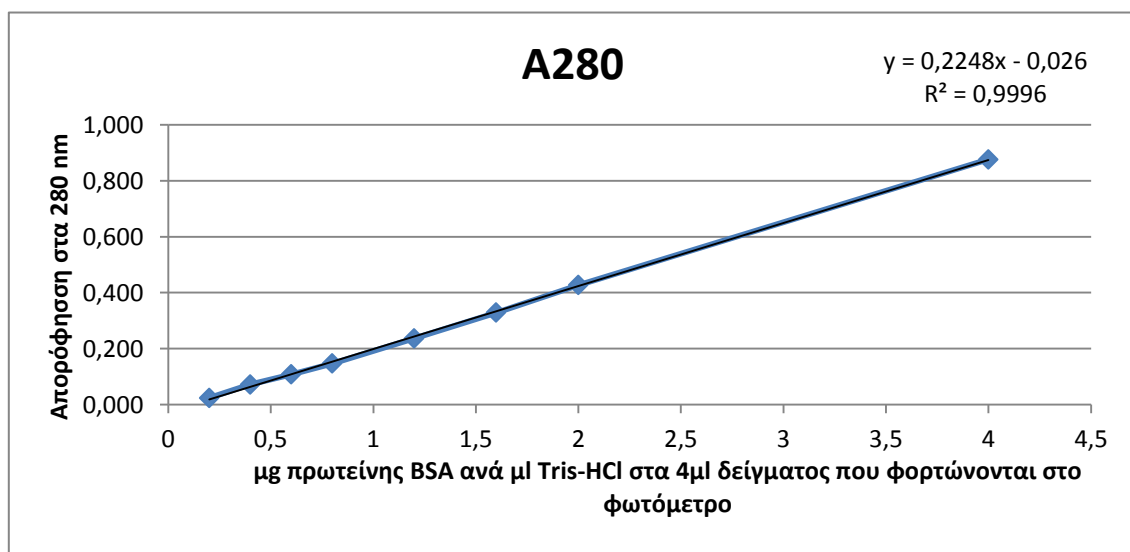
Η μέθοδος λαμβάνει χώρα μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και αφού πρώτα τα εναιωρήματα των δειγμάτων εντός των ρυθμιστικών διαλυμάτων (Tris-HCl) φυγοκεντρηθούν (12000 rpm x 20 min, 4°C), ούτως ώστε να διαχωριστούν κυτταρικά υπολείμματα και τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος από το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από το εσωτερικό του κυττάρου. Η ποσοτικοποίηση γίνεται τόσο για την BSA (πρότυπη καμπύλη) όσο και για τα δείγματα σε διάλυμα Tris-HCl. Σύμφωνα με τον πίνακα οδηγιών του οργάνου για κάθε μέτρηση φορτώθηκαν 4 μl από το διάλυμα.

Lid	Sample volume	Pathlength	Dilution
100 (optional)	0.7 - 4 μl	0.1 mm	1:100
50	0.7 - 4 μl	0.2 mm	1:50
10	3 - 5 μl	1 mm	1:10
5 (optional)	6 - 10 μl	2 mm	1:5

Πίνακας 2.3 Ενδεικνύμενος όγκος πρωτεϊνικού δείγματος που 'φορτώνεται' στο φωτόμετρο.



Εικόνα 2.3 Φόρτωση 4 μl πρωτεϊνικού δείγματος στο φωτόμετρο



Εικόνα 2.4 Γράφημα της πρότυπης καμπύλης (BSA).

Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων στις αραιώσεις 1:10 και 1:100 και το “καθαρό”-αναραιώτο δείγμα και υπολογίστηκε η απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης που απαιτείται, κυρίως σύμφωνα με την αραιώση 1:10 και με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης (Εικόνα 2.4).

Πίνακας 2.4 Αποτελέσματα φωτόμετρου για τα δείγματα που μελετήθηκαν

Δείγμα (στέλεχος σαλμονέλας)	Αραίωση	Απορρόφηση στα 280nm	Τιμή σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη (μg στα 4 μl)	Τιμή σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη δια του 4 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Τιμή του δείγματός (x 10 λόγω της αραίωσης)	Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα (μg)
252	1:10	0,062	0,391459	0,097865	0,978648	685,0534
297		0,07	0,427046	0,106762	1,067616	747,331
655		0,056	0,364769	0,091192	0,911922	638,3452
15100		0,061	0,387011	0,096753	0,967527	677,2687
252	Χωρίς αραίωση	0,684	3,158363	0,789591	0,789591	552,7135
297		0,712	3,282918	0,82073	0,82073	574,5107
655		0,684	3,158363	0,789591	0,789591	552,7135
15100		0,684	3,158363	0,789591	0,789591	552,7135

2.5.4 Κατακρήμιση με τριγλωροξικό οξύ (TCA)

Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, ακολουθεί ο διαχωρισμός μεταξύ των πρωτεϊνών και των κυτταρικών συστατικών που αιωρούνται στο υπερκείμενο. Η κατακρήμιση τους πραγματοποιείται με χρήση τριγλωροξικού οξέος (APPLICHEM A 1431,0250). Το τριγλωροξικό οξύ (TCA) είναι ένα ανάλογο του οξικού οξέος, στο οποίο τα τρία υδρογόνα της μεθυλομάδας έχουν αντικατασταθεί από ισάριθμα άτομα χλωρίου. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων (πρωτεϊνών, DNA και RNA). Το TCA ελαττώνει τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς και προκαλεί αφυδάτωση, οπότε οι πρωτεΐνες γίνονται αδιάλυτες και καθιζάνουν. Επειδή οι οργανικοί διαλύτες μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, η κατακρήμιση διεξάγεται σε θερμοκρασίες γύρω στους 0°C, οπότε και χρειάζεται μικρότερο ποσό του διαλύτη εξαιτίας της ελάττωσης της διαλυτότητας των πρωτεϊνών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι χρησιμοποιείται διάλυμα τριγλωροξικού

οξέος με τελική περιεκτικότητα 10% (w/v). Η κατακρήμνιση γίνεται με λήψη του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης και τοποθέτησή του στο προαναφερθέν διάλυμα TCA για 1 ώρα.

2.5.5 Ανάκτηση πρωτεΐνης

Το ίζημα που προκύπτει από την επίδραση τριχλωροξικού οξέος επί του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης δεν αποτελείται αποκλειστικά από πρωτεΐνες, αλλά περιλαμβάνει και κάποια δεσμευμένα μόρια TCA και άλλα κατακρημνισθέντα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA και RNA. Έτσι προκειμένου το ίζημα να απαλλαγεί από την παρουσία των νουκλεϊκών οξέων και του TCA, προστίθεται σε αυτό ακετόνη (LAB-SCAN, PLA01 X, Gliwice, Poland). Ακολουθώντας, το ίζημα αφήνεται για περίπου 18 ώρες στους -20°C ώστε η ακετόνη να εκχυλίσει πλήρως τα προαναφερθέντα ανεπιθύμητα συστατικά. Μετά το πέρας των 18 ωρών και την απαραίτητη φυγοκέντρωση (13000 rpm x 15 min, 4°C), το ίζημα εκπλένεται εις διπλούν με ακετόνη και η παραμονή στο διαλύτη να διαρκεί 30 λεπτά έκαστη φορά. Τελικά, μετά από τις διαδοχικές εκπλύσεις με ακετόνη και τις αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις, λαμβάνεται η καθαρή πρωτεΐνη υπό μορφή ιζήματος.

2.5.6 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων

Μετά την παραλαβή του πρωτεϊνικού ιζήματος απαλλαγμένου από κάθε είδους πρόσμιξη, ακολουθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων που περιγράφεται παρακάτω.

2.5.7 Προετοιμασία του δείγματος

Σε πρώτο στάδιο είναι αναγκαία η επαναιώρηση της ληφθείσας ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης. Η επαναιώρηση πραγματοποιείται με διάλυση της πρωτεϊνικής ποσότητας σε ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (rehydration buffer), το οποίο προστίθεται στο πρωτεϊνικό ίζημα. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης φαίνεται στον Πίνακα 2.5. Κατόπιν, η διαλυθείσα πρωτεϊνική ποσότητα

κατανέμεται και εξαπλώνεται σε ειδικό δίσκο ενυδάτωσης/εξισορρόπησης (rehydration/equilibration tray), εντός των διαλύσεων της οποίας τοποθετούνται έτοιμες βαθμιδώσεις pH 4 – 7 υπό μορφή λωρίδας (ready IPG strips) μήκους 17 cm (L 1632015 BIO-RAD).

Ακολούθως, η βαθμιδωτή λωρίδα pH επικαλύπτεται με ορυκτό έλαιο (mineral oil, BIO-RAD 163-2129) για την παρεμπόδιση εξάτμισης κατά τη διαδικασία ενυδάτωσης. Τέλος, το σύστημα αφού πρώτα καλυφθεί με παρεχόμενο πλαστικό κάλυμμα το οποίο εφαρμόζει κατάλληλα στο δίσκο, αφήνεται στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 11 – 16 ώρες, έτσι ώστε η περιεχόμενη πρωτεΐνη να διαχυθεί και να ενσωματωθεί στη βαθμιδωτή λωρίδα.

Πίνακας 2.5: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης πρωτεϊνών

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ουρία (APPLICHEM A 1049,1000)	7 M
Θειουρία (APPLICHEM A 2535,1000)	2 M
CHAPS	2% (w/v)
Διθειοθρεϊτόλη (DTT) (APPLICHEM A 1666,0025)	65 mM
Αμφολύτες Bio-Lyte 3/10 (BIO-RAD 163-2094)	0.5% (v/v)
Μπλε βρωμοφαινόλης (APPLICHEM A 2331,0005)	Ίχνος

Στο σημείο αυτό οφείλουμε να διευκρινίσουμε, ότι για τον ευκρινή εν τέλει διαχωρισμό των πρωτεϊνικών στιγμάτων και την επιτυχία της μεθόδου, η ενδεικνυόμενη διαλυθείσα πρωτεϊνική ποσότητα για το δεδομένο μήκος του strip (17cm) είναι 504 μ g σε όγκο διαλύματος 600 μ l.

2.5.8 Ισοηλεκτρικός εστιασμός

Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF) είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος. Κατ' αυτήν τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Έτσι, ταυτόχρονα με το διαχωρισμό

επιτυγχάνεται και ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Με τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες κινούνται σε ένα υπόστρωμα με βαθμίδωση pH (strip) στο οποίο έχει εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού (V), μέχρι να συναντήσουν το pH στο οποίο τα θετικά τους φορτία εξισώνονται με τα αρνητικά (pI), οπότε η κίνησή τους σταματά, ακινητοποιούνται και εστιάζονται σε στενές ζώνες. Αφού λοιπόν παρέλθει το προβλεπόμενο χρονικό διάστημα (11-16 ώρες) και η πρωτεϊνική ποσότητα έχει ενσωματωθεί πλήρως στη βαθμιδωτή λωρίδα του pH, λαμβάνει χώρα ο ισοηλεκτρικός εστιασμός των πρωτεϊνών. Ο τελευταίος διεξάγεται στους 20°C, με τη βοήθεια συσκευής ισοηλεκτρικού εστιασμού Protean IEF Cell (Bio-Rad), η οποία και προγραμματίζεται σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο τριών σταδίων (Πίνακας 2.6). Σε κάθε περίπτωση το μέγιστο του διερχόμενου ρεύματος είναι 50 μ A/strip.

Πίνακας 2.6: Πρόγραμμα ισοηλεκτρικού εστιασμού πρωτεϊνών, για IPG strip μήκους 17 cm με pH 4-7

ΒΗΜΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ (V)	ΧΡΟΝΟΣ	VOLT-HOURS	ΡΥΘΜΟΣ
1ο	250	20 min	-	Γραμμικός
2ο	8,000	2.5 h	-	Γραμμικός
3ο	8,000	-	20,000	Ταχύς
Σύνολο		5.3 h	~30,000	

2.5.9 Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση

Μετά την ολοκλήρωση του ισοηλεκτρικού εστιασμού (1η διάσταση 2D-GE) και προτού προχωρήσουμε στο δεύτερο βήμα που δεν είναι άλλο από το διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά μοριακό βάρος (2η διάσταση 2D-GE), είναι απαραίτητο να έχει γίνει μια προεργασία. Κατ' αρχήν θα πρέπει να έχουν ετοιμαστεί εκ των προτέρων οι πηκτές (gels) πολυακρυλαμιδίου (SERVA 10675, Heidelberg, Germany) που θα χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Οι πηκτές αυτές έχουν περιεκτικότητα 12,5%T. Επίσης, θα πρέπει να έχει προετοιμαστεί, ανάλογα με τις ανάγκες, επαρκής ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (electrode or running buffer), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων με pH 8.3

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Τριυδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (Tris-base) (SERVA 37180)	15 g/l
Γλυκίνη (SERVA 23390)	72 g/l
SDS (SIGMA L4390, St. Louis, USA)	5 g/l

Κάτι το οποίο πρέπει να τονιστεί σ' αυτό το σημείο είναι η αναγκαιότητα της διαδοχικής τοποθέτησης των βαθμιδωτών λωρίδων pH σε 4 ml δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων εξισορρόπησης (equilibration buffers I & II), με τα οποία και επιτυγχάνονται οι απαραίτητες συνθήκες για μετάβαση στην SDS-PAGE. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I (equilibration buffer I) δίνεται στον Πίνακα 2.8.

Πίνακα 2.8: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Ουρία	6 M
SDS	2% (w/v)
Tris-HCl με pH 8.8.	0,375 M
Γλυκερόλη	20% (w/v)
Διθειοθρεϊτόλη*	130 mM

*Το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης II (equilibration buffer II) έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το πρώτο, μόνον που σε αυτό δεν προστίθεται διθειοθρεϊτόλη.

Τα προαναφερθέντα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται περίπου 15 λεπτά πριν από τη χρήση τους, ενώ κατά την παραμονή των βαθμιδωτών λωρίδων pH στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης I και την ήπια ανακίνηση που ακολουθεί για 10 λεπτά, στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα γίνεται προσθήκη 0,5 g ιωδοακεταμιδίου (Applichem A 1666,0025) στο δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, με παράλληλη ανάδευση για την πλήρη διαλυτοποίησή του. Με το πέρας της

διαλυτοποίησης ακολουθεί η τοποθέτηση των λωρίδων και σ' αυτό το διάλυμα εξισορρόπησης με παράλληλη και πάλι ανακίνηση.

2.5.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Μοριακό Βάρος

Η μέθοδος SDS-PAGE χρησιμοποιείται στα πλαίσια της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων, με την οποία και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους, καθώς περνούν διά μέσου των πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται υπό την επίδραση δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) και διθειοθρεϊτόλης (DTT). Η μέθοδος διαχωρίζει και επιτρέπει την εκτίμηση του μοριακού βάρους των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών σε πολύ καλό βαθμό, εάν παράλληλα μαζί με τα εξεταζόμενα δείγματα, υποστεί ηλεκτροφόρηση και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους το οποίο ονομάζεται και δείκτης μοριακών βαρών (Πίνακας 2.9).

Πίνακας 2.9: Σύσταση δείκτη μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIO-RAD 161-0318).

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (kDa)
Μυοσίνη	Σκελετικός μυς κουνελιού	207.345
β-γαλακτοζιδαση	<i>E.coli</i>	114.363
Βόεια αλβουμίνη ορού	Πλάσμα αίματος βοός	78.444
Οβαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού	53.086
Ανθρακική ανυδράση	Ερυθροκύτταρα βοός	35.719
Παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας	Σόγια	28.329
Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού	19.325
Απροτινίνη	Πάγκρεας βοός	6.973

Μετά την απομάκρυνσή τους από τα ρυθμιστικά διαλύματα εξισορρόπησης, οι πρωτεΐνες των βαθμιδωτών λωρίδων pH είναι έτοιμες να περάσουν στη δεύτερη διάσταση της 2D-GE και να διαχωριστούν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι οι ακινητοποιημένες βαθμιδώσεις του pH, με πολύ προσεκτικούς χειρισμούς, αφού πρώτα εμβαπτιστούν σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων, ενσωματώνονται στο άνω μέρος των πηκτών, χρησιμοποιώντας αγαρόζη (BIO-RAD, 161-3112, Milan, Italy) για την επικάλυψη και στεγανοποίησή τους. Στη συνέχεια ακολουθεί η συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης και η πλήρωση των δεξαμενών αυτής με ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων. Το τμήμα ψύξης της συσκευής ηλεκτροφόρησης συνδέεται με παροχή νερού και τα ηλεκτρόδια με συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος. Κατόπιν, ξεκινά η ηλεκτροφόρηση, με ρύθμιση του ρεύματος στα 8 mA ανά πηκτή και σταθερή παροχή νερού. Με τη συμπλήρωση μιας ώρας από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η οποία χρονικά περίπου συμπίπτει με τη μετάβαση του ορατού μετώπου της ηλεκτροφόρησης από το τμήμα της πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) στο τμήμα της διαχωριστικής πηκτής (separating gel) η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 20 mA και διατηρείται μέχρι το τέλος της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας (περίπου 4-5 ώρες επιπλέον από την έναρξη, δηλ. σύνολο περίπου 5-6 ώρες). Η παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της μετατόπισης του μετώπου του μπλε της βρωμοφαινόλης (APPLICHEM A2331,0005), που είναι παρούσα στο προαναφερθέν διάλυμα αγαρόζης.

2.5.11 Εμφάνιση πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το οποίο καθορίζεται από τη μετακίνηση του μετώπου των πρωτεϊνών που ρέουν δια μέσου των πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στο τμήμα διαχωρισμού της πηκτής, η παροχή του ρεύματος διακόπτεται και η συσκευή αποσυναρμολογείται. Η ενιαία πηκτή αποκολλάται προσεκτικά από τις πλάκες ηλεκτροφόρησης και το τμήμα πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) αποκόπτεται και απορρίπτεται. Η εναπομείνασα διαχωριστική πηκτή (separating gel) υφίσταται ειδική επεξεργασία για την εμφάνιση των διαχωρισθέντων, υπό μορφή στιγμάτων, πρωτεϊνών.

2.5.12 Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρησιμοποίηση της χρωστικής Coomassie G250 (BIO-RAD 161-0786). Η συγκεκριμένη χρωστική ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των χρωστικών Coomassie (γνωστές και ως χρωστικές Coomassie Brilliant), που γενικά χρησιμοποιούνται στη χρώση διαχωρισθέντων ηλεκτροφορητικά πρωτεϊνών. Από το σύνολο των χρωστικών της οικογένειας (R250, G250, R150) η πιο ευαίσθητη είναι η G250, παρουσιάζοντας παράλληλα 10 φορές χαμηλότερο όριο ανιχνευσιμότητας σε σχέση με την κοινά χρησιμοποιούμενη R250.

