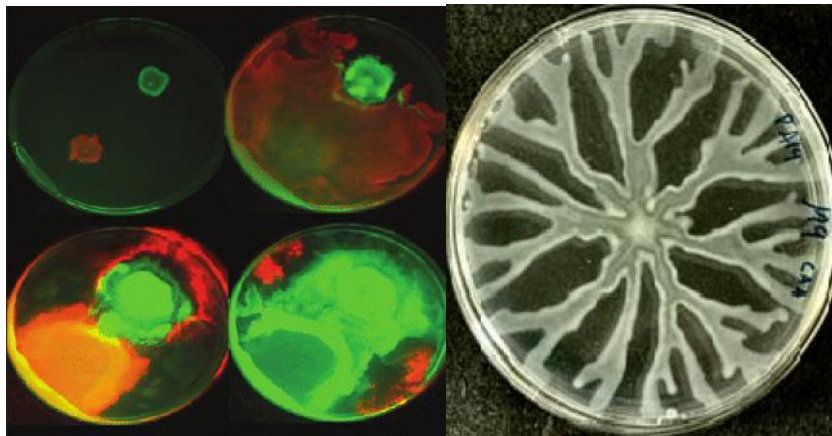




ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Μοριακή Οικολογία & Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών



*Pseudomonas aeruginosa*: swarming κινητικότητα

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑ :** Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα των φυτών της τομάτας.

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΑΘΗΝΑ 2013

Η ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕ ΘΕΜΑ: «Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας.», ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΣΥΝΕΛΕΥΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ (3<sup>Η</sup>/08-11-2012) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ. Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΣΕΣ (20<sup>Η</sup>/5-7-2011) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών 'ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ'.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκουρος Καθηγήτρια

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κατινάκη Παναγιώτη για την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας. Όπως επίσης για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, και για την επίλυση διαφόρων θεμάτων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Π. Παπαμελετίου για την πολύτιμη βοήθεια της, την καλή της διάθεση και την στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και την Επίκουρο καθηγήτρια κ. Ταμπακάκη Αναστασία για τον συμβουλευτικό τους ρόλο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου την Dr A. Βενιεράκη και την Dr M. Δήμου για τις συμβουλές και την βοήθεια τους στην εκτέλεση των πειραμάτων και την συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα στενά μέλη της οικογενείας μου για την βοήθεια τους, την υπομονή και την συνεχή συμπαράσταση τους, την αγάπη και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη την διάρκεια αυτή.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας.....	8
1.2 Ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων σε επιφάνειες.....	9
1.3. Η μελέτη της ομαδικής κίνησης των βακτηρίων στο εργαστήριο .....	9
1.3.1 Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών στην ομαδική κίνηση.....	9
1.3.2 Ο ρόλος της υγρασίας στην ομαδική κίνηση .....	10
1.3.3 Η ομαδική κινητικότητα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και την αλατότητα .....	11
1.4 Προϋποθέσεις που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα .....	12
1.4.1 Μαστίγια .....	12
1.5 Κατά την ομαδική κίνηση των βακτηρίων σχηματίζονται σχεδίες κυττάρων (rafts)....	15
1.6 Επιφανειοδραστικές ενώσεις.....	15
1.7 Φαινότυποι των βακτηρίων που συνδέονται με την ομαδική κίνηση .....	17
1.7.1 Περίοδος υστέρησης (swarm lag) στην ομαδική κίνηση .....	17
1.7.2 Η επιμήκυνση των κυττάρων .....	181
1.7.3 Δημιουργία μοτίβων (σχημάτων) των αποικιών .....	19
1.8 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή μολυσματικότητα τους.....	211
1.9 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	222
1.10 Ομαδική κινητικότητα και σύστημα αίσθησης πυκνότητας πληθυσμού .....	233
1.11 Γονίδια που εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση των βακτηρίων.....	244
1.11.1 Γονίδια που επάγονται ή/και καταστέλλονται κατά την ομαδική κίνηση των βακτηρίων .....	244
1.12 Ομαδική κίνηση και βιοϋμένια .....	255
ΣΚΟΠΟΣ .....	28
2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1 Βακτηριακά στελέχη (Βιολογικό υλικό) .....	30
2.2 Ηλιοαπολύμανση (Εισαγωγή) .....	31
2.3 Απολύμανση του εδάφους με τη χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου (Εισαγωγή) .....	31
2.4 Ομαδική και κολυμβητική κίνηση βακτηρίων .....	32
2.5 Έλεγχος της ανταγωνιστικότητας των στελεχών P3 και P23 με μύκητες.....	32
2.6 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών .....	33

2.6.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - βακτήρια .....	33
2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	35
2.6.2.1 Αρχή της μεθόδου .....	35
2.6.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR) .....	36
2.6.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης .....	38
2.6.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης.....	39
2.6.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων .....	40
2.6.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα .....	41
2.6.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα .....	41
2.6.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	42
2.6.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	43
2.6.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> .....	43
2.6.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells) .....	43
2.6.7.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο .....	44
2.6.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i> .....	45
2.6.9 Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού .....	46
2.6.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing).....	47
2.6.11 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3. 1 Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης των υπό μελέτη στελεχών.....	50
3. 2 Ομαδική κίνηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες .....	52
3.3 Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P3 και P23 έναντι μη παθογόνων μυκήτων.....	53
3.4 Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P3 και P23 έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων .....	54
3.5 Η ομαδική κίνηση των στελεχών P3 και P23 παρεμποδίζει την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων .....	54
3.6 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών P3 και P23 τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα τοματοφύτων .....	57
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	61

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στελέχη των βακτηρίων *Pseudomonas* τα οποία βιοσυνθέτουν δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιβιοτική δράση παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν οκτώ στελέχη βακτηρίων από έδαφος το οποίο είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανσή του, προ της καλλιέργειας τοματοφύτων, με ηλιοαπολύμανση ή εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου. Η ομαδική κίνηση των στελεχών (swarming motility) αξιολογήθηκε σε κατάλληλα τρυβλία. Δυο από τα στελέχη, το P3 και το P23, τα όποια παρουσίασαν τον καλύτερο φαινότυπο ομαδικής κίνησης επιλέχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη P3 και P23 ομαδοποιούνται με τα βακτηριακά είδη *Pseudomonas lurida* και *Pseudomonas azotoformans*, αντίστοιχα. Η ανταγωνιστική δραστηριότητα των δυο στελεχών αξιολογήθηκε έναντι φυτοπαθογόνων και μη-παθογόνων μυκήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δυο στελέχη επέδειξαν πολύ καλή ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι των μυκήτων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ανταγωνιστική δραστηριότητα τους έναντι των μυκήτων ήταν ιδιαίτερα έντονη όταν και οι δυο οργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι κατά την ομαδική τους κίνηση τα δυο ανταγωνιστικά στελέχη πιθανά παράγουν και εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες αντιμικροβιακών ενώσεων ή/και βακτηριοσινών.

## ABSTRACT

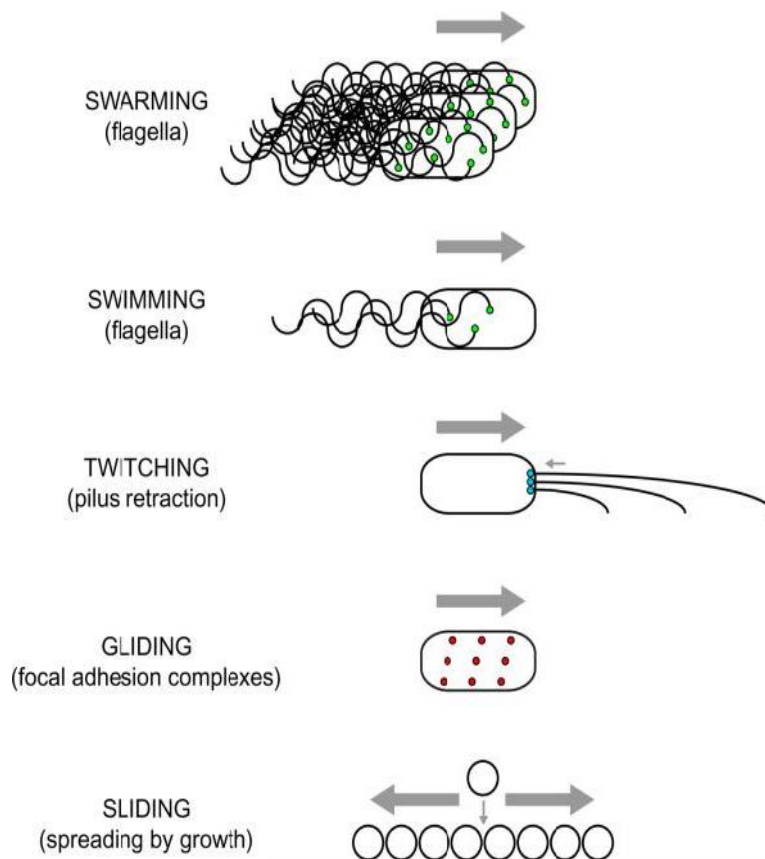
*Pseudomonas* strains producing antimicrobial secondary metabolites play an important role in the biocontrol of phytopathogenic fungi. In this study, native *Pseudomonas* spp. isolates were obtained from soil which has been previously subjected to solarization or fumigation treatment with methyl bromide. The swarming motility of these isolates was evaluated on swarming plates. Two strains, designated as P3 and P23, showing the most prominent swarming motility phenotype were selected for further characterization. A phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences confirmed that the isolates P3 and P23 belonged to the species *Pseudomonas lurida* and *Pseudomonas azoformans*, respectively. The antagonistic activity of the isolates against phytopathogenic and non-phytopathogenic fungi was evaluated *in vitro*. Both strains exhibited antagonistic activity against fungi and this antagonism appears to be enhanced when both isolates exhibited their swarming motility phenotype. Perhaps, swarming motility of both isolates results in the enhanced production and excretion of antimicrobial compounds and/or bacteriocins.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς ώστε να επιτυγχάνουν τον αποικισμό των διαφόρων φυσικών ενδιαιτημάτων. Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς είναι η μετακίνησή τους σε επιφάνειες και ο σχηματισμός βιοϋμενίων (Verstraeten *et al.*, 2008).