Τα πηκτώματα μετά την ηλεκτροφόρηση εμβαπτίζονται σε fixation διάλυμα (50% μεθανόλη, 3% φωσφορικό οξύ) για μια ώρα, στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με απιονισμένο νερό (15 λεπτά η κάθε μια) και εμβάπτιση στο διάλυμα της κολλοειδούς χρωστικής.

Πίνακας 2.10: Σύσταση χρωστικής πηκτών πολυακρυλαμιδίου

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Μεθανόλη	34% (v/v)
Φωσφορικό οξύ	3% (w/v)
Θειικό αμμώνιο	15% (w/v)
G250	0,1% (v/v)

2.5.13 Αποχρωματισμός των πηκτών

Με την παραπάνω διαδικασία η χρωστική διαχέεται εντός της πηκτής, όμως συνδέεται μόνιμα μόνον με τις πρωτεΐνες. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών στιγμάτων και η μετέπειτα σάρωση (συσκευή σάρωσης-μέτρησης οπτικής πυκνότητας πηκτών ηλεκτροφόρησης GS-800 BIO-RAD) και ταυτόχρονη επεξεργασία των πρωτεωμάτων δεν είναι δυνατή αν δεν επέλθει ο αποχρωματισμός της πηκτής, ο οποίος και συνίσταται στην απομάκρυνση της χρωστικής από τις περιοχές εκείνες όπου δεν παρατηρείται σύνδεση με τις πρωτεΐνες. Προκειμένου λοιπόν οι πηκτές να αποχρωματιστούν, εκπλένονται με απιονισμένο νερό, υπό ήπια ανακίνηση, σε τακτά

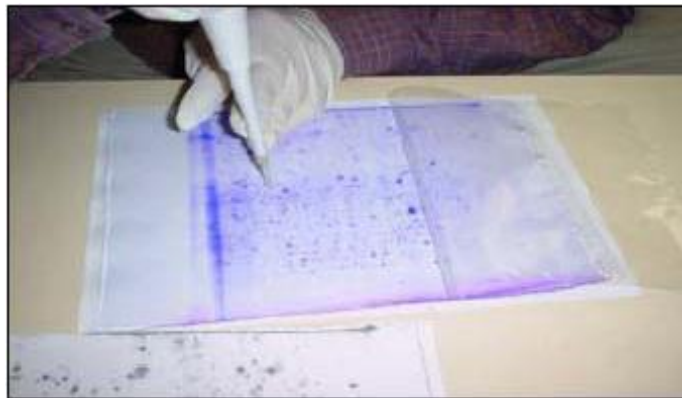
χρονικά διαστήματα με στόχο την απομάκρυνση της εναπομείνουσας χρωστικής. Στο τέλος οι πηκτές συντηρούνται στους 4 °C.

2.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

2.6.1 Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα 2Δ πηκτώματα

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.

Η διαδικασία αυτή έγινε με το χέρι. Έχει προσαρτηθεί στο άκρο μιας σύριγγας ένα ρύγχος πιπέτας, Το ρύγχος κόβεται στην άκρη, ώστε το άνοιγμά του να είναι περίπου 1,5mm. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η εξαγωγή των κηλίδων (Εικ. 2.5) χρησιμοποιώντας τη μεταποιημένη σύριγγα και τοποθετώντας κάθε κομμάτι πλέον πηκτώματος, που έχει εξαχθεί, σε συγκεκριμένη θέση στο plate, μαζί με μια μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού.

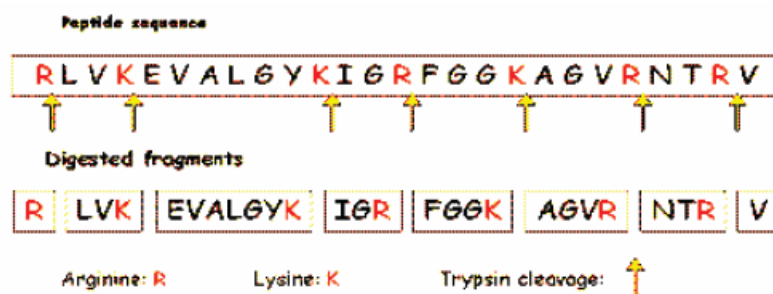


Εικόνα 2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από την πηκτή με το χέρι

2.6.2 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων μέσω πεπτιδικών χαρτών (peptide maps) και φασματομετρία μάζας (ΦΜ) (Mass Spectrometry)

Η τεχνική της Ηλεκτροφόρησης δύο Διαστάσεων (H2Δ) προσφέρει μεγάλη αναλυτική ικανότητα, έτσι ώστε στα 2Δ πηκτώματα να υπάρχει αντιστοίχιση κηλίδας – πρωτεϊνικού μορίου. Η αναγνώριση του μορίου αυτού μπορεί να επιτευχθεί με τον εξής τρόπο : πέπτοντάς το με ένα πρωτεολυτικό ένζυμο και τα προκύπτοντα πεπτίδια

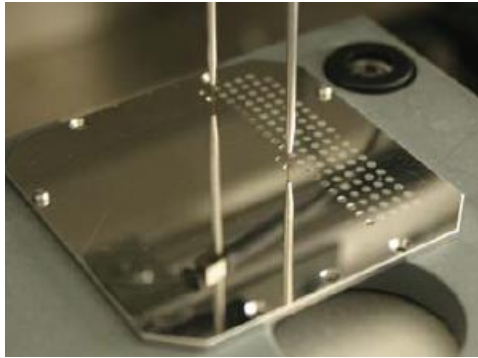
(πεπτιδικός χάρτης) να ταυτοποιηθούν με ΦΜ. Οι πειραματικοί πεπτιδικοί χάρτες (ανάλογοι των χαρτών περιορισμού όταν πέπτουμε ένα τμήμα DNA με περιοριστικά ένζυμα) συγκρίνονται με αντίστοιχους θεωρητικούς σε ειδικές βάσεις δεδομένων. Οι πρωτεΐνες (μέσα στις κηλίδες πηκτωμάτων που έχουν ήδη εξαχθεί) πέπτονται (in gel digestion) με τρυψίνη. Η επιλογή της τρυψίνης έγινε διότι ακετυλιωμένη της μορφή είναι εμπορικά διαθέσιμη (αποφυγή πέψης της πρωτεάσης από την ίδια της την ενεργότητα) και διότι κόβει στο καρβοξυτελικό άκρο αργινίνης (R) ή λυσίνης (K). Η λυσίνη και η αργινίνη είναι αρκετά κοινά αμινοξέα και αποτελούν το 5% και 6% αντίστοιχα του συνολικού αριθμού αμινοξέων στις πρωτεΐνες ανωτέρων ζώων. Η συχνότητα αυτή σημαίνει ότι θεωρητικά θα έχουμε 11 σημεία πέψης για κάθε 100 αμινοξέα σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία και τα πεπτίδια θα έχουν μήκος 9 αμινοξέα. Αυτό διευκολύνει ιδιαίτερα τη ΦΜ, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια ταυτοποίησης.



Εικόνα 2.6 Πέψη μιας τυχαίας πρωτεϊνικής αλληλουχίας με τρυψίνη. Φαίνονται τα σημεία πέψης καθώς και τα προκύπτοντα πεπτίδια.

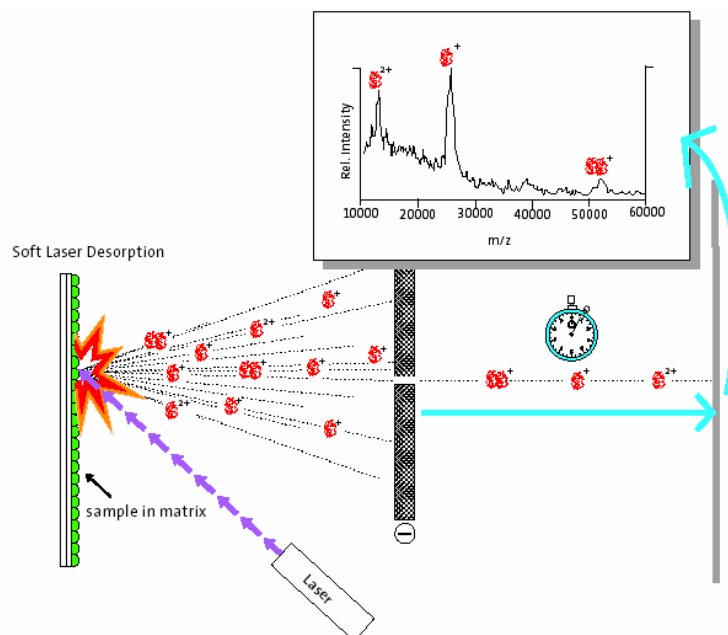
Μετά την πέψη, τα πεπτίδια ταυτοποιούνται με ΦΜ καθώς οι παρατηρούμενες πεπτιδικές μάζες συσχετίζονται με πεπτιδικά αποτυπώματα, η διαδικασία είναι γνωστή και ως Peptide Mass Fingerprinting (PMF).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στην Πρωτεομική Ανάλυση είναι ένας συγκεκριμένος τύπος φασματομετρίας μάζας με τίτλο : Φασματομετρία Μάζας Χρόνου Πτήσης με Εκρόφηση/Ιονισμό από Λείζερ, Υποβοηθούμενη από Μήτρα (Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionisation Time – Of – Flight Mass Spectrometry ή εν συντομία MALDI – TOF MS). Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη, απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος και μπορεί άνετα να χρησιμοποιηθεί για πειράματα υψηλής ρυθμοαπόδοσης.



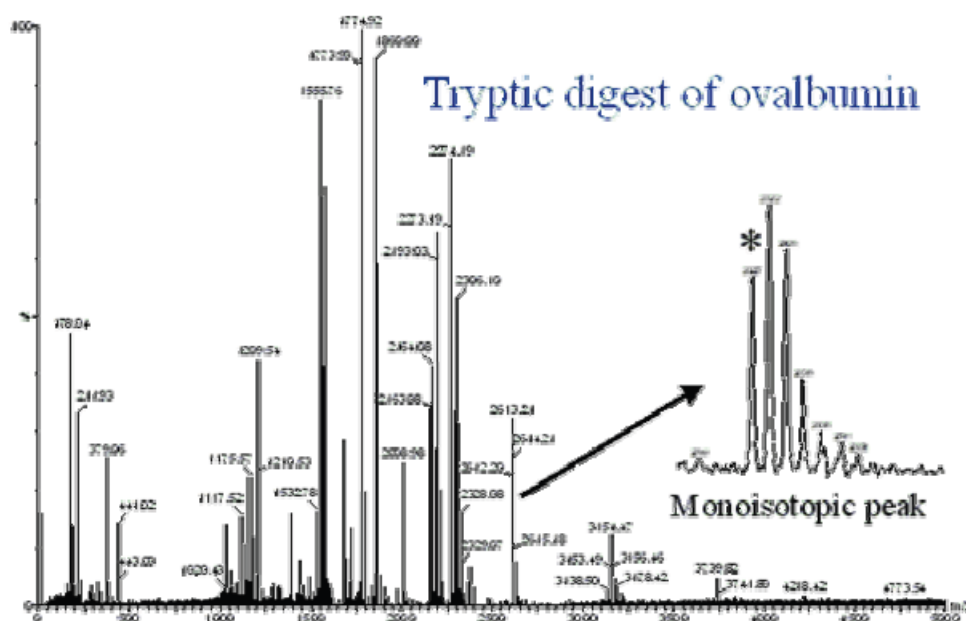
Εικόνα 2.7 Τοποθέτηση δειγμάτων (Μήτρα και μίγμα πέψης) σε ειδική πλάκα πριν την εισαγωγή στον φασματογράφο.

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, τα πεπτίδια που έχουν προκύψει από την πέψη πρωτεϊνικού μορίου διαλυτοποιούνται σε ένα διάλυμα ουσίας που απορροφά ενέργεια στο μήκος κύματος που παράγει πηγή λέιζερ (Μήτρα) και τοποθετείται πάνω σε πλάκα (Εικ. 2.7), για να εισαχθεί στο Φασματογράφο μάζας. Καθώς το μίγμα ξηραίνεται πάνω στην πλάκα, η μήτρα σχηματίζει κρυστάλλους και τα πεπτίδια ενσωματώνονται σε αυτούς. Κατόπιν, παλμοί (διάρκειας λίγων νανοδευτερολέπτων) από υπεριώδες λέιζερ βομβαρδίζουν την πλάκα, με αποτέλεσμα να εξατμίζονται (Εκρόφηση) από αυτή μικρές ποσότητες από τη Μήτρα και τα περιεχόμενα πεπτίδια μεταφέρονται στην αέρια φάση. Ο ιονισμός λαμβάνει χώρα με πρωτονίωση (ένα πρωτόνιο σε κάθε πεπτίδιο) στο όξινο περιβάλλον της Μήτρας, η οποία βοηθά επίσης στο να απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας από το λέιζερ, ώστε να αποφεύγεται ο ανεπιθύμητος κατακερματισμός των βιομορίων.



Εικόνα 2.8 Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής - μεθόδου MALDI –TOF MS

Τα προκύπτοντα πεπτίδια - ιόντα έχουν πλέον καθένα μια χαρακτηριστική τιμή μάζας/φορτίου (mass/charge ratio ή m/z). Στη συνέχεια επιταχύνουν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (περίπου 20KV) και οδηγούνται στον ανιχνευτή. Ο χρόνος (Χρόνος Πτήσης), από το σημείο επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου μέχρι τον ανιχνευτή είναι χαρακτηριστικός κάθε πεπτιδίου εφόσον έχει χαρακτηριστικό λόγο m/z (τα πεπτίδια με μεγάλο m/z θα φτάσουν αργότερα από αυτά με μικρό). Με τον τρόπο αυτό διαφορετικά πεπτίδια φτάνουν σε διαφορετικούς χρόνους στον ανιχνευτή κι έτσι προκύπτει το φάσμα, που είναι και το αποτύπωμα της πέψης.



Εικόνα 2.9 Πεπτιδικό αποτύπωμα (χάρτης) της οβαλβουμίνης μετά από πέψη με τρυψίνη. Στον άξονα x έχουμε τις τιμές m/z και στον άξονα y τις τιμές της σχετικής αφθονίας. Κάθε πεπτίδιο αντιπροσωπεύεται από μία κάθετη στον άξονα x γραμμή κι από έναν αριθμό. Ο αριθμός αυτός είναι η παρατηρούμενη μάζα (Calculated mass) και ταυτοποιεί κάθε πεπτίδιο.

Αν μια πρωτεΐνη μελετάται και αναφέρεται για πρώτη φορά, τότε τα πειράματα αλληλούχισης και ταυτοποίησής της εγκαθιδρύουν τη μοναδικότητά της, βρίσκοντας μια μοναδική αμινοξική αλληλουχία (de novo ταυτοποίηση). Αν άλλοι επιστήμονες έχουν μελετήσει μια δεδομένη πρωτεΐνη προηγουμένως, τότε τα αντίστοιχα πειράματα συνδέουν την πρωτεΐνη που μελετάται, μέσω ταιριάσματος ολόκληρων αμινοξικών αλληλουχιών πεπτιδίων. Με την παραπάνω μέθοδο δεν ταυτοποιείται μια πρωτεΐνη κάνοντας de novo ταυτοποίηση. Άλλωστε, ο πεπτιδικός

χάρτης – αποτύπωμα δεν παρέχει από μόνος του πληροφορία για την πρωτεΐνη η οποία υπέστη την πέψη. Σε αυτό το σημείο μεγάλη είναι η συμβολή των βάσεων δεδομένων στις οποίες πρωτεΐνες από αρκετούς οργανισμούς έχουν υποστεί πέψη *in silico* και έχουν υπολογιστεί οι θεωρητικές πεπτιδικές μάζες των προκυπτόντων πεπτιδίων (Εικ. 2.9). Η εισαγωγή δεδομένων από τη Φασματομετρία Μάζας και η σύγκριση τους με αυτά που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων, θα οδηγήσει στην ταυτοποίηση της εκάστοτε άγνωστης πρωτεΐνης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς δέκα στελεχών σαλμονέλας, υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης και εφαρμογής οργανικών οξέων. Στο κεφάλαιο 2 είχε περιγραφεί αναλυτικά η διαδικασία συλλογής της βιομάζας από τις καλλιέργειες των στελεχών καθώς επίσης και οι τεχνικές μελέτης των πρωτεϊνών. Οι διαδικασίες-μέθοδοι αυτές, σε συνάρτηση με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις και μελέτες, συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας αφού υπεισέρχεται εντός της μελέτης και ο παράγων πρωτέωμα απαντώντας ερωτήματα για το που οφείλεται η πιθανά ιδιαίτερη απόκριση-ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών στις συνθήκες όξινης καταπόνησης και στη χρήση οργανικών οξέων.

3.1 Επίδραση των πειραματικών συνθηκών στην ανάπτυξη στελεχών σαλμονέλας

Προκειμένου να καθοριστεί αρχικά ποιοι είναι οι συνδυασμοί pH-συγκέντρωσης οξέων - θερμοκρασίας στους οποίους οι μικροοργανισμοί δύναται να αναπτυχθούν (περιοχές ανάπτυξης – μη ανάπτυξης ή growth – no growth interface) έγινε προκαταρκτικό πείραμα κατά το οποίο τα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν σε υποστρώματα με διαβάθμιση του pH (4,2, 5,0 και 5,6) και συγκέντρωση οξέων 100 mM. Οι μικροοργανισμοί επώαστηκαν στις εξής θερμοκρασίες: 10, 15, 20, 25 °C. Η ρύθμιση του pH γινόταν είτε με καυστικό νάτριο είτε με υδροχλωρικό οξύ. Οι συνδυασμοί pH και συγκέντρωσης οξέων των υποστρωμάτων (με τριπλή επανάληψη) σε ένα microplate (μικροκυψέλες) φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BH 4,2	BH 4,2	BH 4,2	BH 5,0	BH 5,0	BH 5,0	BH 5,6	BH 5,6	BH 5,6	BH+L 4,2	BH+L 4,2	BH+L 4,2
B	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,6	BH+L 5,6	BH+L 5,6	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 5,0	BH+F 5,0	BH+F 5,0
C	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6				BH 4,2	BH 4,2	BH 4,2	BH 5,0	BH 5,0	BH 5,0
D	BH 5,6	BH 5,6	BH 5,6	BH+L 4,2	BH+L 4,2	BH+L 4,2	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,6	BH+L 5,6	BH+L 5,6
E	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 5,0	BH+F 5,0	BH+F 5,0	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6			
F	BH 4,2	BH 4,2	BH 4,2	BH 5,0	BH 5,0	BH 5,0	BH 5,6	BH 5,6	BH 5,6	BH+L 4,2	BH+L 4,2	BH+L 4,2
G	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,0	BH+L 5,6	BH+L 5,6	BH+L 5,6	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 5,0	BH+F 5,0	BH+F 5,0
H	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6									

Εικόνα 3.1 Απεικόνιση ενός plate για τρία διαφορετικά στελέχη και μία θερμοκρασία

Τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειράματος δεν παραθέτονται καθώς στόχος ήταν η δημιουργία μία γενικής εικόνας της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις συνθήκες που μελετήθηκαν στη συνέχεια, και ειδικότερα όσον αφορά στις ακραίες τιμές των συνθηκών αυτών (pH, συγκέντρωση οξέων). Κατόπιν, χρησιμοποιώντας τα συμπεράσματα σχετικά με τη συμπεριφορά των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας στις συγκεκριμένες συνθήκες, ακολούθησε το κυρίως πείραμα με σκοπό τη λεπτομερέστερη μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης τους, παρουσία οργανικών οξέων.

Οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών αναπροσαρμόστηκαν. Έτσι οι τιμές pH κυμάνθηκαν από 4,2 έως 5,6 (ανά 0,2), η ρύθμιση του pH γινόταν είτε με καυστικό νάτριο είτε με υδροχλωρικό οξύ και οι συγκεντρώσεις οξέων (γαλακτικού και φορμικού) ήταν 25, 50 και 100 mM. Όπως και στο προκαταρκτικό πείραμα έτσι και τώρα οι μικροοργανισμοί επωάστηκαν στις θερμοκρασίες 10, 15, 20, 25 °C.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται μία απεικόνιση ενός microplate το οποίο αφορά στη μελέτη ενός στελέχους σαλμονέλας, σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI με προσθήκη φορμικού οξέος (τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις), υπό ένα θερμοκρασιακό καθεστώς και για το σύνολο των διαφορετικών τιμών pH. Για κάθε περίπτωση συνθηκών υπάρχει τριπλή επανάληψη (τρία «κελάκια»).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 mM	A	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,8	BH+F 4,8	BH+F 4,8
	B	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6
50 mM	C	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,8	BH+F 4,8	BH+F 4,8
	D	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6
100 mM	E	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,2	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,4	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,6	BH+F 4,8	BH+F 4,8	BH+F 4,8
	F	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,2	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,4	BH+F 5,6	BH+F 5,6	BH+F 5,6
	G												
	H												

Εικόνα 3.2 Απεικόνιση ενός plate για ένα στέλεχος σε υπόστρωμα BHI με προσθήκη φορμικού για μία θερμοκρασία

15 °C																								
BHI																								
	pH 4,2	pH 4,2	pH 4,2	pH 4,4	pH 4,4	pH 4,4	pH 4,6	pH 4,6	pH 4,6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,2	pH 5,2	pH 5,2	pH 5,4	pH 5,4	pH 5,4	pH 5,6	pH 5,6	
23	0,2070	0,2600	0,2050	0,3490	0,3750	0,3600	0,4550	0,4600	0,4330	0,4800	0,4540	0,4920	0,2910	0,5240	0,5730	0,5260	0,5450	0,5470	0,6160	0,6150	0,6010	0,6250	0,6230	0,5760
98	0,2900	0,2770	0,2710	0,2640	0,2900	0,2360	0,3850	0,3000	0,2450	0,3460	0,3200	0,2790	0,4360	0,4910	0,5170	0,5940	0,5960	0,6290	0,6470	0,6580	0,6050	0,6820	0,6290	0,5120
167	0,2290	0,1930	0,1840	0,2500	0,2760	0,2860	0,4450	0,3110	0,2920	0,3590	0,3400	0,3250	0,3150	0,3640	0,4260	0,5100	0,5040	0,5440	0,5940	0,5810	0,5830	0,6160	0,6300	0,5860
252	0,2770	0,2490	0,2580	0,3070	0,3220	0,3200	0,3480	0,3500	0,3340	0,3520	0,3870	0,3520	0,3600	0,5260	0,5510	0,6230	0,6120	0,6340	0,6780	0,6450	0,6170	0,7830	0,7340	0,6150
279	0,1670	0,1610	0,1590	0,2870	0,3000	0,2670	0,3130	0,2910	0,2470	0,3400	0,3130	0,3090	0,3940	0,4500	0,4870	0,5660	0,5760	0,5630	0,5910	0,5630	0,4580	0,7180	0,5730	0,5200
355	0,2150	0,2120	0,2380	0,2710	0,2960	0,3030	0,3270	0,3030	0,2560	0,2600	0,3120	0,2660	0,4570	0,4710	0,4710	0,5270	0,5500	0,5580	0,5860	0,5540	0,5240	0,5600	0,5090	0,5310
655	0,3560	0,3170	0,3020	0,3100	0,3190	0,3220	0,3870	0,3570	0,3710	0,3850	0,4230	0,3910	0,4010	0,5290	0,5000	0,5310	0,5720	0,5380	0,5870	0,5790	0,5160	0,5800	0,5200	0,6930
782	0,1980	0,2460	0,2760	0,3520	0,3650	0,3550	0,4070	0,3890	0,3670	0,3960	0,3980	0,4160	0,4570	0,4240	0,4330	0,4900	0,4680	0,4690	0,5270	0,5470	0,5110	0,5790	0,5820	0,5590
860	0,1340	0,1190	0,1270	0,1910	0,1950	0,2010	0,2590	0,2590	0,2360	0,2420	0,2210	0,2260	0,3370	0,3880	0,3930	0,4310	0,4660	0,4400	0,4810	0,4780	0,4440	0,4680	0,4560	0,3550
15100	0,3530	0,2530	0,2500	0,3380	0,2960	0,2830	0,3800	0,3900	0,3660	0,4520	0,4640	0,3450	0,3430	0,4440	0,4760	0,5790	0,6070	0,5910	0,6550	0,6540	0,6490	0,7960	0,7840	0,6840

Πίνακας 3.1 Πίνακας με τιμές απορρόφησης από το φωτόμετρο. Συνθήκες ανάπτυξης: 15°C, υπόστρωμα BHI. Η αριστερή στήλη περιλαμβάνει τα δέκα στελέχη σαλμονέλας με τους κωδικούς αριθμούς τους. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει ανάπτυξη.

Ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου των μικροοργανισμών ήταν της τάξης του $1 \cdot 10^6$ cfu/ml - $3 \cdot 10^6$ cfu/ml.

Στον παραπάνω πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης από το φωτόμετρο (620 nm) για το σύνολο των στελεχών, σε υπόστρωμα BHI, για την θερμοκρασία των 15 °C. Οι μετρήσεις είναι ενδεικτικές καθώς τα στελέχη στη συγκεκριμένη περίπτωση επωάζονται για περίπου 15 ημέρες ενώ η ανάπτυξη και συνεπώς το αποτέλεσμα για ανάπτυξη ή μη, είναι ακόμα σε εξέλιξη, τουλάχιστον μέχρι τις 25-30 ημέρες. Φυσικά, αποτελέσματα-τιμές οπτικής απορρόφησης που είναι διαφορούμενες και αβέβαιες (τιμές μεταξύ 0,35 έως 0,45) ελέγχονται εν συνεχεία με μέθοδο επίστρωσης σε τρυβλία και εν συνεχεία καταμέτρηση των αποικιών και σύγκριση με τον αρχικό πληθυσμό του εμβολίου.

Μετά την πάροδο του απαραίτητου χρόνου επώασης, για όλα τα στελέχη και όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των υποστρωμάτων με τους εμβολιασμένους μικροοργανισμούς με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων για την ανάπτυξη ή μη των στελεχών (growth-no growth).

Τα αποτελέσματα για τη θερμοκρασία ανάπτυξης 25 °C φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2). Με κόκκινο χρώμα και σύμβολο «+» υποδηλώνονται οι συνθήκες όπου παρατηρήθηκε ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ με κίτρινο χρώμα και σύμβολο «-» όπου δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη και αύξηση του πληθυσμού σε σύγκριση με τον αρχικό πληθυσμό ενοφθαλμισμού. Τα μελετώμενα υποστρώματα είναι τα: BHI, BHI με προσθήκη γαλακτικού οξέος (BH+L) τριών συγκεντρώσεων και BHI με προσθήκη φορμικού οξέος (BH+F) τριών συγκεντρώσεων.

Στον παραπάνω πίνακα για τους 25 °C φαίνεται ότι όλα τα στελέχη, χωρίς κάποια εμφανή διαφοροποίηση, αναπτύσσονται στο υπόστρωμα BHI σε όλες τις διαφορετικές τιμές pH, ακόμη και στις χαμηλότερες όπως η 4,2. Η συμπεριφορά αυτή όμως δεν παρατηρείται και στην περίπτωση που έχει προστεθεί στο υπόστρωμα γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 25 mM , όπου με εξαίρεση τα στελέχη 98 και 252, που παρουσιάζουν μία ελαφριά ανθεκτικότητα στη συγκεκριμένη περίπτωση συνθηκών, τα υπόλοιπα αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με τιμές pH από 4,4 και άνω. Εντονότερο το φαινόμενο αυτό γίνεται και στις επόμενες περιπτώσεις όπου όταν η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είναι 50 mM η πλειοψηφία των στελεχών (εκτός των 98 και 15100) καταφέρνει να αναπτυχθεί σε τιμές pH από 4.6 και άνω. Φυσικά, όπως είναι αναμενόμενο, στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είναι 100 mM η δυνατότητα ανάπτυξης είναι μικρότερη απ' ότι στις μικρότερες συγκεντρώσεις οξέος και η πλειονότητα των στελεχών παρουσιάζει ανάπτυξη σε υποστρώματα με τιμές pH ίσες και μεγαλύτερες του 5.0. Στην συγκεκριμένη περίπτωση διαφοροποίηση παρουσιάζουν τα στελέχη 23, 98 και 167.

Όσον αφορά στις περιπτώσεις προσθήκης φορμικού οξέος στο υπόστρωμα BHI, στην περίπτωση συγκέντρωσης 25mM φορμικού οξέος παρατηρείται αντίστοιχη εικόνα με την περίπτωση γαλακτικού οξέος με εξαίρεση το ποια στελέχη είναι αυτά τα οποία κατάφεραν να αναπτυχθούν στις χαμηλές τιμές pH (στην προκειμένη περίπτωση διαφοροποιήθηκαν τα στελέχη 169 και 297). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το στέλεχος 655 παρουσίασε «ταχύτερη» ανάπτυξη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη στο σύνολο των υποστρωμάτων BHI παρουσία φορμικού οξέος, είχε δηλαδή εμφανίσει ανάπτυξη σε χαμηλές τιμές pH (4.4 και 4.6) αρκετές ημέρες νωρίτερα απ' ότι η πλειοψηφία των υπόλοιπων στελεχών. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις συγκεντρώσεων φορμικού οξέος έχουν αντίστοιχο προφίλ με του γαλακτικού οξέος.

Στη συνέχεια παραθέτονται οι αντίστοιχοι πίνακες ανάπτυξης για τις θερμοκρασίες των 20 °C και 15 °C. Στους 20 °C (πίνακας 3.3) παρατηρείται μείωση του εύρους του pH που επιτρέπει ανάπτυξη συγκριτικά με τους 25°C. Εκτός του στελεχούς 252 όλα τα υπόλοιπα αναπτύσσονται σε pH από 4.4 και άνω. Στα υποστρώματα όπου έχει προστεθεί γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 25 mM και 50 mM παρουσιάζεται περισσότερο μειωμένο το εύρος ανάπτυξης με ελάχιστο pH που επιτρέπει την ανάπτυξη το 4,8 (εκτός του στελεχούς 782 στη συγκέντρωση 50 mM που αναπτύσσεται σε $\text{pH} \geq 5.0$).

	20 C												20 C																		
	BH						BH+L 50mM						BH+L 100mM						BH+F 100mM												
	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4
23	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
252	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
297	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
655	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
782	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
860	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15100	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Στους 20 °C σε υποστρώματα όπου έχει προστεθεί φορμικό οξύ συγκέντρωσης 25 mM, 50 mM και 100 mM παρουσιάζεται μία μείωση του εύρους του pH που επιτρέπει ανάπτυξη, της τάξης του 0,2 στις συγκεντρώσεις 25 mM και 50 mM (με εξαίρεση το στέλεχος 782 στη συγκέντρωση 50 mM που αναπτύσσεται σε $\text{pH} \geq 4,6$) και τη τάξης του 0,4 στη συγκέντρωση 100 mM. Εμφανής είναι η διαφοροποίηση στην ικανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών μεταξύ των δύο συνθηκών – υποστρωμάτων γαλακτικού και φορμικού, όπου το γαλακτικό προκαλεί μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης απ’ ότι το φορμικό στη συγκεκριμένη θερμοκρασία (20 °C) για όλες τις συγκεντρώσεις.

Στον πίνακα 3.4 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους 15 °C, το μοτίβο ανάπτυξης των στελεχών στο υπόστρωμα BHI είναι σχεδόν ίδιο με τους 20 °C. Στις περιπτώσεις όμως που έχει προστεθεί γαλακτικό οξύ στα υποστρώματα, παρατηρείται μία έντονη αναστολή της ανάπτυξης στα χαμηλά pH με ελάχιστο pH ανάπτυξης το 5.0 για συγκέντρωση γαλακτικού 25 mM, ενώ για τις συγκεντρώσεις 50 mM και 100 mM η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι εμφανής μόνο στα pH 5.4 και 5.6. Όσον αφορά στο φορμικό, στη θερμοκρασία των 15 °C, φαίνεται να έχει ανασταλτική δράση σε μεγάλο βαθμό, καθώς κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε ανάπτυξη, ούτε και στα υψηλά pH. Εξαίρεση αποτελούν τα στελέχη 23 και 15100 που κατάφεραν να αναπτυχθούν σε όλες τις συγκεντρώσεις φορμικού οξέος, ακόμη και σε πολύ χαμηλά pH, γεγονός που τα διαφοροποιεί από όλα τα υπόλοιπα στελέχη. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι συγκεκριμένες συνθήκες επώασης αποτελούν το κρίσιμο όριο μεταξύ ανάπτυξης και μη των συγκεκριμένων στελεχών.

Είναι εμφανές πως για τη πλειοψηφία των στελεχών στην συγκεκριμένη θερμοκρασία των 15 °C, το φορμικό οξύ έχει πολύ μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών συγκριτικά με το γαλακτικό οξύ, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το φαινόμενο αυτό είναι «αντίστροφο» με τη συμπεριφορά των στελεχών στους 20 °C όπου το γαλακτικό προκαλεί μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης απ’ ότι το φορμικό, για όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Στον πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα δέκα στελέχη στους 10 °C. Στις συγκεκριμένες συνθήκες οι μικροοργανισμοί στο υπόστρωμα BHI παρουσιάζουν μία μικρή παραλλακτικότητα καθώς τα στελέχη 23, 252, 297, 355 και

	15 C						15 C						15 C						15 C											
	BH						BH+L 25mM						BH+L 50mM						BH+L 100mM											
	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2
23	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
252	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
297	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
655	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
782	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
860	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15100	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

782 αναπτύσσονται σε pH μεγαλύτερο ή και ίσο του 4.6, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη 98, 167, 655, 860 και 15100 παρουσιάζουν ανάπτυξη σε pH μεγαλύτερα ή και ίσα του 4,8. Στις περιπτώσεις όπου οι μικροοργανισμοί επώαστηκαν σε υποστρώματα ΒΗΙ με προσθήκη γαλακτικού οξέος η συμπεριφορά τους (growth- no growth) είναι σχεδόν όμοια με την αντίστοιχη στους 15 °C όπου για συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 25 mM κατώτερη τιμή pH που επιτρέπει την ανάπτυξη είναι η 5.0 και για τις συγκεντρώσεις 50 mM και 100 mM η 5.4. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος 655, που σε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 25 mM έχει σαν κατώτερο pH ανάπτυξης την τιμή 5.2.

Όσον αφορά στα υποστρώματα στα οποία έχει προστεθεί φορμικό οξύ, η εικόνα ήταν καθολική και αδιαμφισβήτητη καθώς για καμία από τις τρεις συγκεντρώσεις οξέος (25 mM, 50 mM και 100 mM) , για κανένα από τα οχτώ pH και σε κανένα από τα δέκα στελέχη δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη, στο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό καθεστώς των 10 °C.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω φαινοτυπικά αποτελέσματα ανάπτυξης των στελεχών σαλμονέλας συμπεραίνεται ότι οι μεταξύ τους διαφορές είναι μικρές και κυμαίνονται σε διαφοροποιήσεις της ανάπτυξης τους που αφορούν τιμές pH της τάξης του 0,2 έως 0,4.

Αξιοσημείωτη όμως είναι η διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των στελεχών μεταξύ των δύο διαφορετικών οξέων σε σχέση με το θερμοκρασιακό καθεστώς, παρατηρείται δηλαδή ότι στις θερμοκρασίες 25 °C και 20 °C όλα τα στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα και έχουν μεγαλύτερα όρια pH που επιτρέπουν την ανάπτυξη στο φορμικό οξύ απ' ότι στο γαλακτικό οξύ. Αντίθετα στις χαμηλές θερμοκρασίες (15 °C και 10 °C) το φαινόμενο αντιστρέφεται και παρατηρείται ανάπτυξη (αν και σε υψηλά pH) των μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με γαλακτικό οξύ ενώ σε υπόστρωμα παρουσία φορμικού οξέος ήταν αδύνατη η ανάπτυξη για όλο το εύρος του pH που μελετήθηκε (εκτός δύο εξαιρέσεων που ήδη αναφέρθηκαν: στελέχη 23 και 15100).