### 1.1 Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας

Πριν από περίπου ένα τέταρτο του αιώνα ο J.Henrichsen ερεύνησε την κινητικότητα σε επιφάνεια, εκατοντάδων στελεχών από 40 είδη βακτηρίων που ανήκουν σε 18 διαφορετικά γένη. Εντόπισε έξι διαφορετικές κατηγορίες κινητικότητας: **την swarming, swimming, gliding, twitching, sliding, και darting** κινητικότητα (Εικόνα.1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών μετακίνησης των βακτηρίων σε επιφάνειες.

Η **swimming (κολυμβητική)** κίνηση των βακτηρίων αφορά τη μετακίνηση μεμονωμένων κυττάρων σε υγρά ενδιαιτήματα, η οποία πραγματοποιείται μέσω της περιστροφής των μαστιγίων. Η **swarming (ομαδική)** κίνηση αφορά την ταυτόχρονη



μετακίνηση ομάδων κυττάρων πάνω σε επιφάνειες και όπως η κολυμβητική κινητικότητα εξαρτάται από την περιστροφή των μαστιγίων. Η **twitching** κινητικότητα εξαρτάται από την παρουσία και σύσπαση των τύπου IV ινιδίων (pili). Η **gliding** κινητικότητα είναι μια ενεργός εξάπλωση των κυττάρων που δεν προϋποθέτει την παρουσία μαστιγίων και νηματίων. Η **sliding** κινητικότητα είναι μια παθητική μορφή επιφανειακής εξάπλωσης που δεν απαιτεί μαστίγια ή νημάτια, αλλά αντί αυτού στηρίζεται στη βιοσύνθεση και έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών για τη μείωση της επιφανειακής τάσης που επιτρέπει στην αποικία να εξαπλωθεί μακριά από το σημείο σχηματισμού της, οδηγώντας στην ανάπτυξη των κυττάρων. Τέλος, σχεδόν τίποτα δεν είναι γνωστό για την *darting* κινητικότητα (Harshey, 2003).

## 1.2 Ομαδική κίνηση των βακτηρίων σε επιφάνειες

Ο Hauser περιέγραψε για πρώτη φορά την ομαδική κίνηση (κινητικότητα) στο είδος *Proteus* το 1885. Από τότε έχει αποδειχθεί ότι είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ βακτηρίων που φέρουν μαστίγια, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτός ο τρόπος της μετανάστευσης στην επιφάνεια πρέπει να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αποικισμό του φυσικού περιβάλλοντος από μικροοργανισμούς (Harshey, 2003).

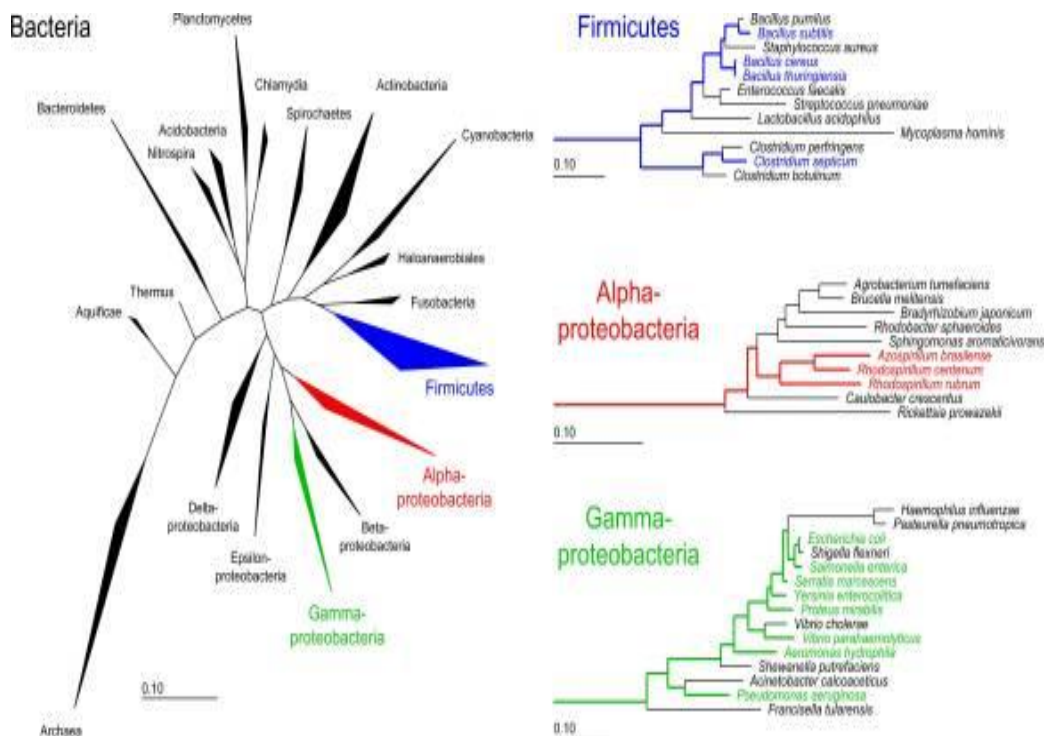
## 1.3. Η μελέτη της ομαδικής κίνησης των βακτηρίων στο εργαστήριο

Η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (surface motility) παρατηρείται σε διαφορεικά είδη κατά Gram θετικών ή αρνητικών βακτηρίων (Εικόνα 2).

### 1.3. 1 Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών στην ομαδική κίνηση

Γενικά η ομαδική κίνηση απαιτεί πλούσια σε ενέργεια θρεπτικά μέσα, αλλά οι ειδικές συνθήκες που υποστηρίζουν την εξάπλωση εξαρτώνται από τον οργανισμό που εξετάζεται. Ορισμένα βακτήρια, όπως ο *Bacillus subtilis*, παρουσιάζουν έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε ένα ευρύ φάσμα πλούσιων θρεπτικών μέσων ενώ άλλα βακτήρια, όπως η *Salmonella enterica* και η *Yersinia enterocolitica* απαιτούν την παρουσία ιδιαίτερων συμπληρωμάτων, όπως η γλυκόζη. Σε πολλούς οργανισμούς δεν παρατηρείται ομαδική κινητικότητα σε ελάχιστα (πτωχά) μέσα. Αυτό πιθανόν να αντανακλά το υψηλό μεταβολικό κόστος που απαιτείται για τη σύνθεση των

μαστίγιων. Ορισμένα βακτήρια, όπως το *Vibrio parahaemolyticus*, ωστόσο, μπορεί να εξαπλώνονται σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα (Kearns, 2010).



Εικόνα 2. Φυλογενετική κατανομή βακτηρίων που παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα.