Παρ' όλα αυτά λαμβάνοντας υπόψη μας όχι μόνο τα αποτελέσματα της ανάπτυξης ή της μη ανάπτυξης, αλλά και την «πορεία» της ανάπτυξης και τη γενικότερη εικόνα που παρουσίασε το κάθε στέλεχος κατά τη διάρκεια της επώασης του, μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Είναι σαφές το γεγονός πως καθώς αυξάνεται ο αριθμός και η ισχύς των «εμποδίων» (συγκέντρωση οργανικών οξέων, pH, θερμοκρασία) η ανάπτυξη των μικροοργανισμών περιορίζεται και η μείωση και δυσκολία ανάπτυξης είναι ανάλογη των ανασταλτικών παραγόντων.
- Παρατηρήθηκε μία μικρή διαφοροποίηση στα επίπεδα-όρια ανάπτυξης των δέκα στελεχών σαλμονέλας η οποία όμως δεν ακολουθούσε ένα συγκεκριμένο πρότυπο για τις διαφορετικές συνθήκες επώασης.
- Το στέλεχος 252 (*S. Senftenberg*) παρουσιάστηκε ελαφρώς ανθεκτικότερο, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη, όταν αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα BHI με προσθήκη γαλακτικού οξέος ενώ ήταν από τα λιγότερο ανθεκτικά όταν αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα BHI με προσθήκη φορμικού οξέος.
- Το στέλεχος 297 (*S. Putten*) είχε «αντίθετη» συμπεριφορά από το στέλεχος 252, δηλαδή εμφανίστηκε ελαφρώς ανθεκτικότερο, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη, όταν αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα BHI με προσθήκη φορμικού οξέος ενώ δεν ήταν τόσο ανθεκτικό σε υπόστρωμα με γαλακτικό οξύ.
- Το στέλεχος 655 (*S. Reading*) παρουσίασε ένα ενδιάμεσο πρότυπο ανάπτυξης και στις δύο περιπτώσεις προσθήκης οξέων στο υπόστρωμα BHI, όμως ήταν αξιοσημείωτο το γεγονός ότι εμφάνισε πολύ «γρήγορη» ανάπτυξη, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, στο υπόστρωμα που περιείχε φορμικό οξύ παρόλο που το τελικό αποτέλεσμα ανάπτυξης του ήταν ίδιο με την πλειοψηφία των υπολοίπων στελεχών.
- Τέλος, η ανασταλτική δράση των δύο οξέων φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Το γαλακτικό οξύ φάνηκε να έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε υψηλές θερμοκρασίες (25 °C και 20 °C) ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (15 °C και 10 °C) το φορμικό οξύ ήταν αυτό που παρεμπόδιζε σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη των συγκεκριμένων στελεχών.

Ο πίνακας 3.6 παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανάπτυξης των στελεχών για όλες τις συνθήκες ανάπτυξης που μελετήθηκαν.

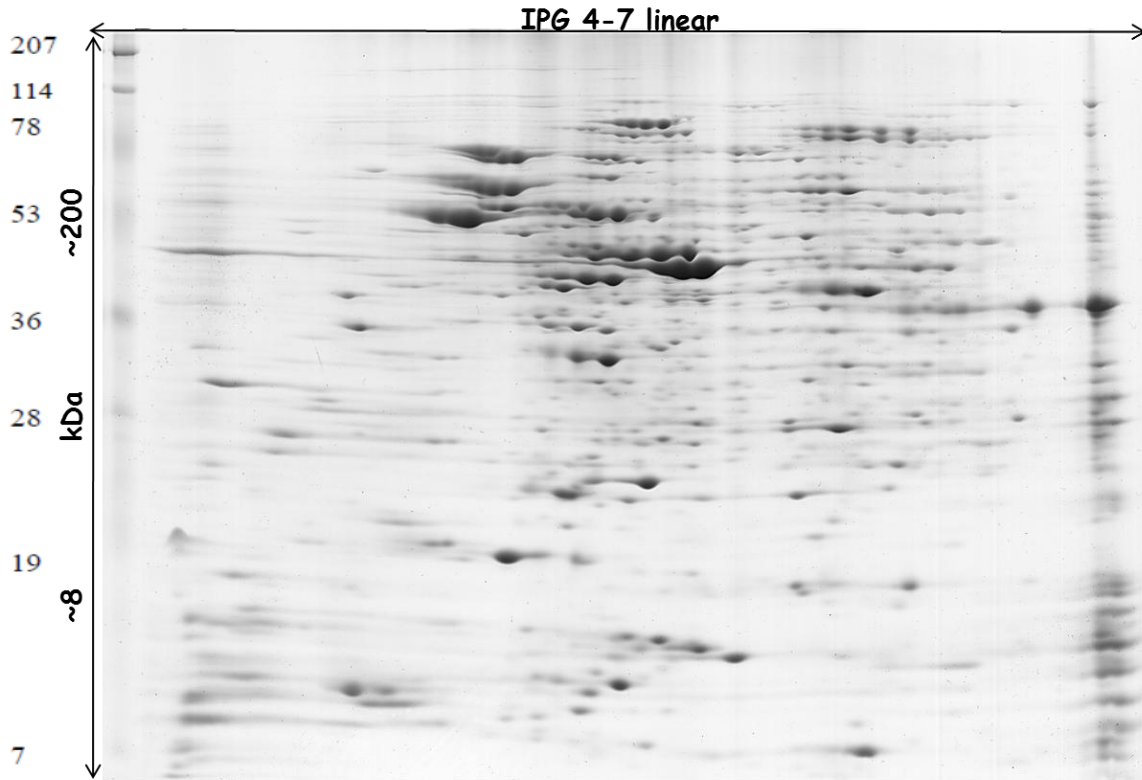
Για τους παραπάνω λόγους και θέλοντας να μελετήσουμε πέρα από τα όρια ανάπτυξης και το πρωτεϊνικό προφίλ των στελεχών, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη (πρωτεομική ανάλυση) τα στελέχη με τους κωδικούς αριθμούς 252, 297, 655 και 15100.

3.2 Πρωτεομική ανάλυση

Εκτός από τη μελέτη της ανάπτυξης των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν και η μελέτη του πρωτεϊνικού προφίλ τους. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν για πρωτεομική ανάλυση τέσσερα στελέχη από τα δέκα. Το στέλεχος 252 που παρουσίασε ανθεκτικότητα όσον αφορά στην ανάπτυξή του σε υπόστρωμα που περιείχε γαλακτικό οξύ ενώ αντίθετα σε υπόστρωμα που περιείχε φορμικό ήταν αρκετά ευαίσθητο, το στέλεχος 297 που αναπτύχθηκε αρκετά καλά σε υπόστρωμα με φορμικό οξύ αλλά ήταν αρκετά ευαίσθητο σε υπόστρωμα με γαλακτικό οξύ. Το στέλεχος 655 που παρουσίασε μία αρκετά «ταχεία» ανάπτυξη σε υπόστρωμα παρουσία φορμικού οξέος και τέλος επιλέχθηκε το στέλεχος 15100 ως στέλεχος μάρτυρας καθώς δεν έχει απομονωθεί από δείγματα ζωοτροφών.

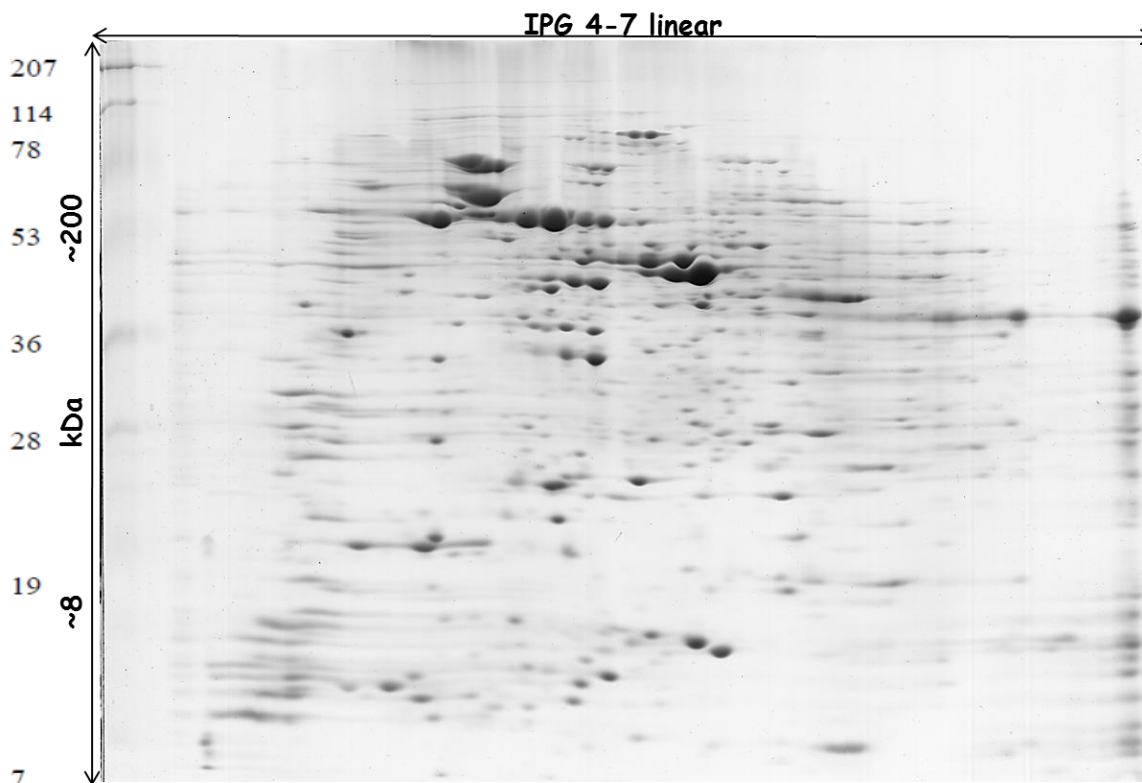
Η σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις ηλεκτροφορήσεις δύο διαστάσεων και ο προσδιορισμός τυχόν ομοιοτήτων αλλά και διαφορών στην εμφάνιση ή μη ορισμένων πρωτεϊνικών στιγμάτων (πρωτεϊνών), μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε, με σάρωση και ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτυπωμένων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης πρωτεωμάτων, με το λογισμικό PDQuest Advanced 8.0.1 της BIO-RAD. Ο εντοπισμός ομοιοτήτων ή διαφορών έγκειται στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων κοινά απαντώμενων σε κάποια από τα μελετώμενα στελέχη αλλά όχι σε όλα ή και στην εύρεση πρωτεϊνικών στιγμάτων που εμφανίζονται μόνο σε ένα εκ των στελεχών. Επίσης διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ μπορεί να οφείλονται και σε ποσοτικές διαφορές έκφρασης των πρωτεϊνών που απεικονίζονται στις πηκτές (gel) σαν εντονότερα ή αχνότερα στίγματα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι τέσσερις πηκτές πολυακρυλαμίδης για τα τέσσερα στελέχη που μελετήθηκαν, κάθε εικόνα αποτελεί το αποτέλεσμα της 2D ηλεκτροφόρησης των κυττάρων των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας που είχαν προηγουμένως επωαστεί (18-24 h, 37 °C) σε υπόστρωμα BHI.



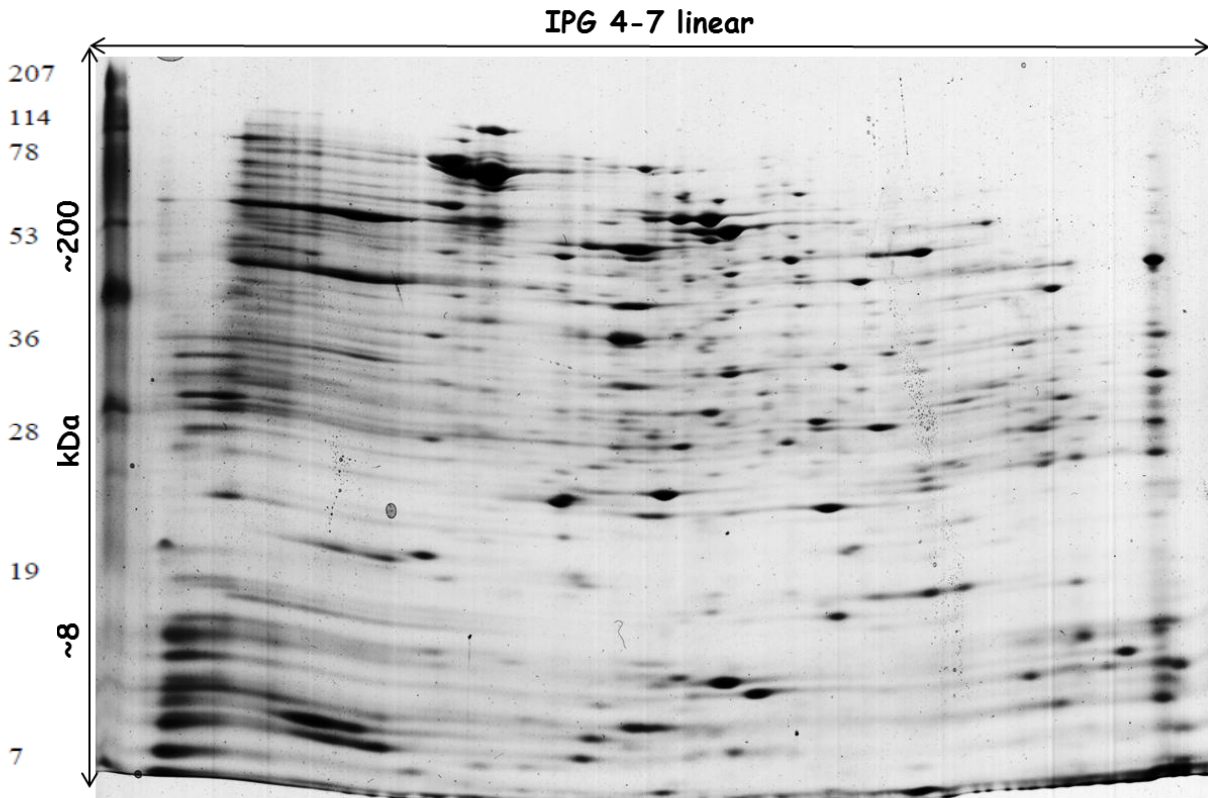
S. Senftenberg (252)

Εικόνα 3.3 Πρωτόωμα του βακτηριακού στελέχους σαλμονέλας 252 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων.



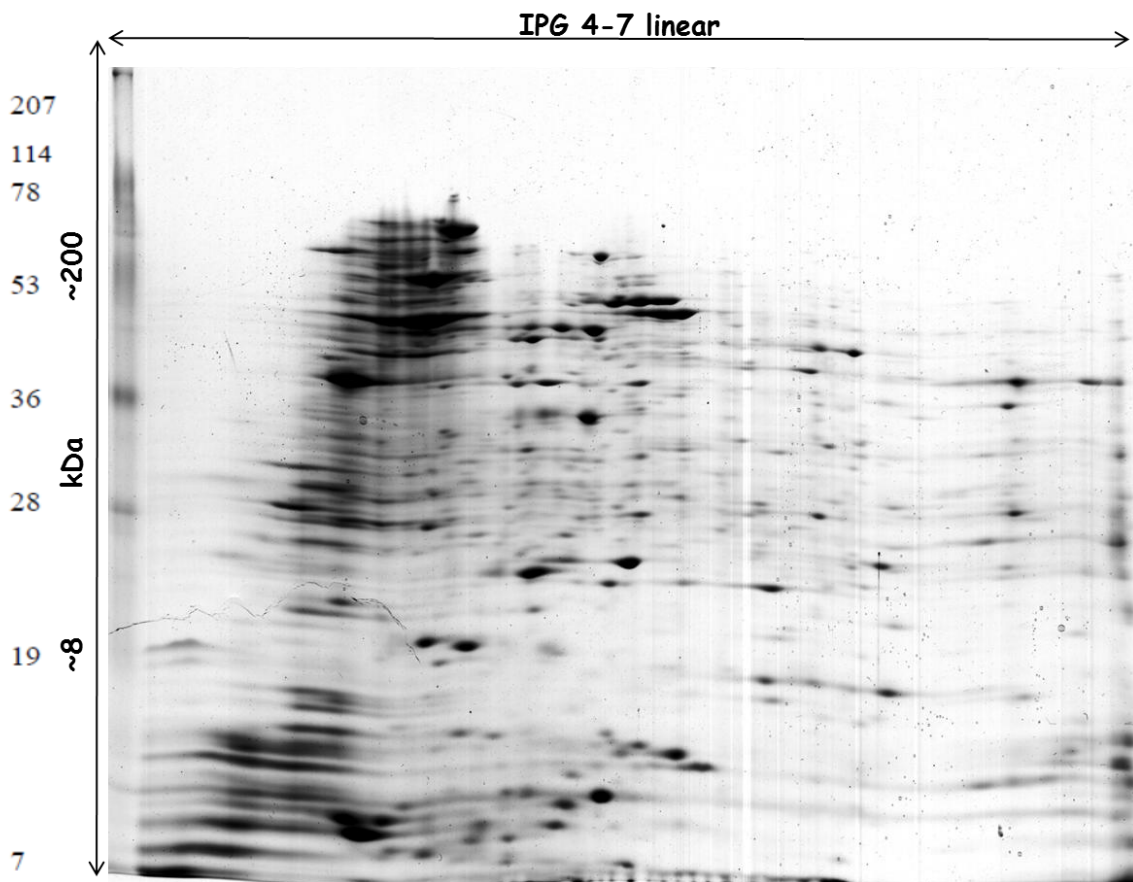
S. Putten (297)

Εικόνα 3.4 Πρωτόωμα του βακτηριακού στελέχους σαλμονέλας 297 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων.



S. Reading (655)

Εικόνα 3.5 Πρωτόωμα του βακτηριακού στελέχους σαλμονέλας 655 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.



S. Typhimurium (15100)

Εικόνα 3.6 Πρωτόωμα του βακτηριακού στελέχους σαλμονέλας 655 μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων.

Όταν μια πρωτεΐνη αποτυπωθεί και εντοπιστεί επάνω στην πηκτή της ηλεκτροφόρησης με τη μορφή στίγματος (spot), επόμενο βήμα είναι η εμφάνιση και ο χαρακτηρισμός αυτού του στίγματος. Οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία είναι το μέγεθος και η ένταση του αποτυπωμένου στίγματος. Έντονα και μεγάλου μεγέθους στίγματα υποδηλώνουν παρουσία μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης εν αντιθέσει με τα μικρά και αμυδρά, τα οποία υποδηλώνουν μικρές ποσότητες πρωτεΐνης. Το πόσο έντονα όμως θα εμφανιστεί ένα πρωτεϊνικό στίγμα εξαρτάται από την ποσότητα δεσμευμένης χρωστικής επί της πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, ένα μεγάλο πρωτεϊνικό στίγμα δύναται να υποδεικνύει την παρουσία ταυτόχρονα μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών, με μικρές διαφορές στα μοριακά τους βάρη.

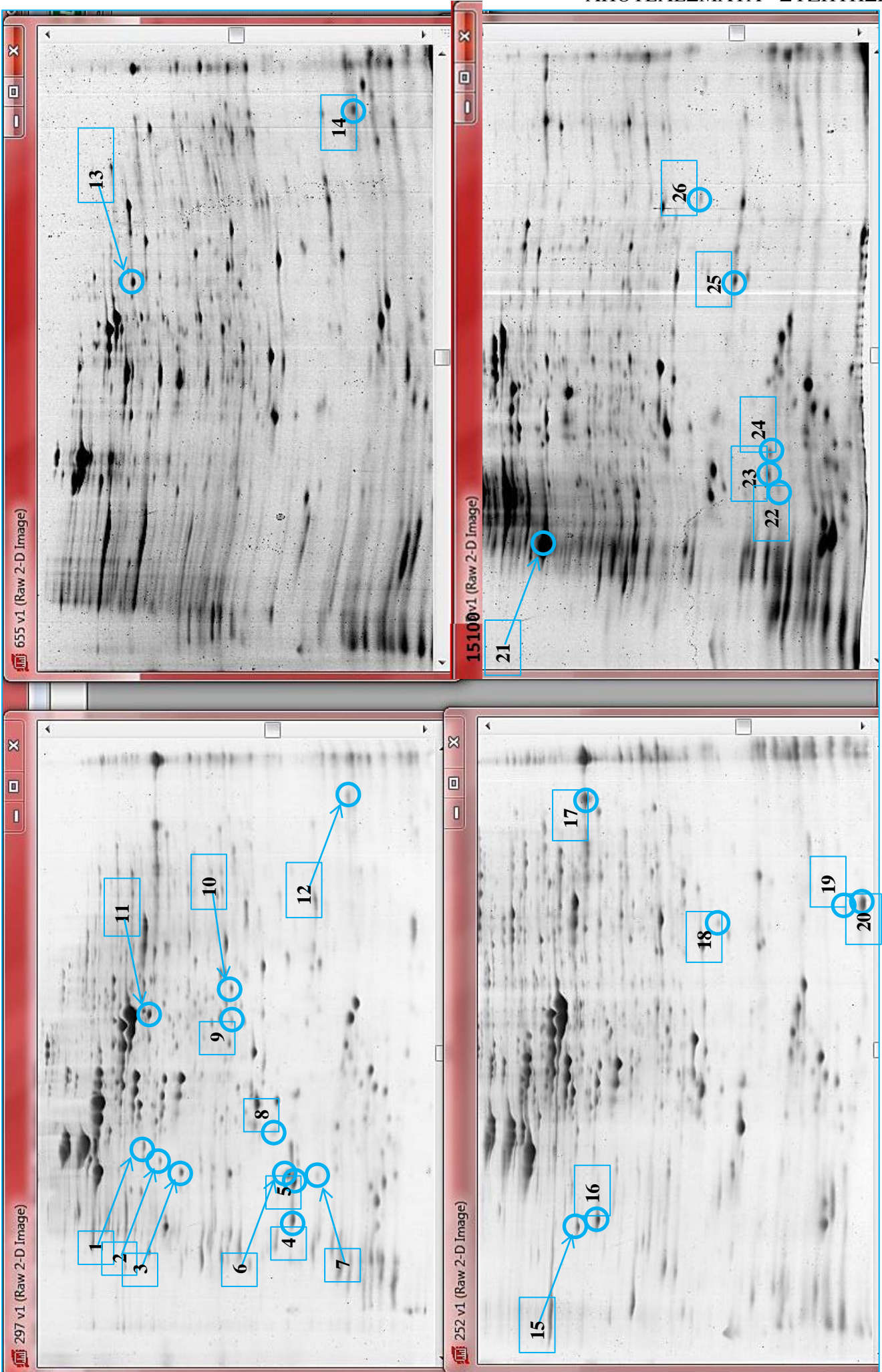
Στη συνέχεια ακλούθησε ο εντοπισμός των διαφορών μεταξύ των τεσσάρων πηκτών και ειδικότερα ο εντοπισμός των πρωτεϊνικών κηλίδων (spots) που υπάρχουν μόνο σε κάποια από τις πηκτές και όχι σε όλες. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής εντοπίστηκαν 26 κηλίδες, που είτε απουσίαζαν από το πρωτεϊνικό προφίλ ενός από τα τέσσερα στελέχη είτε διέφερε η έντασή τους μεταξύ των στελεχών.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των επιλεχθέντων πρωτεϊνικών κηλίδων στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών με στόχο τη λήψη πληροφοριών για την περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών που διαφέρουν από στέλεχος σε στέλεχος.

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με τη μέθοδο MALDI – TOF MS φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (3.7) και το σύνολο των spots που στάλθηκαν για ταυτοποίηση παρουσιάζεται στην εικόνα 3.7, όπου φαίνεται η θέση τους πάνω στην κάθε πηκτή και είναι δυνατή η άμεση σύγκριση με τα πρωτεϊνικά προφίλ των υπολοίπων στελεχών.

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα ταυτοποίησης των πρωτεϊνών, που επιλέχθηκαν από τις πηκτές, με την μέθοδο MALDI-TOF MS.

Title	Comment	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Protein MW	Status	Accession	pI-Value
Multiphosphoryl transfer protein	Spot 1	139	31	57	39569	Identified	PTFAH_SALTY	4,7
Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	Spot 2	122	0	43	38997	Identified	POTD_SALTI	5
Flagellar hook-associated protein	Spot 3	156	125	74	34154	Identified	FLGL_SALTY	4,7
Fimbrial subunit type 1	Spot 4	49	0	29	19000	Undefined	FIM11_SALTY	6,1
Fimbrial subunit type 1	Spot 5	47	0	29	19000	Undefined	FIM11_SALTY	6,1
Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	Spot 6	107	0	60	18236	Identified	PTGA_SALTI	4,6
Bacterioferritin	Spot 7	97	69	62	18343	Identified	BFR_SALTY	4,5
NAD(P)H-flavin reductase	Spot 8	27	5	20	26448	Undefined	FRE_SALTY	5
8-amino-7-oxononanoate synthase	Spot 9	23	0	10	42274	Undefined	BIOF_SALA4	10
Purine nucleoside phosphorylase deoD-type	Spot 10	178	0	84	26190	Identified	DEOD_SALDC	5,2
Ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Spot 11	108	14	60	37021	Identified	OTCC_SALTY	5,2
50S ribosomal protein L9	Spot 12	160	0	83	15774	Identified	RL9_SALA4	6,2
Phosphoserine aminotransferase	Spot 13	141	0	51	40058	Identified	SERC_SALA4	5,3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Spot 14	40	0	15	35735	Undefined	G3P1_SALTY	6,4
Outer membrane protein C	Spot 15	210	0	62	41214	Identified	OMPC_SALTY	4,5
Outer membrane porin protein ompD	Spot 16	43	0	21	39655	Undefined	OMPD_SALCH	4,5
Methylglyoxal synthase	Spot 17	24	0	18	17037	Undefined	MGSA_SALA4	6,2
S-ribosylhomocysteine lyase	Spot 18	73	0	44	19467	Uncertain	LUXS_SALA4	5,7
Autoinducer 2 import ATP-binding protein lsrA	Spot 19	23	0	8	55939	Undefined	LSRA_SALPA	5,7
UPF0033 protein yedF	Spot 20	35	0	50	8747	Undefined	YEDF_SALTI	4,7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Spot 21	218	0	80	35735	Identified	G3P1_SALTY	6,4
Autoinducer 2 import ATP-binding protein lsrA	Spot 22	28	0	8	55912	Undefined	LSRA_SALCH	5,7
Anti-adaptor protein iraM	Spot 23	31	7	27	13902	Undefined	IRAM_SALTY	9,8
Invasion protein iagB	Spot 24	24	0	24	18471	Undefined	IAGB_SALTI	10
DNA protection during starvation protein	Spot 25	45	0	29	18706	Undefined	DPS_SALA4	5,7
S-ribosylhomocysteine lyase	Spot 26	74	0	44	19467	Uncertain	LUXS_SALDC	5,7



Εικόνα 3.7 Οι τέσσερις πηκτές των τεσσάρων στελεχών σαλμονέλας με σημειωμένα τα spots που επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση. Με βέλος επισημειώνονται τα spots των οποίων οι πρωτεΐνες χαρακτηρίστηκαν ως identified.

Στην εικόνα 3.7 είναι σημειωμένα με μπλε κύκλο τα 26 πρωτεϊνικά στίγματα που στάλθηκαν για ταυτοποίηση με την αντίστοιχη αρίθμηση τους (πίνακας 3.7, 2^η στήλη) και μεταξύ αυτών με βέλος και αρίθμηση είναι τα 11 spots τα οποία με την ταυτοποίηση χαρακτηρίστηκαν ως ‘identified proteins’. Η πλειοψηφία των συγκεκριμένων στιγμάτων εντοπίζεται ξεκάθαρα στην πηκτή του στελέχους 297 (*S. Putten*) και απουσιάζει ή εντοπίζεται με μικρότερη ένταση σε ένα ή και περισσότερα από τα υπόλοιπα στελέχη. Σαφώς υπάρχουν και spots που βρίσκονται σε κάποια από τα υπόλοιπα στελέχη και απουσιάζουν από το στέλεχος 297. Στον πίνακα 3.8 φαίνονται τα ταυτοποιημένα spots με τα ονόματα των πρωτεϊνών και το στέλεχος όπου εντοπιστήκαν ξεκάθαρα και εν συνεχεία απομονώθηκαν.

Πίνακας 3.8 Οι πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως identified, ο αριθμός της κηλίδας (spot) στην οποία αντιστοιχεί η κάθε μία πρωτεΐνη και το στέλεχος ή τα στελέχη απ’ όπου απομονώθηκαν. Το σύμβολο «V» υποδηλώνει συμμετοχή της πρωτεΐνης παρουσία συνθηκών στρες, ενώ το «?» υποδηλώνει απουσία πληροφοριών (βιβλιογραφικά) για συμμετοχή της πρωτεΐνης σε μηχανισμούς απόκρισης σε συνθήκες στρες.

	Αριθμός spot (από MALDI-TOF MS)	Ονομασία πρωτεΐνης	Στέλεχος ή στελέχη που εντοπίζεται ξεκάθαρα	Στελέχη που εντοπίζεται με μικρότερη ένταση	Συμμετοχή σε μηχανισμούς απόκρισης του κυττάρου σε συνθήκες
1	Spot 1	Multiphosphoryl transfer protein	297	252, 655, 15100	√
2	Spot 2	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	297	252, 655, 15100	√
3	Spot 3	Flagellar hook-associated protein 3	297	252, 655, 15100	√
4	Spot 6	Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	297	252, 655, 15100	√
5	Spot 7	Bacterioferritin	297	15100	√
6	Spot 10	Purine nucleoside phosphorylase deoD-type	297,655	15100	√
7	Spot 11	Ornithine carbamoyltransferase, catabolic	297,655	252	?
8	Spot 12	50S ribosomal protein L9	297	655,15100	?
9	Spot 13	Phosphoserine aminotransferase	655	297	?
10	Spot 15	Outer membrane protein C	252	297	√
11	Spot 21	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	15100	-	?

3.3 Μελέτη των εντοπισμένων πρωτεϊνών

Έχοντας τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που διαφοροποιούνται από στέλεχος σε στέλεχος και ειδικότερα όσον αφορά αυτές που χαρακτηρίστηκαν ως «identified proteins» ακολούθησε βιβλιογραφική μελέτη της λειτουργίας της κάθε μίας, του βιολογικού της ρόλου και των μηχανισμών στους οποίους πιθανά εμπλέκεται. Στόχος ήταν η εξήγηση και ο συσχετισμός των πρωτεϊνών αυτών με μηχανισμούς απόκρισης του κυττάρου σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και μετέπειτα η εξήγηση των διαφορών στην ανάπτυξη μεταξύ των στελεχών με βάση το πρωτεϊνικό προφίλ τους.

Αναφορικά για την κάθε μία από τη πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν:

Πρωτεϊνική Κηλίδα 1 & 2 :

Οι πρωτεΐνες «Multiphosphoryl transfer protein» και «Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein» που αντιστοιχούν στα spots 1 και 2 αναφέρονται ως stress-responsive proteins (Crr και PotD αντίστοιχα) σε μελέτες που έχουν γίνει στο *E.coli* (Kyung-Yeon Han et al., 2007).

Η PotD φαίνεται να είναι μία περιπλασμική πρωτεΐνη η οποία προσδέεται με συγκεκριμένες ουσίες (πολυαμίνες και ιδιαίτερα τη σπερμιδίνη) και άλλες υπομονάδες (PotB and PotC; integral inner membrane protein) του συστήματος μεταφοράς πολυαμινών (Kashiwagi et al., 1996) Οι πολυαμίνες (πουτρεσκίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη) είναι απαραίτητες και συμμετέχουν σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες (Taboret et al., 1984, Pegg, 1988).

Για παράδειγμα, στο *E.coli* οι ενδοκυτταρικές πολυαμίνες προστατεύουν το κύτταρο από αποδιατακτικό στρες επιταχύνοντας την έκφραση γονιδιακών προϊόντων (hydrogen peroxide-inducible gene activator (oxyR), RNA polymerase sigma factor rpoS (rpoS), alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC), catalase HPI (katG) και catalase HPII (katE)) που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα του κυττάρου σε συνθήκες στρες.

Η πρωτεΐνη «Multiphosphoryl transfer protein» περιλαμβάνει δύο υπομονάδες:

1. Phosphocarrier protein HPr, Short name=Protein H
2. Fructose-specific phosphotransferase enzyme IIA component
Alternative names: EIIA-Fru, EIIF-Fru, PTS system fructose-specific EIIA component

Οι PTSs είναι ταξινομημένες σε τέσσερεις υπεροικογένειες με βάση τη φυλογένεια των EIIs και έχουν διακριτή εξελικτική προέλευση:

- Υπεροικογένεια γλυκόζης-φρουκτόζης-λακτόζης
- Υπεροικογένεια ασκορβικού-γαλακτικού
- Υπεροικογένεια μανόζης

Η υπεροικογένεια γλυκόζης-φρουκτόζης-λακτόζης αποτελείται από

- Την οικογένεια γλυκόζης (*E. coli* EIIA^{Glc}/EIICB^{Glc})
- Την οικογένεια φρουκτόζης-μανιτόλης (*E. coli* EIICBA^{Mtl})
- Την οικογένεια λακτόζης (*L. casei* EIIA^{Lac}/EIICB^{Lac})

Η Crr είναι ένα ένζυμο τύπου IIA του συστήματος PTS υπεύθυνο για τη μεταφορά της γλυκόζης στο κυτόπλασμα του κυττάρου του *E. coli*.

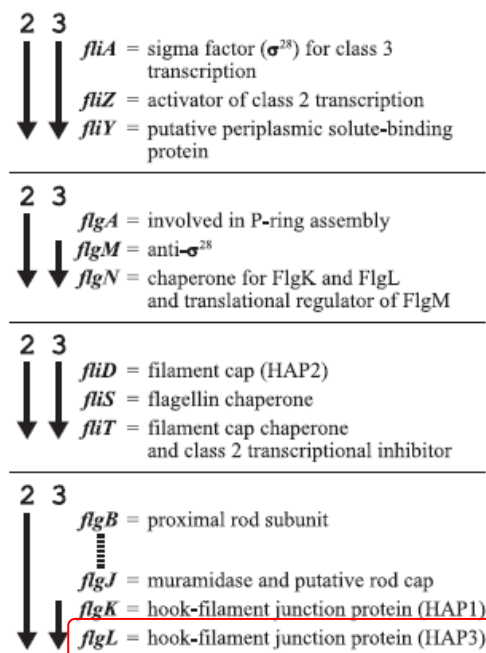
Οι πρωτεΐνες του συστήματος PTS επίσης φαίνεται να παίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο κατά την απόκριση του κυττάρου σε συγκεκριμένες συνθήκες στρες καθώς ανάλογα το στρες είτε υπερπαράγονται είτε μειώνεται δραματικά η ποσότητά τους. Παράδειγμα η HPr του *L. lactis* υφίσταται δραστική μείωση όταν τα κύτταρα έχουν εκτεθεί σε περιβάλλον με pH 5,5 ενώ σε pH 4,5 δεν παράγεται καθόλου. (Freeset al., 2003). Αντίθετα τα κύτταρα του *E. coli* όταν εκτεθούν σε χαμηλό pH περιέχουν αυξημένες ποσότητες πρωτεϊνικών συστατικών του μηχανισμού PTS όπως HPr και EIIBMan (ManX) (Blankenhorn et al., 1999). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στη *L. monocytogenes* όπου σε οσμωτικό στρες αυξάνεται η παραγωγή των CcrpA και του EIIA που ανήκουν στην υπεροικογένεια της μανόζης (Duche et al., 2002). Τέλος, σε συνθήκες ψυχρού σοκ αυξάνεται η παραγωγή της HPr στο μικροοργανισμό *B. subtilis* (Graumann et al., 1996).

Πρωτεϊνική Κηλίδα 3:

Τα μαστίγια (flagella) παρέχουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στα βακτήρια επιτρέποντάς τους να «κολυμπήσουν» προς τα θρεπτικά συστατικά και να απομακρυνθούν από επιβλαβείς-τοξικές ουσίες. Τα μαστίγια είναι πολύπλοκοι μηχανισμοί που αποτελούνται από περίπου δύο δωδεκάδες δομικών πρωτεϊνών στα βακτήρια *Salmonella* και *Escherichia coli* (Chilcott et al., 2000, Macnab, 2003).

Τα γονίδια των μαστιγίων σε πολλά βακτηριακά είδη οργανώνονται σε μεταγραφικές ιεραρχίες οι οποίες εκφράζουν ομάδες γονιδίων σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια βιογένεσης των μαστιγίων (Soutourina & Bertin, 2003). Στη σαλμονέλα υπάρχουν τρεις κλάσεις μαστιγιακών προαγωγέων στην μεταγραφική ιεραρχία (Kutsukake et al., 1990).

Οι πρωτεΐνες FliD, FlgK και FlgL είναι απαραίτητες για τη δομική κατασκευή των μαστιγίων και εκφράζονται τόσο από την 2 όσο και την 3 κλάση προαγωγέων (Kutsukake & Ide, 1995). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα τέσσερα οπερόνια των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τις δύο κλάσεις προαγωγέων, στη σαλμονέλα. Στο τελευταίο οπερόνιο υπάρχει και το γονίδιο (*flgL*) για την πρωτεΐνη που έχει εντοπίσει στις πηκτές μας (Flagellar hook-associated protein 3, spot 3).