### 1.3.2 Ο ρόλος της υγρασίας στην ομαδική κινητικότητα

Η κινητικότητα των βακτηρίων σε επιφάνειες εξαρτάται από τις συνθήκες υγρασίας και τη ρευστότητα του μέσου δηλαδή τη συγκέντρωση του άγαρ στο θρεπτικό μέσο. Αυτό είναι ιδιαίτερα προφανές για την ομαδική κινητικότητα σε είδη όπως *Serratia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Yersinia*, και *Pseudomonas*. Αυτά τα βακτήρια επιδεικνύουν βέλτιστη ομαδική κινητικότητα σε συγκεντρώσεις 0,5% - 0,7% άγαρ και γενικά δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω από 1%. Ωστόσο, μερικά είδη βακτηρίων (*Proteus*, *Vibrio*, *Rhodospirillum*) μπορούν να εξαπλωθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άγαρ (1.5% -2%). Θρεπτικά μέσα που στερεοποιούνται με 0.25-0,30% άγαρ αξιοποιούνται για τη μελέτη της κολυμβητικής ικανότητας των βακτηρίων. Είναι κατανοητό ότι η συγκέντρωση 1.5% άγαρ που χρησιμοποιείται για την στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου στο εργαστήριο θα μπορούσε αρχικά να είχε επιλεγεί ειδικά για την αναστολή της ομαδικής κινητικότητας (Kearns, 2010). Η ιδιάζουσα συμπεριφορά του στελέχους *E. coli* K-12, που απαιτεί μια συγκεκριμένης εμπορικής προέλευσης άγαρ (Eiken) για

την επίδειξη του φαινοτύπου της ομαδικής κινητικότητας, πιθανόν να οφείλεται στην υψηλότερη συγκράτηση υγρασίας του άγαρ. Αυτό προκύπτει από τη συμπεριφορά της εξάπλωσης μεταλλαγμένων βακτηρίων της *S. marcescens* όπου έχει παρατηρηθεί ελαττωματική παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας serrawettin, καθώς και μεταλλαγμένων βακτηρίων της *S. typhimurium* ελαττωματικών στη βιοσύνθεση των LPS (λιποπολυσακχαρίτες), τα οποία δεν εξαπλώνονται σε κανονικό άγαρ αλλά μπορούν να εξαπλωθούν και να κινηθούν σε Eiken άγαρ. Η τελευταία παρατήρηση είναι σύμφωνη με την απουσία του Ο-αντιγόνου στο στέλεχος K-12, καθώς και η ικανότητα της *E. coli* με ένα άθικτο Ο-αντιγόνο να εξαπλώνεται σε άγαρ εκτός του Eiken άγαρ (Harshey, 2003).

Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και για μεταλλαγμένα στελέχη του *Bacillus subtilis* όπου εκεί δεν έχουμε παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας surfactin. Η προσθήκη της επιφανειοδραστικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο μπορεί να αποκαταστήσει την ελαττωματική κινητικότητα όχι μόνο των μεταλλάξεων του *B. subtilis*, αλλά και των LPS μεταλλάξεων της *S. typhimurium*, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα LPS λειτουργούν κανονικά ως επιφανειοδραστική ουσία. Οι serrawettin και η surfactin είναι γνωστό ότι μειώνουν την επιφανειακή τάση και βελτιώνουν τις αλληλεπιδράσεις του νερού με στερεές επιφάνειες (surface wettability), επιτρέποντας την εξάπλωση των υγρών σε υδρόφοβες επιφάνειες. Αυτά και άλλα εξωλιπίδια όχι μόνο προωθούν την ομαδική κινητικότητα αλλά και επιτρέπουν στα κύτταρα να εξαπλωθούν ακόμη και εν απουσία της ενεργού κινητικότητας και είναι πιθανόν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή αποίκηση των υδρόφοβων επιφανειών (Harshey, 2003).

### **1.3.3 Η ομαδική κινητικότητα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και την αλατότητα**

Η εξάπλωση των περισσότερων βακτηρίων σε επιφάνειες εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης και τη συγκέντρωση αλάτων στο θρεπτικό μέσο. Για παράδειγμα η ομαδική κινητικότητα στο *R. leguminosarum* παρουσιάζει το βέλτιστο εξάπλωσης σε θερμοκρασία επώασης στους 22°C και σχεδόν μηδενίζεται/παρεμποδίζεται στους 30°C (Matilla et al., 2007). Αύξηση της εξάπλωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε επίσης στο *S. marcescens* (Lai et al., 2005) και στο *Pseudomonas putida* KT2440 (Matilla et al., 2007). Αντίθετα, ο *Bacillus subtilis* στέλεχος 3610, επέδειξε μεγίστη εξάπλωση σε υψηλές θερμοκρασίες

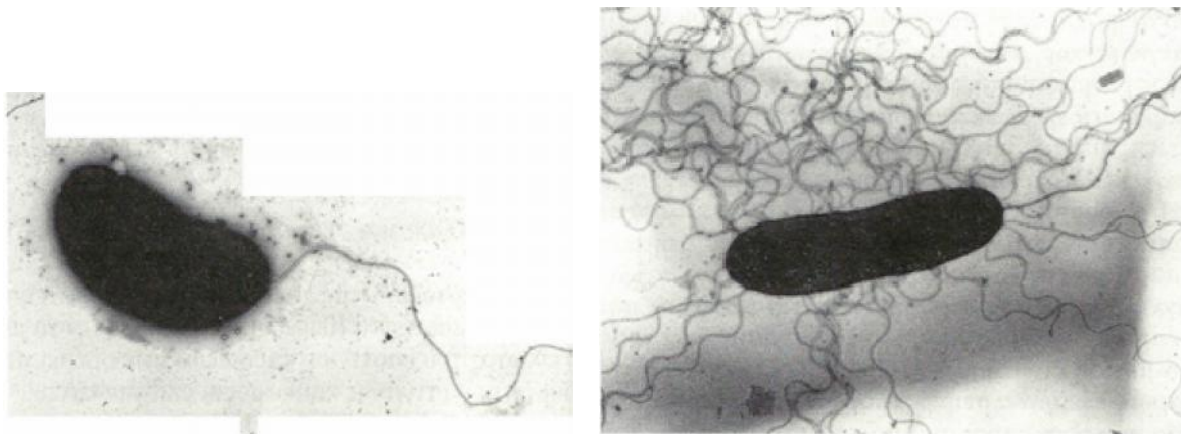
(Julkowska et al., 2004). Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl στο θρεπτικό μέσο επέδρασε αρνητικά στην εξάπλωση στελεχών *Pseudomonas* τα οποία είχαν απομονωθεί από την λίμνη Baikal (Soutourina et al., 2001). Αντίθετα, η προσθήκη NaCl ή KCl στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του *Protorhabdus temperate* επέδρασε θετικά στην εξάπλωσή του (Michaels and Tisa, 2011).

#### 1.4 Προϋποθέσεις που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα

Η ύπαρξη λειτουργικών μαστίγιων είναι βασική προϋπόθεση για την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων, αλλά συνήθως απαιτούνται και άλλες, όπως η αύξηση της βιοσύνθεσης τους, η αλληλεπίδραση των κύτταρων καθώς επίσης και η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών (Kearns, 2010).

##### 1.4.1 Μαστίγια

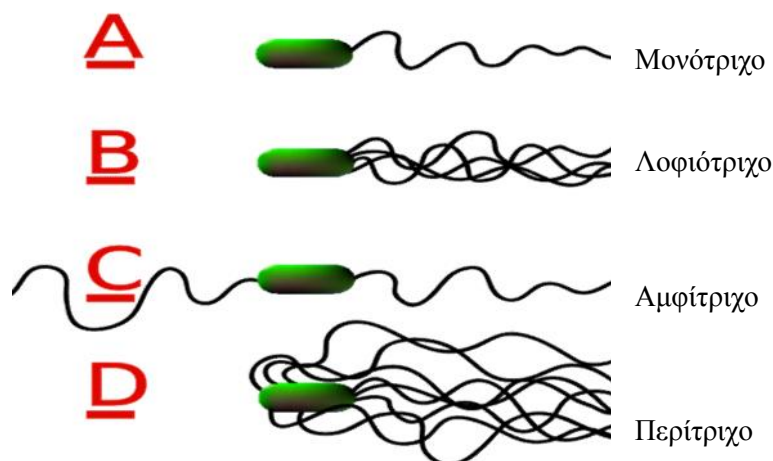
Τα μαστίγια των βακτηρίων είναι επιμήκεις, λεπτές (20 nm) προεκβολές μήκους περίπου 10 μm. Τα μαστίγια μπορούν να παρατηρηθούν είτε με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης χρησιμοποιώντας μια απλή χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, είτε σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από χρώση των μαστιγίων με φθορίζουσες ενώσεις, είτε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Τα μαστίγια των βακτηρίων παρατηρούμενα με αρνητική χρώση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

Η διευθέτηση των μαστιγίων διαφέρει ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Τα βακτήρια που φέρουν ένα μαστίγιο το οποίο εκφύεται από τον ένα ή τον άλλο πόλο αναφέρονται ως **μονότριχα** (π.χ., *Vibrio cholerae*). Τα **λοφιότριχα** βακτήρια (π.χ.