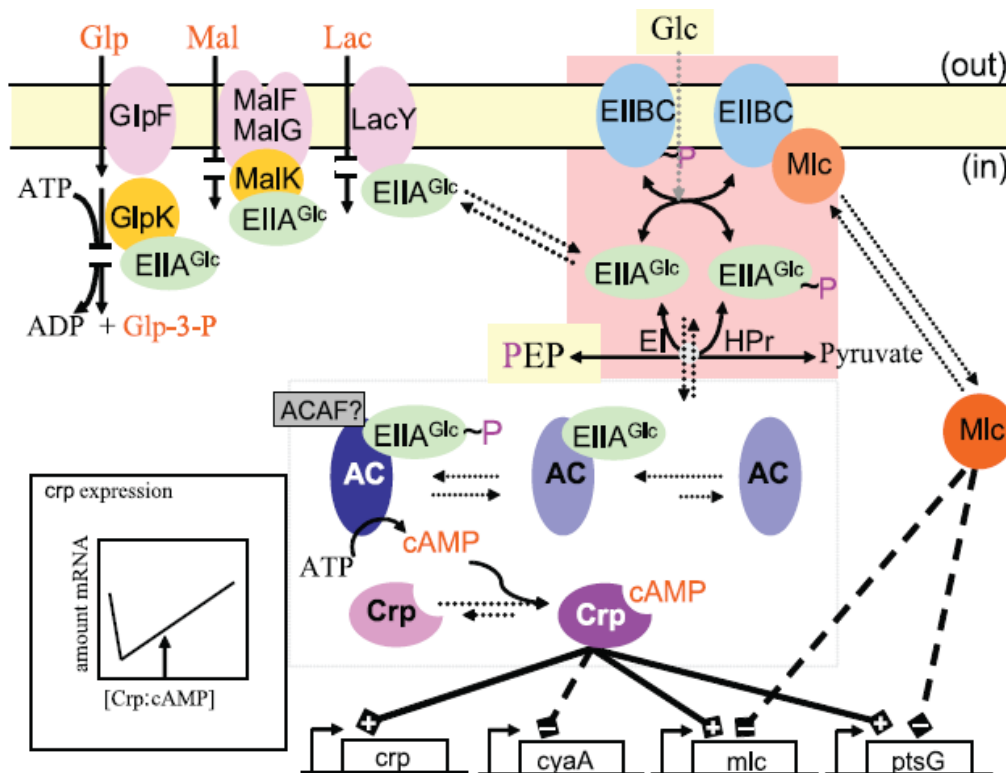


Εικόνα 3.8 Τα τέσσερα οπερόνια που ελέγχονται από τους προαγωγείς της κλάσης 2 και 3 για την κατασκευή των μαστιγίων στη σαλμονέλα. Περιλαμβάνεται και σημειώνεται με κόκκινο περίγραμμα το γονίδιο της μελετώμενης πρωτεΐνης flgL (HAP3).

Επίσης, από μελέτες έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον ένα μέρος της ρύθμισης των τεσσάρων οπερονίων από τις κλάσεις προαγωγέων 2 και 3 ρυθμίζεται ως μέρος απόκρισης του κυττάρου σε περιβαλλοντικές συνθήκες (Wozniak et al.,2010).

Πρωτεϊνική Κηλίδα 6:

Η πρωτεΐνη «Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component» ή αλλιώς Crr EIIA-Glc ανήκει όπως και η πρωτεΐνη του 1^{ου} spot στο σύστημα PTS και αφορά την μεταφορά γλυκόζης στο κυτόπλασμα με πιθανό ρόλο και σε αποκρίσεις του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες.



Εικόνα 3.9 Το σύστημα Pts και οι εμπλεκόμενες πρωτεΐνες και γονίδια.

Πρωτεϊνική Κηλίδα 7:

Η πρωτεΐνη «Bacterioferritin» ή αλλιώς Bfr έχει ως κυτταρικό ρόλο την μεταφορά και αποθήκευση σιδήρου. Επίσης συμμετέχει και στην προστασία του κυττάρου από στρες λόγω ακραίων ποσοτήτων σιδήρου στο περιβάλλον και συμμετέχει στη διασφάλιση της ομοιόστασης του σιδήρου στο κύτταρο.

Σύμφωνα με μελέτες (Velayudhan et al., 2007) η πρωτεΐνη Bfr έχει ως βιολογικό ρόλο και είναι υπεύθυνη στη *S. Typhimurium*:

- για την αποθήκευση του μεγαλύτερου ποσοστού σιδήρου στο κύτταρο
- για τον περιορισμό του ελεύθερου ενδοκυττάριου σιδήρου και
- για τη αύξηση της αντοχής του κυττάρου σε οξειδωτικά στρες.

Πρωτεϊνική Κηλίδα 10:

Η πρωτεΐνη «Purine nucleoside phosphorylase deoD-type» ή αλλιώς «PNP deoD-type» συμμετέχει στο σχηματισμό ελεύθερης πουρίνης και 1-φωσφορο-(δεοξυ)ριβόζης (Zalkin & Nygaard, 1996). Το ένζυμο αυτό εμπλέκεται στο μονοπάτι διάσωσης των πουρινών και στην αποικοδόμηση των νουκλεοσιδίων. Επίσης είναι απαραίτητο για την αφομοίωση των εξωγενών ελεύθερων βάσεων ή νουκλεοσιδίων από το περιβάλλον καθώς και για την επαναχρησιμοποίηση των βάσεων και των νουκλεοσιδίων που προέρχονται από τη διαδικασία ανακύκλωσης των νουκλεοτιδίων.

Σύμφωνα με μελέτη των Rallu et al. (2000) μεταλλάγματα (insertional mutants) του *Lactococcus lactis*, τα οποία επιδείκνυαν ανθεκτικότητα σε πολλαπλά στρες (pH, στατική φάση, θέρμανση και οξειδωτικό σοκ) είχαν υποστεί αλλαγές σε γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό πουρινών. Μεταλλάγματα για το γονίδιο *deoB*, το οποίο είναι τμήμα του οπερονίου *deoB-orfC-deoD*, επέδειξαν ανθεκτικότητα σε θερμικό σοκ. Το γονίδιο *deoD*, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη PNP, είναι μέλος του παραπάνω οπερονίου και σύμφωνα με τους Varcamonti et al. (2003) φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι θερμοκρασιακού στρες. Συγκεκριμένα μελέτες έδειξαν ότι η έλλειψη της PNP πρωτεΐνης, σε knock out μεταλλάγματα του *Streptococcus thermophilus*, τροποποιώντας τα επίπεδα των ppGpp (stringent response alarmone), συντελεί στην αύξηση επιβίωσης των κυττάρων έναντι θερμικού σοκ, ενώ συντελεί στη μειωμένη αντίδραση αυτών έναντι ψυχρού σοκ.

Πρωτεϊνική Κηλίδα 11:

Όσον αφορά στην κηλίδα 11 αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη «Ornithine carbamoyltransferase, catabolic», η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αργινίνης.

Η καταβολική ΟΤCάση καταλύει τη φωσφορόλυση της σιτροουλίνης, δίνοντας ορνιθίνη και carbamoylphosphate, ένα πρόδρομο μόριο του ATP στο μονοπάτι της arginine deiminase. Από τα βακτηριακά ένζυμα στο μεταβολισμό της αργινίνης, οι καταβολικές και αναβολικές ΟΤCασες, συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από άποψη ποικιλομορφίας όσον αφορά την τεταρτοταγή δομή και τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Αυτές οι συγκεκριμένες ιδιότητες των ενζύμων αυτών μπορεί να οφείλονται σε διαφορετική εξέλιξη από κοινό πρόγονο ή σε σύγκλιση εξαιτίας των παρόμοιων απαιτήσεων σε υποστρώματα (Kennedy et al., 1976, Falmagne et al., 1984).

Πρωτεϊνική Κηλίδα 13:

Η πρωτεϊνική κηλίδα 13 αφορά στην πρωτεΐνη «Phosphoserine aminotransferase» ή Phosphohydroxythreonine aminotransferase ή PSAT.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την PSAT είναι το *serC*. Το ένζυμο PSAT καταλύει μία αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σερίνης. Η σερίνη αυτή είναι αποτελεί μέρος ενός άλλου βιοσυνθετικού μονοπατιού για παραγωγή εντεροχελίνης. Η εντεροχελίνη εμπλέκεται στην πρόσληψη σιδήρου από το περιβάλλον. Οπότε το γονίδιο *serC* σε σύμπλοκο με ένα άλλο γονίδιο το *aroA* (οπερόνιο *serC-aroA*) ελέγχουν την παραγωγή εντεροχελίνης όταν εμφανιστούν συνθήκες έλλειψης σιδήρου για το κύτταρο (Dunkan & Coggins, 1986).

Πρωτεϊνική Κηλίδα 15:

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν έναν αριθμό μεμβρανικών πρωτεϊνών που ονομάζονται πορίνες και είναι ενσωματωμένες στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και δρουν σαν κανάλια υπεύθυνα για την διάχυση μικρών υδρόφιλων μορίων κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου (Nakae, 1976, Nikaido & Vaara, 1987).

Το *E.coli* και η *S.Typhimurium* έχουν δύο βασικές πορίνες, τις πρωτεΐνες OmpF και OmpC των οποίων η παραγωγή εξαρτάται από μία πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων όπως το ωσμωτικό δυναμικό του μέσου (Bassford et al., 1977), οι διαθέσιμες πηγές άνθρακα του θρεπτικού μέσου (Scott and Harwood, 1980) και η θερμοκρασία (Lundrigan and Earhart, 1984).

Οι πρωτεΐνες OmpC και OmpF βρέθηκαν αυξημένες κατά 30 φορές, σε σχέση με το φυσιολογικό, σε συνθήκες θερμικού στρες (47,5°C) κατά τη στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων (steady-state heat shock conditions) (Lüders et al., 2009).

Οι Mecsas et al. (1993) ταυτοποίησαν τις υπερεκφραζόμενες πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης OmpC και OmpF, ως επαγωγείς του παράγοντα σE. Ο παράγοντας σE (σ24, RpoE) παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση της *Salmonella Typhimurium* σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και σε οξειδωτικά στρες. Η έκφραση του ρυθμοζόνιου (regulon) σE επάγεται σε μεγάλο βαθμό από της είσοδο της σαλμονέλας στη στατική φάση ανάπτυξης. Επιπλέον η εξαγωγή των OMPs στον περιπλασμικό χώρο είναι απαραίτητη για την επαγωγή του παράγοντα σE, συνεπώς η υπερέκφραση των OMPs υποτέθηκε ότι παράγει ένα επαγωγικό για τον σE παράγοντα σήμα λίγο μετά τη διέλευση της από την εσωτερική μεμβράνη, ίσως σαν συνέπεια της συσσώρευσης αποδιατεταγμένων περιπλασμικών OMP πρωτεϊνών.

Αθροιστικά η ποσότητα των πρωτεϊνών OmpF και OmpC εντός του κυττάρου είναι σταθερή, αυτό που αλλάζει είναι η μεταξύ τους αναλογία ανάλογα με τις συνθήκες που βρίσκεται το κύτταρο. Θρεπτικά μέσα με χαμηλό ωσμωτικό δυναμικό, φτωχά σε πηγές άνθρακα και με χαμηλή θερμοκρασία αυξάνουν τα επίπεδα της OmpF και μειώνουν την OmpC. Αντίθετα θρεπτικά μέσα με υψηλό ωσμωτικό δυναμικό, πλούσια σε πηγές άνθρακα και με υψηλή θερμοκρασία μειώνουν τα επίπεδα της OmpF και αυξάνουν τα επίπεδα της OmpC.

Έχει αναφερθεί μικρή αύξηση της ανθεκτικότητας σε στελέχη τα οποία είχαν μειωμένα επίπεδα OmpF. Εξήγηση αυτού αποτελεί το γεγονός ότι η πορίνη OmpF έχει πόρο μεγαλύτερης διαμέτρου απ' ό τι η OmpC και είναι ευκολότερη η είσοδος των αντιβιοτικών στο εσωτερικό του κυττάρου. Γενικότερα η OmpC παράγεται σε περιβάλλον όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ η OmpF όταν στο περιβάλλον του κυττάρου τα θρεπτικά συστατικά είναι σε πιο διαλυτή μορφή (Nikaido & Vaara, 1987).

Η μεγαλύτερη διάμετρος της OmpF πορίνης μπορεί θεωρητικά να παίζει σημαντικό ρόλο στην αυξημένη ικανότητα των κυττάρων να αφομοιώνουν θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον μέσω της αύξησης της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης τους (Oezkanca & Flint, 2002).

Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες OmpC και OmpF έχουν πολύ σημαντικό ρόλο κατά την έκφραση μηχανισμών παθογένειας του κυττάρου της σαλμονέλας. Η OmpC φαίνεται να συμμετέχει επίσης στην μετοίκηση του βακτηρίου από το ένα επιθηλιακό κύτταρο στο άλλο κατά την παθογένεια, καθώς επίσης και στη θανάτωση του προσβεβλημένου κυττάρου (ξενιστή) (Bernardini et al., 1993).

Πρωτεϊνική Κηλίδα 21:

Αφορά στην πρωτεΐνη «Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ή GAPDH» που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gapA*.

Η πρωτεΐνη GAPDH είναι ενζύμο του γλυκολυτικού μονοπατιού το οποίο καταλύει την οξειδωση και τη φωσφορυλίωση της glyceraldehyde 3-phosphate σε 1,3-bisphosphoglycerate.

D-glyceraldehyde 3-phosphate + phosphate + NAD⁺ = 3-phospho-D-glyceroyl phosphate + NADH.

3.4 Συμπεράσματα - συζήτηση

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω παρατηρούμε πως η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ως διαφορές μεταξύ των τεσσάρων στελεχών εμπλέκεται σε μηχανισμούς – αποκρίσεις του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες ή τουλάχιστον σε περιβαλλοντολογικές μεταβολές (Πίνακας 3.8). Ειδικότερα για την κάθε μία πρωτεΐνη συνοπτικά έχουμε:

- Η πρωτεΐνη «Multiphosphoryl transfer protein» ανήκει στο σύστημα PTS και ειδικότερα στην υπεροικογένεια μεταφορασών γλυκόζης-φρουκτόζης-λακτόζης στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες του συστήματος PTS παίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο κατά την απόκριση του κυττάρου σε συγκεκριμένες συνθήκες στρες (pH, θερμοκρασία, ωσμωτικό δυναμικό) είναι πιθανή και η εμπλοκή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε αντίστοιχους

μηχανισμούς προσαρμογής καθώς η μελέτη μας περιελάμβανε ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε διάφορα pH και θερμοκρασίες.

- Η πρωτεΐνη «Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein» είναι μία περιπλασμική πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στο σύστημα μεταφοράς πολυαμινών (υποδοχέας) και συνεπώς συμβάλει στη ρύθμιση των επιπέδων των πολυαμινών στο κύτταρο. Οι πολυαμίνες συμμετέχουν σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες και επιταχύνουν την έκφραση γονιδιακών προϊόντων που προστατεύουν το κύτταρο έναντι διαφόρων στρεσογόνων συνθηκών.
- Η πρωτεΐνη «Flagellar hook-associated protein 3, FlgL» είναι απαραίτητη για την κατασκευή των μαστιγίων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης FlgL ανήκει σε ένα από τα τέσσερα οπερόνια που είναι απαραίτητα για την κατασκευή των μαστιγίων και των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται ως μέρος απόκρισης του κυττάρου σε περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Η πρωτεΐνη «Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component» όπως και η 1^η πρωτεΐνη ανήκει στο σύστημα PTS και ειδικότερα στην υπεροικογένεια μεταφορασών γλυκόζης-φρουκτόζης-λακτόζης στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου με αντίστοιχο βιολογικό ρόλο.
- Η πρωτεΐνη «Bacterioferritin» συμμετέχει στην μεταφορά και αποθήκευση σιδήρου στο κύτταρο. Επίσης έχει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό του ελεύθερου ενδοκυττάρου σιδήρου και συμμετέχει στην προστασία του κυττάρου από οξειδωτικά στρες διασφαλίζοντας την ομοιόσταση των επιπέδων του σιδήρου στο κύτταρο.
- Η πρωτεΐνη «Purine nucleoside phosphorylase deoD-type» εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πουρινών. Ειδικότερα εμπλέκεται στο μονοπάτι διάσωσης των πουρινών και στην αποικοδόμηση των νουκλεοσιδίων καθώς συμμετέχει στο σχηματισμό ελεύθερης πουρίνης και 1-φωσφορο-(δεοξυ) ριβόζης. Γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό πουρινών συμμετέχουν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας του κυττάρου σε πολλαπλά στρες (pH, στατική φάση, θέρμανση και οξειδωτικό σοκ). Το γονίδιο *deoD*, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη PNP, είναι μέλος του οπερονίου *deoB-orfC-deoD* και φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι θερμοκρασιακού στρες.
- Η πρωτεΐνη «Phosphoserine aminotransferase» καταλύει μία αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σερίνης η οποία αποτελεί μέρος ενός άλλου βιοσυνθετικού μονοπατιού για παραγωγή εντεροχελίνης. Η εντεροχελίνη

εμπλέκεται στην πρόσληψη σιδήρου από το περιβάλλον. Οπότε το γονίδιο *serC* που κωδικοποιεί για την PSAT σε σύμπλοκο με ένα άλλο γονίδιο το *aroA* (οπερόνιο *serC-aroA*) ελέγχουν την παραγωγή εντεροχελίνης όταν εμφανιστούν συνθήκες έλλειψης σιδήρου για το κύτταρο.

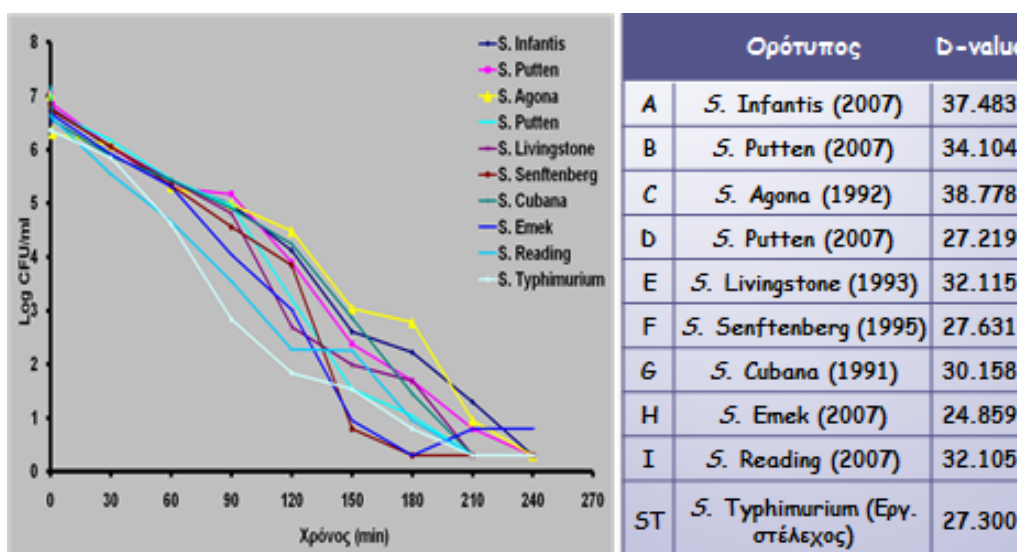
- Η πρωτεΐνη «Outer membrane protein C, OmpC» ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών που ονομάζονται πορίνες και είναι ενσωματωμένες στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και δρουν σαν κανάλια υπεύθυνα για την διάχυση μικρών υδρόφιλων μορίων κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης. Τα *E.coli* και *S.Typhimurium* έχουν δύο βασικές πορίνες, τις πρωτεΐνες OmpF και OmpC των οποίων η παραγωγή εξαρτάται από μία πληθώρα παραγόντων όπως το ωσμωτικό δυναμικό του μέσου, οι διαθέσιμες πηγές άνθρακα του θρεπτικού μέσου και η θερμοκρασία. Επίσης έχει βρεθεί ότι δρουν σαν επαγωγείς του παράγοντα σE (σ24, RpoE) (virulence alternative sigma factor σE) ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση της *S. typhimurium* σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και οξειδωτικά στρες. Θρεπτικά μέσα με χαμηλό ωσμωτικό δυναμικό, φτωχά σε πηγές άνθρακα και με χαμηλή θερμοκρασία αυξάνουν τα επίπεδα της OmpF και μειώνουν την OmpC. Αντίθετα θρεπτικά μέσα με υψηλό ωσμωτικό δυναμικό, πλούσια σε πηγές άνθρακα και με υψηλή θερμοκρασία μειώνουν τα επίπεδα της OmpF και αυξάνουν τα επίπεδα της OmpC. Η πορίνη OmpF έχει πόρο μεγαλύτερης διαμέτρου απ' ότι η OmpC και παράγεται όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι σε πιο διαλυτή μορφή ενώ η OmpC παράγεται σε περιβάλλον όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Στη συγκεκριμένη μελέτη παίζει μεγάλο ρόλο ο έλεγχος της διαπερατότητας των μεμβρανών των κυττάρων καθώς σχετίζεται άμεσα με τον τρόπο δράσης των οργανικών οξέων και την προσπάθεια επίτευξης ομοιόστασης του pH από μέρους του κυττάρου.

Είναι εμφανές λοιπόν πως οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση διαφέρει μεταξύ των τεσσάρων στελεχών που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη, συμμετέχουν σε μηχανισμούς του κυττάρου που αφορούν την προστασία του και την προσαρμογή του σε δυσμενείς συνθήκες (στρες) αλλάζοντας την φυσιολογία του και καθιστώντας το βραχυπρόθεσμα ή και μακροπρόθεσμα ανθεκτικό σε αυτές. Στους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβάνονται μηχανισμοί μεταφοράς κυτταρικών συστατικών μέσα στο

κύτταρο, των οποίων η λειτουργία μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες που βρίσκεται ο μικροοργανισμός, μηχανισμοί βιοσύνθεσης, μεταβολισμού και καταβολισμού μορίων και συστατικών του κυττάρου που και αυτοί ελέγχονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, μηχανισμοί που συμβάλουν στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ή την αποβολή τοξικών ουσιών, καθώς και μηχανισμοί που αφορούν τη δομή και διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης που ανάλογα με τις συνθήκες ρυθμίζουν την είσοδο και έξοδο πληθώρας μορίων.

Οι περισσότερες από τις παραπάνω πρωτεΐνες που αναφέρονται εντοπίστηκαν στο πήκτωμα του στελέχους 297 (*S. Putten*) ή τουλάχιστον σε αυτό τα επίπεδα παραγωγής τους ήταν υψηλότερα απ' ότι στα υπόλοιπα στελέχη. Υπενθυμίζουμε ότι το στέλεχος 297 παρουσίασε μία ελαφριά ανθεκτικότητα, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη, όταν αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα ΒΗΙ με προσθήκη φορμικού οξέος ενώ δεν ήταν τόσο ανθεκτικό σε υπόστρωμα με γαλακτικό οξύ. Στις ζωοτροφές από τις οποίες απομονώθηκαν τα συγκεκριμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκε κυρίως μίγμα φορμικού και προπιονικού οξέος για έλεγχο των παθογόνων.

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Manios et al., 2009) το στέλεχος 297 (*S. Putten*) όταν εκτέθηκε σε διάλυμα TSB με χαμηλό pH (3.5) ρυθμισμένο με φορμικό ή προπιονικό οξύ συγκαταλέχθηκε στα ανθεκτικότερα μεταξύ των δέκα στελεχών.



Εικόνα 3.11 Συμπεριφορά των στελεχών σαλμονέλας κατά την έκθεση τους σε διάλυμα TSB με pH 3.5 ρυθμισμένο με (φορμικό) μυρμηκικό οξύ. Σημειώνεται με κόκκινο βέλος το στέλεχος 297, (Manios et al., 2009).

Συμπέρασμα αυτού του γεγονότος είναι ότι ίσως το στελέχος 297 έχει αναπτύξει σε ένα βαθμό ανθεκτικότητα στη χρήση του φορμικού οξέος, γεγονός που φαίνεται και στην παρούσα μελέτη, ως μέσο εξυγίανσης των ζωοτροφών, ενώ στο γαλακτικό οξύ, το οποίο δεν χρησιμοποιείται ευρέως για την καταπολέμηση των παθογόνων στις ζωοτροφές, δεν είναι τόσο ανθεκτικό. Αυτή η συμπεριφορά του στελέχους 297 συγκριτικά με τα υπόλοιπα υπό μελέτη στελέχη, φαίνεται να αντικατοπτρίζεται σε ένα βαθμό και στο πρωτεϊνικό του προφίλ.

Το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 3.11) προέρχεται από τη μελέτη των Manios et al., (2009), όπου το pH του μέσου ρυθμιζόταν με προσθήκη του υπό μελέτη οργανικού οξέος. Θα πρέπει να αναφερθεί όμως ότι στην παρούσα εργασία η οποία αφορά τη μελέτη της ανθεκτικότητας των συγκριμένων στελεχών σαλμονέλας σε θρεπτικό μέσο που περιείχε οργανικά οξέα (φορμικό και γαλακτικό), το pH του μέσου ρυθμιζόταν με προσθήκη HCl ή NaOH. Συνεπώς ο στόχος ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας των στελεχών έναντι των οργανικών οξέων σε διάφορα pH του θρεπτικού μέσου. Όσον αφορά λοιπόν την συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη θα πρέπει να σημειώσουμε ότι οι διαφορές στην ανάπτυξη μεταξύ των στελεχών παρ' όλο που υπήρχαν, ήταν αρκετά μικρότερες συγκριτικά με τα αποτελέσματα των προηγούμενων αυτών μελετών.

Όμως, λαμβάνοντας υπόψη μας και τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης καθώς και τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αφορούσαν τα συγκεκριμένα στελέχη είμαστε επιφυλακτικοί για το κατά πόσον οι συγκεκριμένες συνθήκες-εμπόδια στις οποίες εξετάστηκαν τα στελέχη ήταν δυνατόν να μας δώσουν εμφανείς διαφορές οι οποίες να αντικατοπτρίζουν τις διαφορές που εντοπίσαμε στα πρωτεϊνικά προφίλ τους. Δηλαδή, είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δέκα στελεχών που αφορούν στην ανθεκτικότητα τους σε όξινες συνθήκες και οργανικά οξέα αλλά να μην είναι εύκολο να γίνουν φαινοτυπικά αντιληπτές. Είναι δυνατό επίσης να είναι αρκετά ειδικές και συγκεκριμένες οι συνθήκες επώασης στις οποίες οι διαφορές στη συμπεριφορά – ανάπτυξη των στελεχών είναι σε άμεση συνάρτηση με τις διαφορές στα πρωτεϊνικά προφίλ τους. Απαιτείται λοιπόν περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων στελεχών όσον αφορά το πρότυπο ανάπτυξής τους σε άμεση συνάρτηση με το πρωτεϊνικό προφίλ τους.

Παραδείγματος χάριν, για να είναι δυνατή η συσχέτιση των διαφορετικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των στελεχών με τις διαφορές στο πρωτεϊνικό τους προφίλ είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση μελετών με μεταλλαγές συγκεκριμένων

γονιδίων (knock out) σε συγκεκριμένα στελέχη και εν συνεχεία μελέτη της ανάπτυξης τους και της εμφάνισης κάποιας ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένες συνθήκες ώστε να είναι ξεκάθαρος και αδιαμφισβήτητος ο συσχετισμός μεταξύ πρωτεϊνών (εύρεση του κυτταρικού ρόλου της πρωτεΐνης) και χαρακτηριστικών ανάπτυξης-ανθεκτικότητας.

Όλα τα παραπάνω που αφορούν τη μελέτη του πρωτεϊνικού προφίλ των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας είναι μείζονος σημασίας λόγω του ενδιαφέροντος «φαινοτύπου» (μοτίβο ανάπτυξης) που παρουσιάζουν τα στελέχη αυτά.

Όσον αφορά λοιπόν στο κομμάτι της φαινοτυπικής ανάλυσης (ανάπτυξη ή μη ανάπτυξη) παρατηρείται πως στις θερμοκρασίες των 25 °C και 20 °C το γαλακτικό οξύ προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών σαλμονέλας σε αρκετά μεγάλο βαθμό, ανάλογα με την συγκέντρωση στην οποία προστίθεται. Αντίθετα, το φορμικό οξύ στα αντίστοιχα θερμοκρασιακά καθεστώτα προκαλεί πολύ μικρότερη αναστολή της ανάπτυξης. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο και σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες που αφορούν την αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων και ειδικότερα τη σύγκριση μεταξύ γαλακτικού και φορμικού οξέος όπου το γαλακτικό οξύ είναι ισχυρότερο αντιμικροβιακά, σε τιμές pH μεταξύ 4,0-5,0, από το φορμικό (Chaveerach et al., 2002, Overland et al., 2007, Schnürer and Magnusson, 2005). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη pKa που έχει το γαλακτικό συγκριτικά με το φορμικό οξύ.

Organic acid	Formula	pK _a
Acetic acid	CH ₃ COOH	4.76
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	4.20
Butyric acid	C ₄ H ₈ O ₂	4.83
Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	4.44
Formic acid	CH ₂ O ₂	3.75
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	4.41
Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	3.83
Propionic acid	C ₃ H ₆ O ₂	4.87
Pyruvic acid	C ₃ H ₄ O ₂	2.39
Sorbic acid	C ₆ H ₈ O ₂	4.76

Εικόνα 3.11 Οργανικά οξέα με τους αντίστοιχους μοριακούς τύπους και τις pKa τους.

Αντίθετα με το πρότυπο δράσης του γαλακτικού και του φορμικού οξέος στην θερμοκρασία των 25 °C και 20 °C, στους 15 °C και 10 °C αντιστρέφεται η κατάσταση, το φορμικό οξύ έχει εντονότερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών απ' ότι το γαλακτικό οξύ. Το γεγονός αυτό αποτελεί θέμα περαιτέρω μελέτης και συζήτησης.

Το γαλακτικό οξύ, καθώς είναι λιγότερο λιποδιαλυτό, διαχέεται και διαπερνά με αργούς ρυθμούς και δυσκολότερα την κυτταρική μεμβράνη από το φορμικό οξύ. Οπότε, η δράση του γαλακτικού οξέος δεν βασίζεται κυρίως στην διαταραχή του ενδοκυττάρου pH (Gravesen et al., 2004) σε αντίθεση με το φορμικό οξύ όπου λόγω του μικρού μεγέθους του (HCOOH) είναι ευκολότερο να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να προκαλέσει οξύνιση του κυτοπλάσματος.

Παρόλο που η αδιάστατη μορφή του οξέος είναι αυτή που έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών, μελέτες έχουν δείξει ότι το σύνολο της ανασταλτικής δράσης των οργανικών οξέων εξαρτάται από το συνδυασμό της δράσης της αδιάστατης μορφής του οξέος καθώς και της δράσης των δισταμένων ιόντων του (Ray, 1992, Lück and Jager, 1997, Taniguchi et al., 1998).

Έχοντας υπόψη μας τον τρόπο δράσης των οργανικών οξέων καθώς και ότι από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνεται η περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, όντας ευκολότερη η διάχυση μορίων μέσω των πόρων της στο κυτόπλασμα (Chikthimma et al., 2003) ίσως είναι εφικτό να δοθούν κάποιες πιθανές εξηγήσεις για το πρότυπο δράσης του φορμικού οξέος στις χαμηλές θερμοκρασίες των 15 και 10 °C.

Στις υψηλές θερμοκρασίες όπως ήδη αναφέρθηκε, το γαλακτικό οξύ έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από το φορμικό οξύ, το οποίο δεν προκαλεί τόση ζημιά στο κύτταρο στις υψηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα στις χαμηλές θερμοκρασίες η δράση του γαλακτικού οξέος περιορίζεται συγκριτικά με αυτή του φορμικού οξέος. Το αδιάστατο μόριο του γαλακτικού οξέος δεν μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο σε αντίστοιχο ποσοστό όπως στις υψηλότερες θερμοκρασίες, λόγω του ότι είναι μικρότερη η διάμετρος των πόρων της μεμβράνης στις χαμηλές θερμοκρασίες, έτσι προκαλείται μία αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού που είναι συνάρτηση της δράσης του γαλακτικού οξέος και της χαμηλής θερμοκρασίας επώασης. Όσον αφορά στο φορμικό οξύ όμως, λόγω του ότι είναι το μικρότερο οργανικό οξύ, μπορεί εύκολα να εισέλθει διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτόπλασμα του κυττάρου ακόμα και στις χαμηλές θερμοκρασίες που έχει μειωθεί η περατότητας της

μεμβράνης, προκαλώντας διαταραχή του ενδοκυττάρου pH γεγονός το οποίο σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία που λειτουργεί σαν ένα επιπλέον εμπόδιο προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Ίσως λοιπόν, στη χαμηλή θερμοκρασία το κύτταρο δεν έχει την απαραίτητη ενέργεια υπό μορφή ATP, λόγω του ότι καταναλώνει ενέργεια για να ανταπεξέλθει και στο εμπόδιο της θερμοκρασίας, ώστε να μπορεί να αποβάλει την περίσσεια πρωτονίων και να εξισορροπήσει το ενδοκυττάριο pH του όπως στις υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι τελικά στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (15 και 10 °C) το φορμικό οξύ φαίνεται να έχει μία αρκετά ισχυρή ανασταλτική δράση ως προς την ανάπτυξη των βακτηρίων σαλμονέλας και συνεπώς παρουσιάζεται ισχυρότερο αντιμικροβιακά από το γαλακτικό οξύ. Όλα τα παραπάνω αποτελούν πιθανές υποθέσεις και για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται περαιτέρω μελέτη και συγκριτική ανάλυση της δράσης των δύο αυτών οξέων σε πληθώρα συνθηκών ανάπτυξης, εύρεση του τρόπου επίδρασής τους στη φυσιολογία των μικροοργανισμών καθώς και μελέτη της προέλευσης των μελετώμενων στελεχών και των εφαρμογών καταπολέμησης (μεταχειρίσεων) τις οποίες έχουν υποστεί.

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς και την προέλευση των στελεχών σαλμονέλας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή (στελέχη απομονωμένα σε βάθος χρόνου δέκα ετών από ζωοτροφές, τα οποία είχαν επιβιώσει παρ' όλες τις εξυγιάνσεις-μεταχειρίσεις που είχαν εφαρμοστεί) συμπεραίνεται ότι πιθανόν η εφαρμογή των οξέων για εξυγίανση των ζωοτροφών δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική, δεδομένου ότι ιδιαίτερη σημασία πέρα από το άμεσο αποτέλεσμα της καταπολέμησης των παθογόνων μικροοργανισμών έχει και η αποφυγή δημιουργίας μακροπρόθεσμα ανθεκτικών στελεχών.

Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων στελεχών σαλμονέλας δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση των όξινων και θερμικών μεταχειρίσεων για την εξυγίανση των ζωοτροφών και τη μείωση του κινδύνου επιβίωσης της σαλμονέλας, καθώς επίσης και για την αποφυγή εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών. Με τον τρόπο αυτό τελικά, θα ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ύπαρξης σαλμονέλας σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ως εκ τούτου θα μειωθεί και ο κίνδυνος προσβολής του τελικού καταναλωτή.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelal, A.T.H., Kennedy, E.H. and Nainan, O., 1976. Ornithine Transcarbamylase from *Salmonella typhimurium*: Purification, Subunit Composition, Kinetic Analysis, and Immunological Cross-Reactivity.

Anderson NL, Anderson NG, 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19 (11): 1853–61. doi :10.1002/elps.1150191103

Anonymous, 1999. Trends and Sources of Zoonotic Agents in Animals, Feedingstuffs, Food and Man in the European Union and Norway. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Anonymous, 2000. Salmonella in pork (SALINPORK). Preharvest and harvest control options based on epidemiologic, diagnostic, and economic research. Final Report. FAIR1 CT95- 0400. The Royal Veterinary and Agricultural University, Frediksberg, Denmark, and Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark.

Anonymous, 2000. Salmonella in pork (SALINPORK). Preharvest and harvest control options based on epidemiologic, diagnostic, and economic research. Final Report. FAIR1 CT95- 0400. The Royal Veterinary and Agricultural University, Frediksberg, Denmark, and Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark

Anderson, R.J., House, J.K., Smith, B.P., Kinde, H., Walker, R.L., Vande Steeg, B.J., Breitmeyer, R.E., 2001. Epidemiologic and biological characteristics of Salmonellosis in three dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 310–312.