*Spirillum volutans*) έχουν πολλαπλά μαστίγια που εκφύονται στον ένα ή στον άλλο πόλο του βακτηρίου και δρουν από κοινού προκειμένου να οδηγήσουν τα βακτήρια σε μια ενιαία κατεύθυνση. Τα **αμφίτριχα** βακτήρια (π.χ. *Campylobacter jejuni*) φέρουν ένα ενιαίο μαστίγιο σε καθένα από τους δυο πόλους. Τα **περίτριχα** βακτήρια προβάλλουν μαστίγια σε όλες τις κατευθύνσεις (π.χ. *E. coli*). (Εικόνα 4).

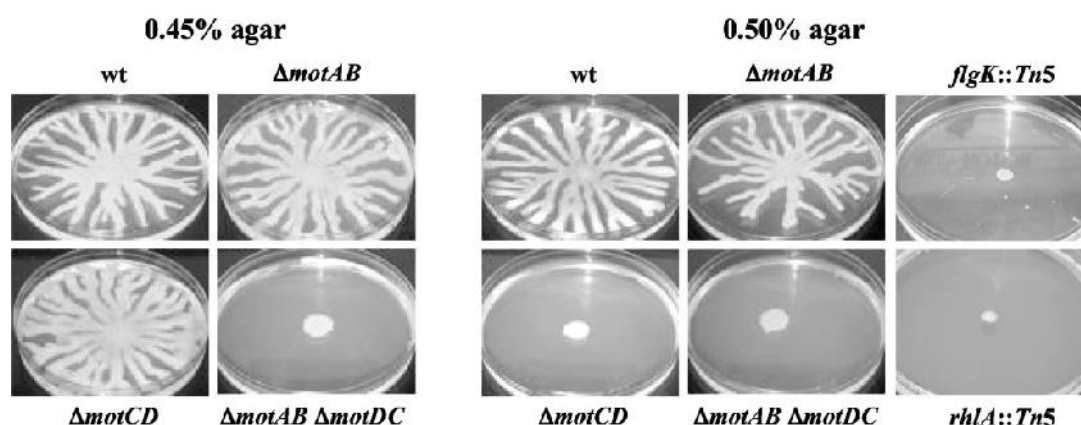


Εικόνα 4. Διάταξη των βακτηριακών μαστιγίων: (A) Μονότριχα, (B) Λοφιότριχο, (C) Αμφίτριχο, (D)Περίτριχο.

Τα περισσότερα βακτήρια που παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα έχουν περίτριχη διάταξη των μαστιγίων στην οποία πολλαπλά μαστίγια διανέμονται τυχαία στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα περίτριχα μαστίγια, μπλέκονται μεταξύ τους, όταν περιστρέφονται, με αποτέλεσμα την αύξηση της ακαμψίας τους, γεγονός που καθιστά αποδοτικότερη τη λειτουργία τους σε υγρά με μεγάλο ιξώδες. Ένα μαστίγιο απαιτεί σχετικά ελάχιστη επένδυση ενεργειακών πόρων και αρκεί για την swimming κινητικότητα. Ως εκ τούτου, η σύνθεση των πολλαπλών περίτριχων μαστιγίων είναι μια ειδική προσαρμογή για να παράγουν ισχύ όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε παχύρρευστα ενδιαιτήματα και να εξαπλώνονται πάνω και ενδιάμεσα των επιφανειών (Kearns, 2010).

Η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των περίτριχων μαστιγίων και της ομαδικής κινητικότητας των βακτηρίων δεν είναι απόλυτη γιατί ορισμένα βακτήρια με ένα πολικό μαστίγιο επιδεικνύουν ομαδική κινητικότητα. Το *Vibrio parahaemolyticus*, το *Rhodospirillum centenum* και η *Aeromonas* φέρουν ένα πολικό μαστίγιο που αρκεί για τη swimming κινητικότητα αλλά πρέπει να παράγουν περίτριχα μαστίγια για να εξαπλωθούν πάνω σε επιφάνειες. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των

πολικών και των πλευρικών μαστιγίων κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Zhang et al., 2007). Επίσης, η περιστροφή τους τροφοδοτείται από διαφορετικές πηγές παραγωγής ενέργειας, και ρυθμίζονται διαφορετικά. Για παράδειγμα, η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ραβδοειδές βακτήριο που έχει ένα πολικό μαστίγιο. Κατά τη διάρκεια της ομαδικής κίνησης η *P. aeruginosa* διατηρεί το πολικό μαστίγιο αλλά διαθέτει δυο συστήματα περιστροφής (*motAB* και *motCD*) που απαιτούνται ειδικά για την ώθηση της κίνησης πάνω στις επιφάνειες (Εικόνα 5) αλλά και ενδιάμεσα από παχύρρευστα ενδιαιτήματα (Toutain et al., 2005). Έτσι, η έκφραση των εναλλακτικών μηχανισμών περιστροφής του μαστιγίου είναι τουλάχιστον άλλος ένας τρόπος για να διευκολυνθεί η swarming κινητικότητα εκτός από τη χρήση των περίτριχων μαστιγίων.



Εικόνα 5. Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους *P. aeruginosa* αγρίου τύπου (wt) και του μεταλλαγμένου είτε για τα γονίδια *motAB* είτε για τα *motCD* είτε για την διπλή μετάλλαξη *motAB* και *motCD* σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν 0.45% ή 0.50% άγαρ.

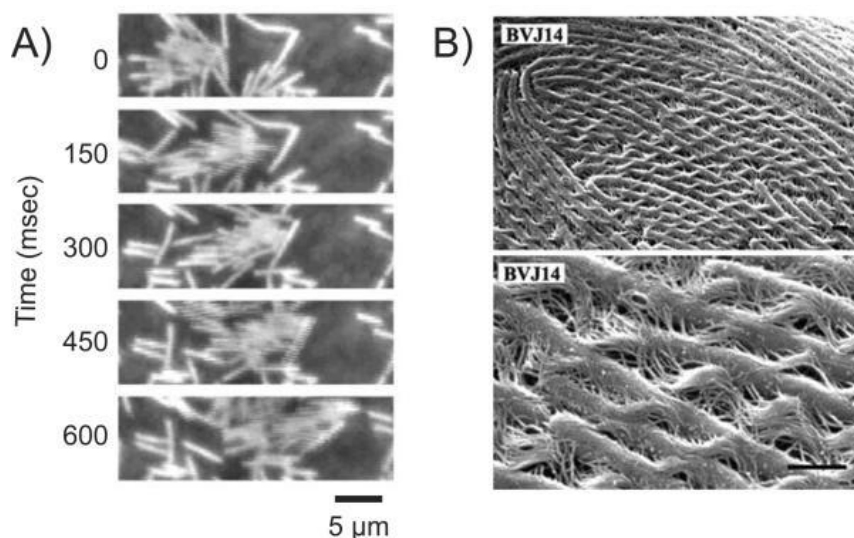
Όταν τα κύτταρα μεταβαίνουν από τη κολυμβητική στην ομαδική κινητικότητα, ο αριθμός των μαστιγίων ως προς την επιφάνεια των κυττάρων αυξάνεται. Βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα βιοσύνθεσης εναλλακτικών συστημάτων μαστιγίων (π.χ. περίτριχα) κατά τη μετάβαση τους από τη κολυμβητική (φέρουν ένα πολικό μαστίγιο) στη ομαδική κινητικότητα παράγουν πολλαπλά περίτριχα μαστίγια (Kearns, 2010). Ορισμένα όμως είδη με ένα σύστημα μαστιγίων φαίνεται επίσης να αυξάνουν τον αριθμό των μαστιγίων στην επιφάνεια των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας. Ακόμη και στελέχη της *P. aeruginosa* που κολυμπούν με ένα ενιαίο πολικό μαστίγιο μπορεί να παράγουν δύο πολικά μαστίγια, όταν κινούνται σε επιφάνειες (Kerns, 2010). Μεταλλάξεις που μειώνουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των μαστιγίων μειώνουν και τον αριθμό των μαστιγίων με



αποτέλεσμα να μειώνουν ή να καταργούν την ομαδική κινητικότητα. Αντιστρόφως, οι μεταλλάξεις που ενισχύουν την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των μαστιγίων αυξάνουν τον αριθμό των μαστιγίων και ενισχύουν την ομαδική κινητικότητα (Kearns, 2010).

### 1.5 Κατά την ομαδική κίνηση των βακτηρίων σχηματίζονται σχεδίες κυττάρων (rafts)

Τα βακτήρια, κατά την κολυμβητική κίνηση, φαίνεται να κολυμπούν ως μεμονωμένα κύτταρα ενώ κατά την ομαδική κίνηση κινούνται δίπλα-δίπλα σε ομάδες κυττάρων σε ένα σχηματισμό που αναφέρεται ως σχεδίες (rafts) (Εικόνα 6). Ο σχηματισμός του rafting είναι δυναμικός, τα κύτταρα που απαρτίζουν τη σχεδία κινούνται ως μια ομάδα, ενώ τα κύτταρα που αποκρίνονται από μια ομάδα χάνουν γρήγορα την κινητικότητά τους (O'Rear et al., 1992). Μελέτες μέσω χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποκάλυψαν ότι κατά την ομαδική κινητικότητα ο *P. mirabilis* σχηματίζει εκτεταμένες σχεδίες όπου τα μαστίγια των κυττάρων της ομάδας μπλέκονται μεταξύ τους (Kearns, 2010). (Εικόνα 6B).



Εικόνα 6 . Φωτογραφική απεικόνιση σχεδίας ( raft) κυττάρων του *B. subtilis* (A) και του *P. mirabilis* (B) κατά την ομαδική κίνηση.

### 1.6 Επιφανειοδραστικές ενώσεις

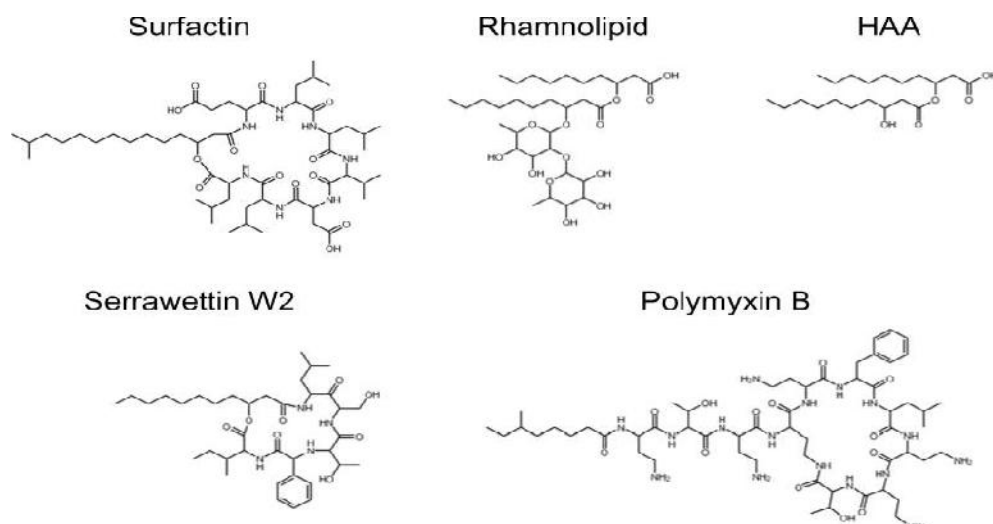
Πολλά στελέχη βακτηρίων που επιδεικνύουν ομαδική κίνηση βιοσυνθέτουν και εκκρίνουν επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια που μειώνουν την τάση μεταξύ του υποστρώματος και του κύτταρου και ως εκ

τούτου καθιστούν δυνατή την εξάπλωση των βακτηρίων πάνω σε μια επιφάνεια. Το υδρόφοβο τμήμα αυτών των μορίων είναι συνήθως ένα λιπαρό οξύ ενώ το υδρόφιλο τμήμα του μορίου αποτελείται είτε από ένα ολιγοπεπτίδιο είτε από μόνο- ή δισακχαρίτες. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες συχνά εμφανίζονται ως ένα διαυγές, υδατικό στρώμα που προηγείται μπροστά από την swarm αποικία κατά την ομαδική κίνηση των βακτηρίων. Μερικά βακτήρια παρόλο που δε φαίνεται να συνθέτουν επιφανειοδραστικές ουσίες εξαπλώνονται σε ειδικά άγαρ με εγγενώς χαμηλά επίπεδα επιφανειακής τάσης, ίσως λόγω της παρουσίας μιας επιφανειοδραστικής ένωσης στο άγαρ (Matsuyama et al., 1995). Ωστόσο είναι πιθανό να παράγουν επιφανειοδραστικές ενώσεις των οποίων η χημική σύσταση και το μονοπάτι βιοσύνθεσης δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί.

Γενικά η ανίχνευση της παρουσίας ή της απουσίας της εκκρινόμενης επιφανειοδραστικής ουσίας είναι σχετικά απλή, χρησιμοποιώντας μια drop-collapse δοκιμή (Kearns, 2010).

Ο *B. subtilis* και η *Serratia liquefaciens* εκκρίνουν ένα λιποπεπτίδιο ως επιφανειοδραστική ουσία, την surfactin και την serrawettin, αντίστοιχα (Εικόνα 7). Η ολιγοπεπτιδική αλυσίδα και των δυο λιποπεπτιδίων βιοσυντίθεται μέσω ενζύμων (Non Ribosomal Protein synthetases) και όχι στα ριβοσωμάτια. Οι μεταλλάξεις που καταστέλλουν την παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας καταργούν επίσης την ομαδική κινητικότητα και η εξάπλωση μπορεί να αποκατασταθεί από την προσθήκη εξωγενούς επιφανειοδραστικής ουσίας. Η *P.aeruginosa* χρησιμοποιεί ως επιφανειοδραστική ουσία τα ραμνολιπίδια (rhamnolipids). Τα ραμνονολιπίδια (RLs) είναι αμφίφιλα γλυκολιπίδια που αποτελούνται από L-ραμνόζη και 3-υδροξυαλκανοϊκό οξύ ( 3-hydroxyalkanoic acids, HAA) (Εικόνα 7). Συνήθως παράγονται ως ένα μίγμα αποτελούμενο από μόνο-και διραμνολιπίδια. Παράλληλα με τα ραμνολιπίδια παράγεται και μικρή ποσότητα HAA (Deziel et al., 2007, Tremblay et al., 2007).





Εικόνα 7. Επιφανειοδραστικές ουσίες.

## 1.7 Φαινότυποι των βακτηρίων που συνδέονται με την ομαδική κίνηση

### 1.7.1 Περίοδος υστέρησης (swarm lag) στην ομαδική κίνηση

Η περίοδος υστέρησης (μη κινητική συμπεριφορά) προηγείται της έναρξης της ομαδικής κινητικότητας όταν τα βακτήρια μεταφέρονται από ένα υγρό μέσο σε μια στερεή επιφάνεια. Η χρονική περίοδος υστέρησης της ομαδικής κινητικότητας είναι σταθερή σε ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών αλλά μπορεί να μειωθεί με την αύξηση της πυκνότητας του εμβολίου ή να καταργηθεί με τη χρήση συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Η περίοδος υστέρησης είναι ελάχιστα κατανοητή αλλά η παρουσία της δείχνει ότι τα κύτταρα που παρουσιάζουν κινητικότητα μέσω κολύμβησης (swimming motility) πρέπει να αλλάξουν συμπεριφορά με κάποιο τρόπο και να γίνουν κύτταρα που παρουσιάζουν ομαδική κίνηση (swarming motility).

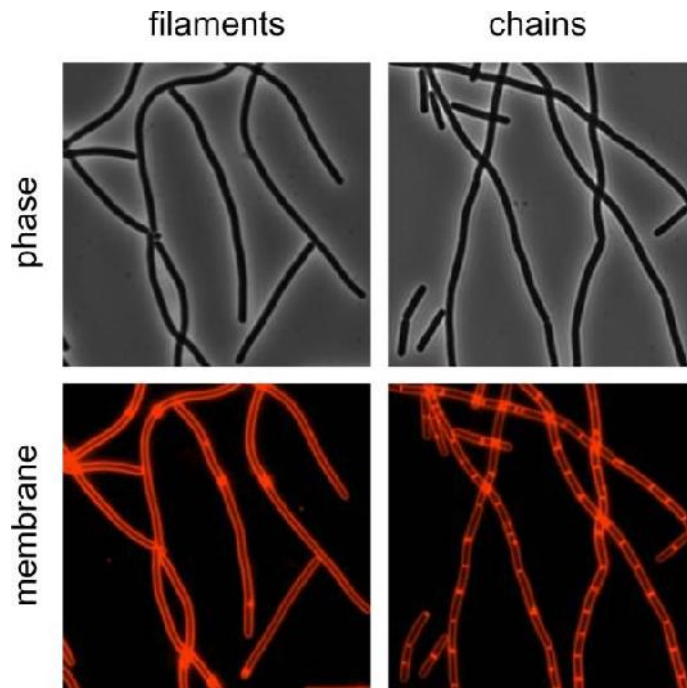
Φαίνεται να υπάρχουν τουλάχιστον δυο προϋποθέσεις για να αποφύγουμε την περίοδο υστέρησης στην έναρξη της ομαδικής κίνησης στον *B. subtilis*. Η πρώτη προϋπόθεση είναι η υψηλή πυκνότητα των κυττάρων που προκαλεί την παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας surfactin. Η επιφανειοδραστική ουσία surfactin δεν καθορίζει την ελάχιστη διάρκεια της υστέρησης διότι η υστέρηση δε μειώνεται όταν τα κύτταρα εμβολιάζονται σε swarming άγαρ στο οποίο έχει προστεθεί η επιφανειοδραστική ουσία. Η δεύτερη προϋπόθεση φαίνεται να είναι η αύξηση του

αριθμού των μαστίγιων, διότι η υστέρηση έχει αποφευχθεί σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την σύνθεση των μαστιγίων (Kearns, 2010).