Bassford, P. J., Diedrich, D. L., Schnaitman, C. A. and Reeves, P., 1977. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*.VI. Protein alterations in bacteriophage-resistant mutants. *J. Bacteriol.* 137:608-622

Batsos A., 2009. Συμπεριφορά παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες οξύτητας και αλατότητας περιβάλλοντος ζυμούμενων προϊόντων. Μεταπτυχιακή μελέτη, ΓΠΑ Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Beal, J.D., Niven, S.J., Campbell, A., Brooks, P.H., 2002. The effect of temperature on the growth and persistence of Salmonella in fermented liquid pig feed. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 99– 104.

Belle Archana, Tanay Amos, Bitincka Ledion, Shamir Ron and O’Shea Erin K., 2006. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *PNAS* 103 (35): 13004–13009.

Berends, B.R., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., van Knapen, F., 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 37– 53.

Bergeim O. Toxicity of intestinal volatile fatty acids for yeast and Esch. coli. *J Infect Dis* 1940;66:222–34.

Bernardini, M.L., Sanna, M.G., Fontaine, A. and Sansonetti, P.J., 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by Shigella flexneri. *Infect. Immun.* 61, 3625-3635.

Blackman, J., Bowman, T., Chambers, J., Kisilenks, J., Parr, J., St. Laurent, A.M., Thompson, J., 1992. Controlling salmonella in livestock and poultry feeds. Report of Agriculture Canada and Canadian Feed Associates.

Blackstock WP, Weir MP, 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17 (3): 121–7. doi: 10.1016/S0167-7799(98) 01245-1

Blankenhorn, D., Phillips, J. and Slonczewski, J. L., 1999. Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of Escherichia coli revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 181:2209–2216

Boyer, C.L., Narotsky, S., Brunder, D.W., Brown, J.A., 1962. Salmonellosis in turkeys and chickens associated with contaminated feed. *Avian Dis.* 6, 43–50

- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D.A., Urlings, H.A., Lipman, L.J., and Van, K.F., 2002. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science* 81:621–628.
- Chikthimmah, N., LaBorde, L.F., and Beelman, R.B., 2003. Critical factors affecting the destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider treated with fumaric acid and sodium benzoate. *Journal of Food Science* 68:1438–1442.
- Chilcott, G. S., and Hughes, K. T., 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:694–708., Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77–100
- Clark, G., Gangarosa, A.F.K.J., Thompson, M., 1973. Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. *The Lancet* 302, 490–493.
- Coleman S.W., Moore J.E., 2003. Feed quality and animal performance. *Field Crop Research*, 30, 17–29.
- Davies, R.H., 1992. *Salmonella*: the feedstuffs connection. *Proceedings of the Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Edinburgh, 13 April, pp. 47–59.
- Davies, R., Breslin, M., Corry, J.E., Hudson, W. and Allen, V.M., 2001. Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. *Vet Rec* 149, 227–232.
- Davies, R., Wray, C., 1996. Persistence of *Salmonella Enteritidis* in poultry units and poultry food. *British Poultry Science* 37, 589–596.
- Davis, M.A., Hancock, D.D., Rice, D.H., Call, D.R., DiGiacomo, R., Samadpour, M., Besser, T.E., 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* 95, 199–210.
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P.,2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* 2008;2:19–26.

Doyle M., Beuchat L., Montville T., 2001. Food Microbiology . Fundamentals and frontiers 2nd ed. American Society for Microbiology.5, 129-158 & 305-326.

Duché, O., Tremoulet, F., Glaser, P. and Labadie. J., 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1491–1498

Duncan, K. and Coggins, J., 1986. The serC-aroA operon of *Escherichia coli* A mixed function operon encoding enzymes from two different amino acid biosynthetic pathways. *Biochem. J.*, 234, 49-57 (Printed in Great Britain)

Durand, A., Giesecke, W., Barnard, M., van Der Walt, M., Steyn, H., 1990. *Salmonella* isolated from feeds and feed ingredients during the period 1982–1988: animal and public health implications. *Journal of Veterinary Research* 57, 175–181.

EFSA, 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, 96.

EFSA, 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuff for food producing animals. *The EFSA Journal*, 720.

EFSA, 2009a. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from European Commission on quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal*, 1036.

EFSA, 2009b. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 223, 1–232.

EU, 2002a. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and the Council of 28 January 2003, laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities*, L31, 1–24.

EU, 2002b. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. Official Journal of the European Communities, L140, 10–22.

EU, 2005. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 18 September 2003, laying down the requirements for the hygiene of animal feeds. Official Journal of the European Community, L268, 1–22.

Falmagne, P., Portetelle, D. and Stalon, V., 1984. Immunological and Structural Relatedness of Catabolic Ornithine Carbamoyltransferases and the Anabolic Enzymes of Enterobacteria.

Feed marketing and distribution. Feedstuffs 2001; 73:6–10.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT nutrition data. Available at: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=nutrition>. Accessed June 2002.

Fournier, M. L., Gilmore, J. M., Martin-Brown, S. A., Washburn, M. P., 2007. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. Chem. Rev. 107 (8):3654–86.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F, 2006. Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Appl Environ Microbiol 72:946–9.

Graumann, P., and Marahiel, M. A., 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. Arch. Microbiol. 166:293–300.

Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B.B., and Knochel, S., 2004. Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D- and L-lactic acid. Letters in Applied Microbiology 39:528–532.

Groisman, E. A. and Ochman H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. Trends Microbiol 5(9):343–349.

- Harris, I.T., Fedorka-cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A., Ferris, K., 1997. Prevalence of Salmonella organisms in swine feed. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 382– 385.
- Hengge-Aronis, R., 1996. Back to log phase: σ s as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887-893.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R., 2002. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology and Infection* 129, 1–8.
- Hinton, M., Linton, A.H., 1988. Control of Salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *Vet. Rec.* 123, 416– 421.
- Holt J. G., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.
- Holt J. G., 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 310-328 & 551-563.
- Hoszowski, A., Osek, J., Kwiatek, K., Wasyl, D., Wieczorek, K., Kukier, E., Skarzynska, M., Szwarc, M., Wnuk, D., Lalak, A., Goldsztejn, M. 2008. Monitoring of foodstuff of animal origin and animal feedingstuff for Salmonella presence. Monograpgy issued by NVRI, Pulawy, Poland.
- Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H, 2007. Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis--a review. *Anal. Chim. Acta* 598 (2): 193–204.
- Hurst, J.L., Ward, W.R., 2001. Rats and mice and animal feed—a risk too far? *Vet. J.* 162/163, 163–165.
- Flachowsky G., Danicke S., 2005. From feed to safe food –contribution of animal nutrition to the safety of food. In: *New Developments in Food Policy, Control and Research* ed. Riley A.P. pp. 65–96, Nova Science Publications, New York.
- Fedorka-Cray, P.J., Hogg, A., Gray, J.T., Lorenzen, K., Velasquez, J., Von Behren, P., 1997. Feed and feed trucks as sources of Salmonella contamination in swine. *Swine Health Prod.* 5-5, 189–193.

Fox, M.D., 1974. Recent trends in salmonellosis epidemiology. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165, 990–993.

Frees, D., Vogensen, F. K. and Ingmer, H., 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 87:293–300.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F., 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 72:946–9.

Groisman, E. A. and Ochman H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5(9):343–349.

Hacking, W., Mitchell, W., Carlson, H., 1978. *Salmonella* investigation in an Ontario feed mill. *Canadian Journal Compendium Medicine* 42, 400–406.

Hansen, I.D., Israelsen, M., 1998. Quantitative HACCP for *Salmonella* spp. in a feed production. 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, Germany, 7–12 June, vol. 1, pp. 1021–1025.

Harris, I.T., Fedorka-cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A., Ferris, K., 1997. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 382– 385.

Hengge-Aronis, R., 1996. Back to log phase: σ s as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887–893.

Hinton, M.H., 2002. Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *Vet. J.* 159, 124–138.

James, P., 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* 30 (4): 279–331. doi: 10.1017/S0033583597003399.

Jones, P.W., Collins, P., Brown, G.T., Aitken, M., 1982. Transmission of *Salmonella mbandaka* to cattle from contaminated feed. *J. Hyg. (Lond.)* 88, 255–263.

- Kan C.A., Meijer G.A.L., 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 84–108.
- Kashiwagi, K., Pistocchi, R., Shibuya, S., Sugiyama, S., Morikawa, K., Igarashi, K., 1996. Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 271, 12205–12208
- Kaufmann, A. F., 1966. Pets and *Salmonella* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149, 1655–1661
- Keller L, Surette MG., 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4:249–58.
- Kohler, B., 1992. Epidemiology of *Salmonella* infections in animals and importance of alternative processes for their control. *Proceedings of the Third World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, Bd., vol. II, pp. 1046.*
- Korsak, N., Jacob, B., Groven, B., Etienne, G., China, B., Ghafir, Y., Daube, G., 2003. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an untegrated pig production system. *J. Food Prot.* 66 (7), 1127–1133
- Koyuncu, S., Haggblom, P., 2009. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BMC Veterinary Research* 5, 6.
- Kranker, S., Dahl, J., Wingstrand, A., 2001. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. *Berl. Mqnch. Tier7rztl. Wochenschr.* 114, 350–352.
- Kutsukake, K., and Ide, N., 1995. Transcriptional analysis of the *flgK* and *fliD* operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins. *Mol. Gen. Genet.* 247:275–281
- Kutsukake, K., Ohya, Y. and Iino. T., 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172:741–747.

- Han K-Y, Seo H-S, Song J-A, Ahn K-Y, Park J-S, Lee J., 2007. Transport proteins PotD and Crr of *Escherichia coli*, novel fusion partners for heterologous protein expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1774, 1536–1543
- Legan, J., Vandeven, M., Dahms, S., Cole, M., 2001. Determining the concentration of microorganisms controlled by attributed sampling plans. *Food Control* 12, 137–147.
- Lüders, S., Fallet, C. and Franco-Lara, E., 2009. Proteome analysis of the *Escherichia coli* heat shock response under steady-state conditions. *Proteome Science*, 7:36 doi:10.1186/1477-5956-7-36
- Lück, E. and Jager, M., 1997. Antimicrobial action of preservatives. In: *Antimicrobial Food Additives*, pp. 36–57. Berlin: Springer.
- Lundrigan, M. D. and Earhart. C. F., 1984. Gene envY of *Escherichia coli* K-12 affects thermoregulation of major porin expression. *J. Bacteriol.* 157:262-268.
- Macnab, R. M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77–100
- Maciorowski, K., Herrera, P., Kundinger, M., Ricke, S., 2006. Animal feed production and contamination by foodborne *Salmonella*. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 1, 197–2009.
- Malmqvist, M., Jacobsson, K.G., Häggblom, P., Cerenius, F., Sjöland, L., Gunnarsson, A., 1995. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1988– 1992. *Acta Veterinaria Scandinavica* 36, 21–39
- McCapes, R., Ekperigin, H., Cameron, W., Richie, W., Slagter, J., Stangeland, V., Nagaraja, K., 1989. Effect of a new pelleting process on the level of contamination of poultry mash by *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Avian Diseases* 33, 103–111.
- Mc Chesney, D.G., Kaplan, G., Gardner, P., 1995. FDA Survey determines *Salmonella* contamination. *Feedstuffs* 13, 20– 23. (Feb.).

Mecenas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.W., Donohue, T.J., Gross, C.A., 1993. The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigmafactor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & Development*, 7:2618-2628.

Nakae, T. 1976. Identification of the major outer membrane protein of Escherichia coli that produces transmembrane channels in reconstituted membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:877-884.

Nesvizhskii, A. I., 2007. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol. Biol.* 367: 87–119.

Neumann, E.J., Kniffen, T.S., 1999. Clinical salmonellosis related to contaminated feedstuffs in a large swine production system. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, 5–7 August 1999, Washington, USA*, pp. 158– 168.

Nielsen, B., Wegener, H.C., 1997. Public health and pork products: regional perspectives of Denmark. *Rev. Sci. Tech.-Off. Int. E' pizoot.* 16, 513– 524.

Nikaido, H. and Vaara, M., 1987. Outer membrane, p. 7-22. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular- biology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Oezkanca, R., Flint, K.P., 2002. The effect of starvation stress on the porin protein expression of Escherichia coli in lake water. *Letters in Applied Microbiology*, 35:533-537.

Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A., 1996. Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(15):7800–7804.

Oosterom, J., 1984. Assessment of Salmonella contamination in the pig industry and proposed measures for the production of Salmonella-free pigs. In: Errebro Larsen, H. (Ed.), *Priority Aspects of Salmonellosis Research. A Workshop in the EEC Programme of Coordination of Agricultural Research*, Brussels, Belgium, 11–13 October 1983. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.

Overland, M., Kjos, N.P., Borg, M., and Sørum, H., 2007. Organic acids in diets for entire male pigs. *Livestock Science* 109:170–173.

Paramithiotis, S., Pappa, A.M., Drosinos, E.H. & Zoiopoulos, P.E. 2009. Microbiological, physico-chemical and safety parameters of cereal-based animal diets. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* ISSN 1757-8361.

Park, Yong-K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W., 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 20, 605-611.

Pegg, A.E., 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy, *Cancer Res.* 48, 759–774.

Petersen U., Flachowsky G., 2004. A positive list of feedstuffs as a contribution to feed safety: expectations, concepts and solutions. FAL Agricultural Research, Special Issue 271, Braunschweig, Germany.

Primm, N.D., 1998. Field experiences with the control of Salmonellae introduction into turkey flocks via contaminated feeds. *Proc. Western Poult. Dis. Conf.* 47, 27–29.

Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich., S. D. and Maguin. E., 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol. Microbiol.* 35:517–528.

Ray, B., 1992. Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In: *Food Preservatives of Microbial Origin*. B. Ray and M. Daeschel (Eds.), pp. 103–136. Boca Raton, FL: CRC Press.

Richardson, K., Weiss, D., 2000. Control of Salmonella and other pathogens in animal feed. *Proc. Western Poult. Dis. Conf.* 49, 53–57.

Roberts, T., Ahl, A., McDowell, R., 1995. Risk assessment for foodborne microbiological hazards. In: *In Tracking Foodborne Pathogens from Farm to Table*. USDA Miscellaneous Publication No. 1532, Washington, pp. 95–115.

Rouse, J., Rolow, A., Nelson, C.E., 1988. Effect of chemical treatment of poultry feed on survival of Salmonella. *Poult. Sci.* 67, 1225– 1228.

- Schnürer, J. and Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology* 16:70–78.
- Schwartz, K.J., 1999. Salmonellosis. In: Straw, B.E., D’Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Science, Oxford, pp. 535–551.
- Scott, N. and Harwood. C., 1980. Studies on the influence of the cyclic AMP system on major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:95-98.
- Shapcott, R-C., 1984. Practical aspects of salmonella control. Progress report on a programme in a large broiler integration. In: Snocyenbos, G.H. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on salmonella*. American Association of Avian Pathology, Kennett Square, PA, USA, pp. 109-114.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W., 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2593–2597.
- Smulders F.J.M., Kainz R., Weijtens M.J.B.M., 2006. The new EU legislation on food control and how veterinarians fit in. In: *Towards a Risk Based Chain Control* ed. Smulder F.J.M. pp. 201–226, Wageningen Academic Publishers, the Netherlands.
- Sofos J.N., 2006. Field data availability and needs for use in microbiological risk assessment. In: *Towards a Risk Based Chain Control* ed Smulder F.J.M. pp. 57–74, Wageningen Academic Publishers, the Netherlands.
- Soutourina, O. A., and Bertin, P. N., 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:505–523.
- Sreenivas, P.T., 1990. Pressure and temperature are effective tools in battle against *Salmonella*. *Feed Tech.* 3, 17–19.
- Tabor, C.W., Tabor, H., 1988. Polyamines, *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749–790.
- Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., and Tanaka, T. 1998. Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by

co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62:1522–1527.

Taylor, W.I. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 44:471-475.

Vanderwal, P., 1979. Salmonella control by pelleting or acid treatment. *World Poult. Sci.* 35, 70– 78.

van der Wolf, P.J., Bongers, J.H., Elbers, A.R., Franssen, F.M., Hunneman, W.A., van Exsel, A.C., Tielen, M.J., 1999. Salmonella infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 67, 263– 275.

Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Velge P, Bottreau E, Fievez V, Haesebrouck F, Ducatelle R., 2003. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *Int J Food Microbiol* 85:237–48

van Winsen, R.L., Snijders, J.M.A., Urlings, H.A.P., 1999. Lactic acid and acetic acid reduce *Salmonella* in fermented pig feed. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, 5–7 August 1999, Washington D.C., USA*, pp. 290–291.

Varcamonti, M., Graziano, M.R., Pezzopane, R., Naclerio, G., Arsenijevic, S. and Felice, M.D., 2003. Impaired Temperature Stress Response of a *Streptococcus thermophiles deoD* Mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1287–1289

Vassos D. V., 2004. *Foods & health of the consumer. Food disturbances.* 1st ed Papasotiriou (Athens), 39-68.

Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L. and Fang, F.C., 2007. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol* 63:1495-507

Varcamonti, M., Graziano, M.R., Pezzopane, R., Naclerio, G., Arsenijevic, S., and De Felice M., (2003). Impaired Temperature Stress Response of a *Streptococcus thermophiles deoD* Mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1287–1289.

Von Altrock, A., Schutte, A., Hildebrandt, G., 2000. Results of the German investigation in the EU Project Salmonella in Pork (Salinpork)Q: 2. Investigations in a slaughterhouse.. *Wochenschr.* 113, 225– 233.

Wagner, D., 2004. Microbiological data summary from FDA feed commodity surveys. CDC, Animal FeedWorkshop Presentation.

Whyte, P., McGill, K., Collins, J.D., 2002. A survey of the prevalence of Salmonella and other enteric pathogens in a commercial poultry feed mill. *Journal of Food Safety* 23, 13–24.

Wilkins M., R., Pasquali C., Appel R., D., Ou K., Golaz O., Sanchez J., Yan J.,X., Gooley A., A., Hughes G., Humphery, S.,I., Williams K., L. & Hochstrasser D., F., 1996. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nature Biotechnology* 14 (1): 61–65.

Williams, J.E., 1981. Salmonella in poultry feeds a world-wide review. *World's Poult. Sci. J.* 37, 97– 105.

Wozniak, C. E., Chevance, F. V. and. Hughes, K. T.,2010. Multiple Promoters Contribute to Swarming and the Coordination of Transcription with Flagellar Assembly in Salmonella. *Journal Of Bacteriology*, Sept. 2010, p. 4752–4762

Zalkin, H. and Nygaard, P., 1996. Biosynthesis of purine nucleotides, p. 561–579. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schachter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C