### 1.7.2 Η επιμήκυνση των κυττάρων

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα κύτταρα κατά την ομαδική κίνηση καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του κυττάρου (νηματοειδή κύτταρα) και ότι η επιμήκυνση των κυττάρων είναι ένας δείκτης της ομαδικής κινητικότητας (Ghelardi et al., 2007). Ωστόσο, η επιμήκυνση των κυττάρων δεν παρατηρείται κατά την ομαδική κίνηση σε όλα τα είδη των βακτηρίων (Kearns, 2010). Τα κύτταρα του *P. mirabilis* έχουν σχήμα μικρής ράβδου όταν καλλιεργούνται σε υγρή καλλιέργεια και μακριά νημάτια με πολλαπλά πυρηνοειδή όταν καλλιεργούνται σε στερεές επιφάνειες. Μέχρι σήμερα, δεν είναι σαφές αν τα επιμήκη κύτταρα απαιτούνται για την εξάπλωση της αποικίας κατά την ομαδική κίνηση ή αν απλώς συσσωρεύονται στην άκρη των swarming αποικιών.

Λίγες μελέτες, πέρα από τις αρχικές παρατηρήσεις στον *Proteus*, έχουν πράγματι επιβεβαιώσει ότι τα επιμήκη κύτταρα που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ομαδικής (swarming) κινητικότητας είναι στην πραγματικότητα νηματοειδή. (Εικόνα 8) Ο όρος "νηματοειδής" περιγράφεται ως ένα ελάττωμα στην κυτταρική διαίρεση στην οποία τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται απουσία του διαχωρισμού. Προφανώς τα επιμήκη κύτταρα μπορούν επίσης να προκύψουν από την αποτυχία του διαχωρισμού των κυττάρων μετά την επιτυχημένη διαίρεση με αποτέλεσμα τα κύτταρα να συνδέονται σχηματίζοντας μεγάλες αλυσίδες. Οι αλυσίδες κυττάρων και τα νημάτια μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν με το μικροσκόπιο αλλά μπορεί να διαφοροποιούνται με μικροσκόπιο φθορισμού και χρώση της μεμβράνης. Προτού να καθοριστεί ότι ένα κύτταρο είναι νηματοειδές, θα πρέπει να καθοριστεί αν υπάρχουν διαφράγματα ή όχι. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8 : Βακτήρια που σχηματίζουν νημάτια (filaments) ή κυτταρικές αλυσίδες (chains)

### 1.7.3 Δημιουργία μοτίβων (σχημάτων) των αποικιών

Η ομαδική κίνηση των βακτηρίων σε στέρεα θρεπτικά μέσα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αποικιών, οι οποίες επιδεικνύουν ποικιλία σχημάτων. Η σημασία του κάθε ιδιαίτερου σχήματος της αποικίας είναι ασαφής. Ωστόσο, ενδείξεις συνηγορούν στο ότι το σχήμα της αποικίας εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Harsay, 2003)

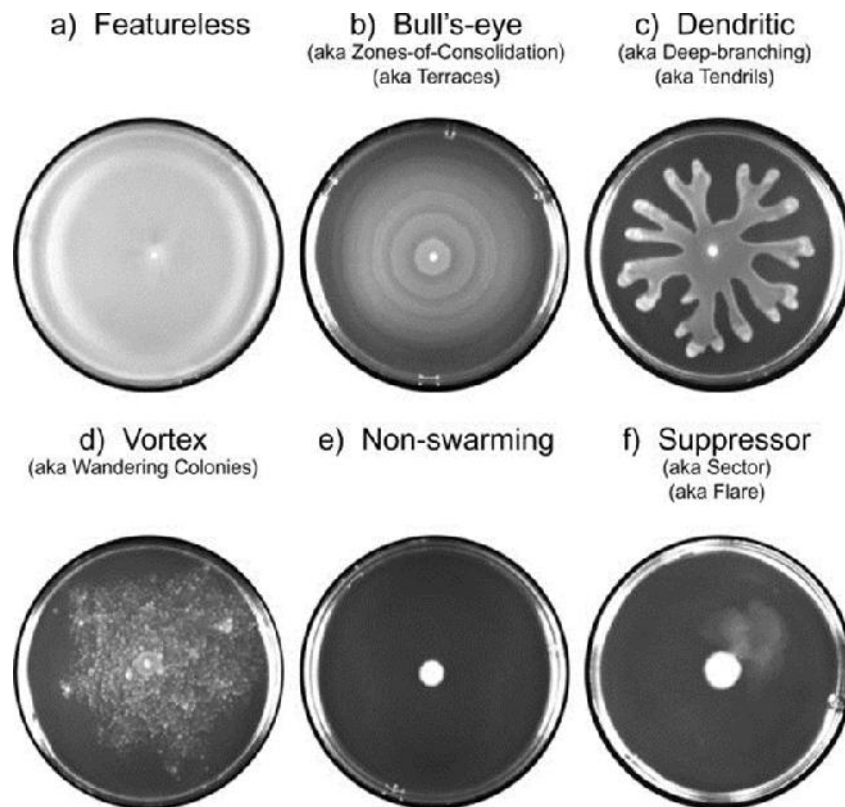
Σε πολλές περιπτώσεις η ομαδική κίνηση των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την ομοιόμορφη κατανομή της αποικίας ως ένα μονό στρώμα κύτταρων στην επιφάνεια του τρυβλίου (**featureless**) (Εικόνα 9) Το μονόστρωμα είναι διαφανές αλλά μπορεί να παρατηρηθεί όταν το προσπίπτον φως αντανακλάται άμεσα από την επιφάνεια του άγαρ. Η πυκνότητα των κυττάρων στο μονόστρωμα είναι υψηλή και σχεδόν ομοιόμορφη σε όλη την αποικία και αυξάνεται στην άκρη της αποικίας. Όταν το μονόστρωμα αγγίζει τα όρια του τρυβλίου, η αποικία έχει ένα απροσδιόριστο σχήμα διότι τα κύτταρα καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου (Εικόνα 9a). Το πιο γνωστό ακανόνιστο σχήμα που επιδεικνύουν οι swarming αποικίες των βακτηρίων κατά την ομαδική κίνηση είναι το «μάτι του ταύρου» (bulls eye) το οποίο σχηματίζεται συνήθως από στελέχη του *P. mirabilis* (Εικόνα 9b). Το σχήμα της αποικίας προκύπτει από τη συντονισμένη κινητικότητα των κυττάρων από το σημείο

εμβολιασμού τους και την ξαφνική αναστολή της κίνησης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ομόκεντρων δακτυλίων.

Ένα άλλο σχήμα που επιδεικνύει η swarming αποικία είναι οι **δενδρίτες (dendrites)** (Εικόνα 9c). Ο σχηματισμός του δενδρίτη της *P. aeruginosa* εξαρτάται από την έκκριση πολλαπλών επιφανειοδραστικών ουσιών.

Μερικά βακτήρια σχηματίζουν σπειροειδείς στροβίλους (vortices) καθώς εξαπλώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (Εικόνα 9d). Οι στροβίλοι είναι μεγάλες, τοπικές ομάδες κυττάρων που ταξιδεύουν σε μια κοινή κυκλική διαδρομή και έχουν επίσης αναφερθεί και ως «περιπλανώμενες αποικίες». Στην περίπτωση των στροβίλων του *Paenibacillus*, η ομαδική κινητικότητα σε συνδυασμό με τις φυσικές καμπύλες στην μορφολογία των κυττάρων μπορεί να προκαλέσουν το σχήμα του στροβίλου.

Τα κύτταρα που δεν παρουσιάζουν ομαδική κίνηση αδυνατούν να εξαπλωθούν σε όλη την επιφάνεια και αναπτύσσονται ως μια αποικία που περιορίζεται στο κέντρο του τρυβλίου. (Εικόνα 9e). Με παρατεταμένη επώαση, η διάμετρος της αποικίας των στελεχών που δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα μπορεί να αυξηθεί λόγω της συμβολής της sliding κινητικότητας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ το θρεπτικό μέσο εμβολιάζεται με έναν πληθυσμό βακτηρίων που δεν παρουσιάζουν κινητικότητα, ένα μικρό μέρος του πληθυσμού μπορεί να φέρει μεταλλάξεις που αποκαθιστούν την κινητικότητα. Τα κύτταρα αυτά διαχωρίζονται από την αποικία και αναπτύσσονται στην επιφάνεια του άγαρ ως ασύμμετρες εκλάμψεις (flares) (Εικόνα 5f). Τα κύτταρα αυτά θα πρέπει να απομονωθούν και να επανεξεταστούν για το εάν διατηρούν το φαινότυπο της ομαδικής κινητικότητας.



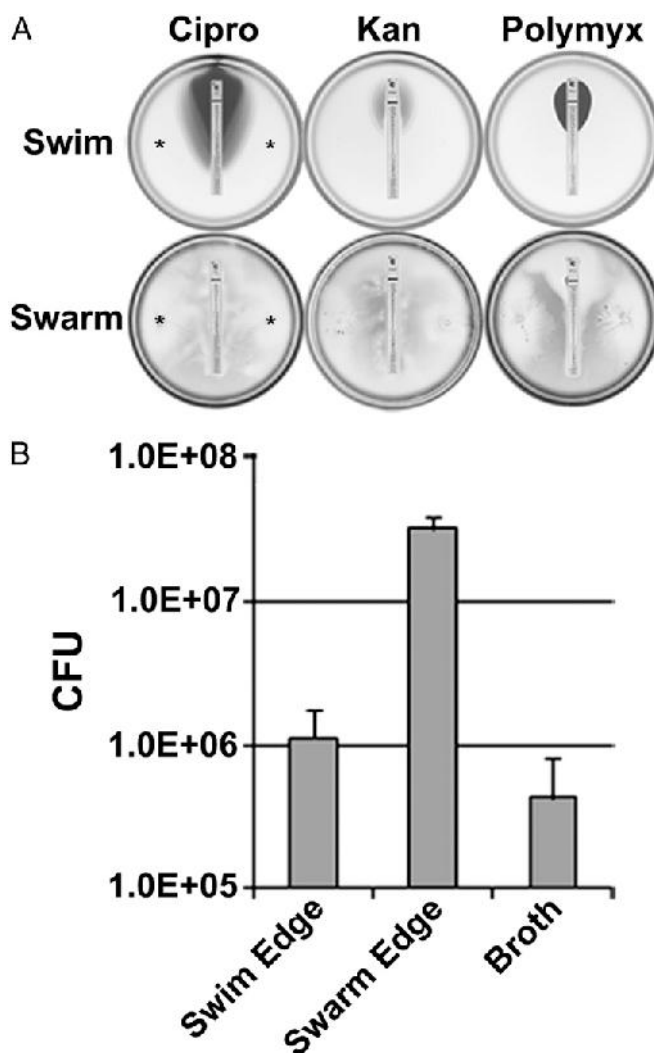
Εικόνα 9. Μοτίβα ομαδικής κίνησης σε διάφορα βακτήρια. a) Ακανόνιστο (featureless ) *Bacillus subtilis* 3610, b) Bull's eye (το μάτι του ταύρου) *Proteus mirabilis* PM7002. c) Δενδρίτης (dendritic): *Pseudomonas aeruginosa* PA14. d) Στρόβιλος (Vortex) *Paenibacillus vortex* V.e). Αποικία μεταλλαγμένων κυττάρων *Bacillus subtilis* 3610, τα οποία δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα και f) μερικά κύτταρα της προηγούμενης αποικίας *Bacillus subtilis* 3610 παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα λόγω καταστολής της μετάλλαξης. (Kearns, 2010).

## 1.8 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή μολυσματικότητά τους

Η παρουσία του φαινοτύπου της ομαδικής κινητικότητας σε ορισμένα παθογόνα βακτήρια (*P. mirabilis*) τα καθιστά ικανά να μεταναστεύουν από την περιοχή της μόλυνσης και να αποικίζουν νέες περιοχές με αποτέλεσμα την εξάπλωση της ασθένειας. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων της *P. aeruginosa* κατά την ομαδική κίνηση έδειξε ότι αυξάνεται η έκφραση μολυσματικών παραγόντων όπως το εκκριτικό σύστημα τύπου III και οι εξωκυττάρειες πρωτεάσες (Ovehage et al., 2008). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την ομαδική κινητικότητα μολυσματικών στελεχών της *P. aeruginosa* επέδειξαν μειωμένη μολυσματικότητα (Potvin et al., 2003).

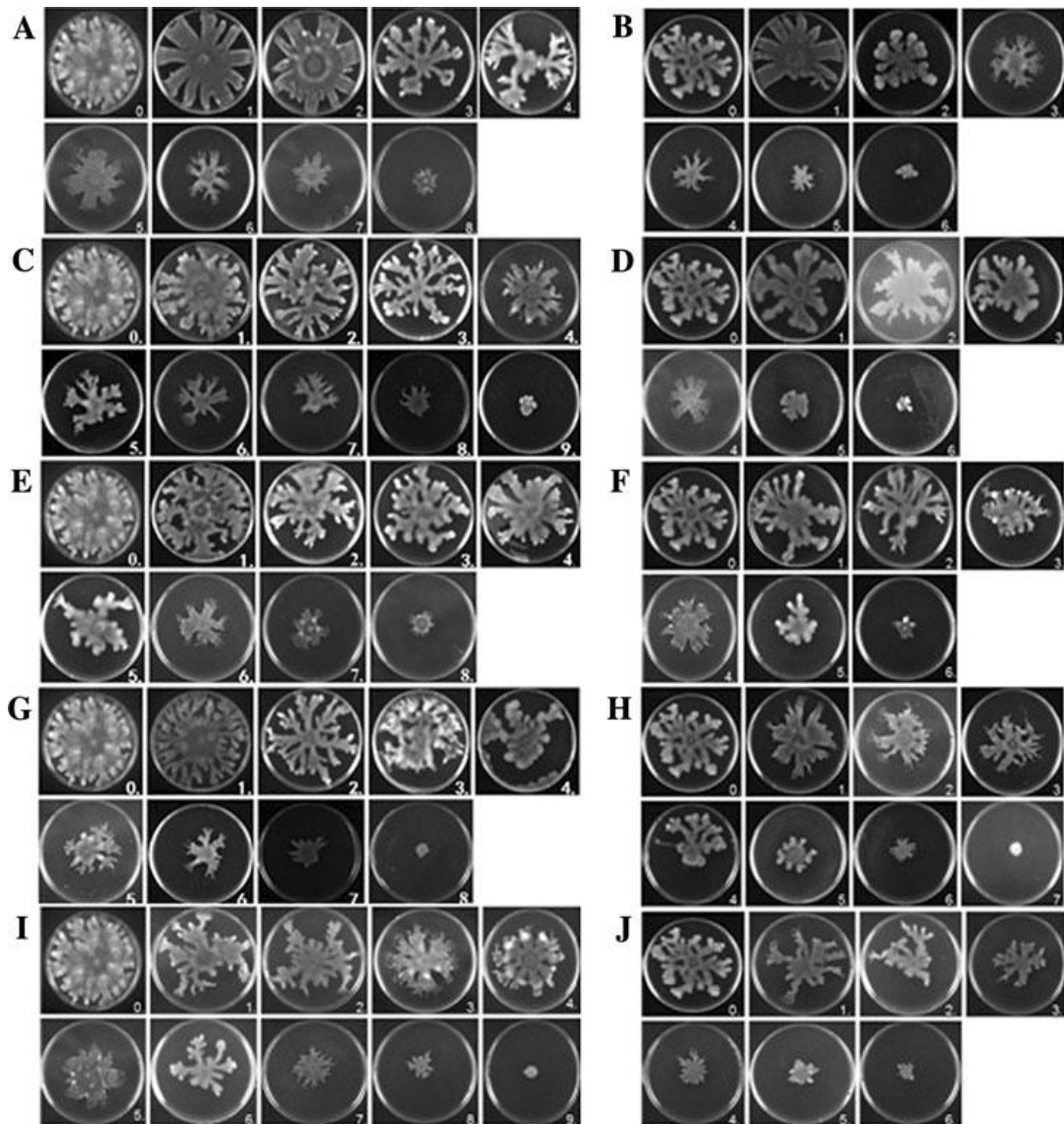
### 1.9 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Βακτήρια από διαφορετικά είδη όταν παρουσιάζουν το φαινότυπο της ομαδικής κινητικότητας επιδεικνύουν εξαιρετικά μεγάλη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις διαφορετικών αντιβιοτικών (Εικόνα 10). Ο φαινότυπος αυτός δεν φαίνεται να οφείλεται στην παρουσία αντλιών μετακίνησης των αντιβιοτικών αλλά πιθανά στην υψηλή συγκέντρωση κυττάρων που παρατηρείται κατά την ομαδική κίνηση (Butler et al., 2010) ή στη μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης των βακτηρίων (*P. aeruginosa* PAO1) σε αντιβιοτικά, η οποία οφείλεται στην ενισχυμένη έκφραση του γονιδίου *pvdQ* κατά την ομαδική κίνηση (Wang et al., 2012) (Εικόνα11).



Εικόνα 10. Ανθεκτικότητα της *Salmonella* σε αντιβιοτικά κατά ομαδική (swarm) ή κολυμβητική (swim) κινητικότητα (A) Πυκνότητα των κυττάρων στο άκρο της αποικίας που παρουσιάζει ομαδική κίνηση, κολυμβητική κίνηση σε υγρή καλλιέργεια. (B) Αντιβιοτικά: Cipro,ciprofloxacin, Kan, kanamycin, Polymyx, polymyxin. (Butler et al.,2010).





Εικόνα 11. Ομαδική κινητικότητα της *P. aeruginosa* PAO1 και της PAO1 η οποία υπερεκφράζει το γονίδιο *pvdQ* παρουσία διαφορετικών αντιβιοτικών. Μορφολογία των αποικιών σε ομαδική κίνηση παρουσία CAZ PAO1pMEpvdQ (a), CAZ PAO1 (b), CIP PAO1pMEpvdQ (c), CIP PAO1 (d), MER PAO1pMEpvdQ (e), MER PAO1 (f), PB PAO1pMEpvdQ (g), PB PAO1 (h), GEN PAO1pMEpvdQ (i), and GEN PAO1 (j).

### 1.10 Ομαδική κινητικότητα και σύστημα αίσθησης πυκνότητας πληθυσμού

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται και να αποκρίνονται στα υπόλοιπα μέλη του πληθυσμού. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως σύστημα αίσθησης πυκνότητας του πληθυσμού (quorum sensing). Η διαδικασία αυτή βασίζεται στη βιοσύνθεση και έκκριση μικρού μοριακού βάρους μορίων (αυτοεπαγωγείς, autoinducers). Η εξωκυττάρια συγκέντρωση των αυτοεπαγωγέων

είναι άμεσα εξαρτώμενη από την πυκνότητα πληθυσμού του παραγωγού βακτηρίου. Τα κύτταρα μπορούν να αντιλαμβάνονται τα διακυτταρικά σήματα με αποτέλεσμα ολόκληρος ο πληθυσμός των βακτηρίων να παρουσιάζει μια συντονισμένη απόκριση. Τα αρνητικά και τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν διαφορετικά διακυτταρικά σήματα προσδιορισμού της πυκνότητας πληθυσμού. Τα αρνητικά κατά Gram (*Pseudomonas*) παράγουν acyl-homoserine lactones ενώ τα θετικά κατά Gram (*Streptococcus*) παράγουν oligopeptide autoinducers (Hibbing et al., 2010).

Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων φαίνεται να επηρεάζεται άμεσα ή έμμεσα από το σύστημα αίσθησης πυκνότητας του πληθυσμού. Για παράδειγμα, μεταλλαγμένα στελέχη *Pseudomonas syringae* (δεν παράγουν acyl-homoserine lactones) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομαδική κινητικότητα σε σύγκριση με τον άγριο τύπο (Quinones et al., 2005).

### **1.11 Γονίδια που εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση των βακτηρίων**

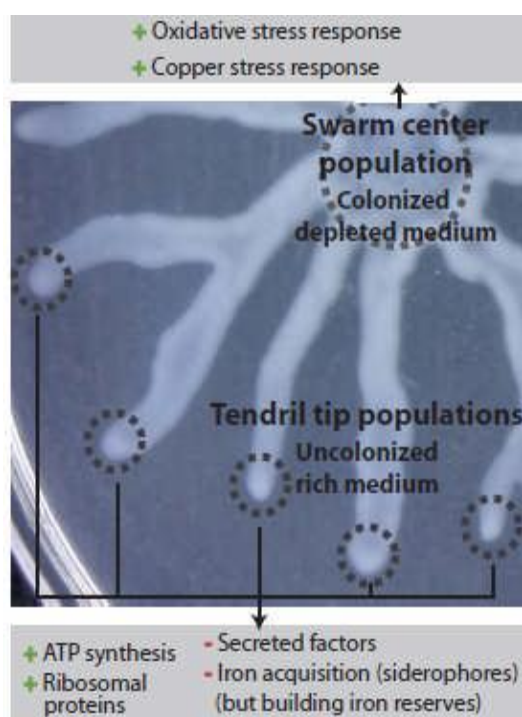
Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA επέτρεψε την κατασκευή μιας συλλογής μεταλλαγμένων στελεχών της *E. coli* K12 (Keio collection) τα οποία έχουν απενεργοποιημένο ένα μόνο γονίδιο. Η συλλογή αυτή αποτελείται από περίπου 4000 στελέχη, όσα και τα γονίδια του γονιδιώματος της *E. coli*. Τούτο επέτρεψε τη σάρωση όλων των μεταλλαγμένων στελεχών για τον προσδιορισμό των γονιδίων της *E. coli* τα οποία εμπλέκονται στην αναστολή του φαινότυπου της ομαδικής κινητικότητας (Inoue et al., 2007). Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στα *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Overhage et al., 2007 ) και *Variovorax paradoxus* (Pehl et al., 2012).

#### **1.11.1 Γονίδια που επάγονται ή/ και καταστέλλονται κατά την ομαδική κίνηση των βακτηρίων**

Η αλληλούχιση του γονιδιώματος βακτηρίων τα οποία παρουσιάζουν το φαινότυπο της ομαδικής κινητικότητας επέτρεψε την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του συνόλου των γονιδίων, τα οποία επάγονται ή/ και καταστέλλονται κατά την ομαδική κινητικότητα στελεχών από διαφορετικά είδη βακτηρίων (*Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* Pf0-1, *Sinorhizobium meliloti* ) (Overhage et al., 2008, Wang et al., 2006, Nogales et al., 2012, Tremblay and Deziel, 2010, Pearsons et al., 2010, Salveti et al., 2011, Mastropaolo et al., 2012).



Για παράδειγμα, κατά την ομαδική κίνηση του *S. meliloti* αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση σιδηροφόρων (Nogales et al., 2012). Σε αυτή την μελέτη οι ερευνητές σύγκριναν τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγραφημάτων τα οποία απομονώθηκαν από κύτταρα του *S. meliloti* που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με συγκέντρωση άγαρ 0.6% w/v (swarm plates) και τρυβλία με 1.5% άγαρ. Σε αυτού του τύπου τις μελέτες είναι σημαντικό να εξετάζονται τα επίπεδα επαγωγής ή/ και καταστολής της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων τόσο από διαφορετικές περιοχές της αποικίας (Εικόνα 12) όσο και από υγρές καλλιέργειες (Tremblay and Deziel, 2010).

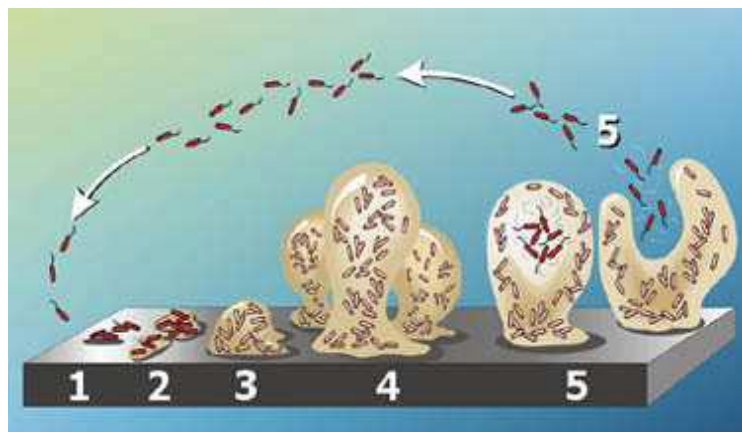


Εικόνα 12. Περιοχές της swarm αποικίας από τις οποίες απομονώθηκε RNA.

### 1.12 Ομαδική κίνηση και βιοϋμένια

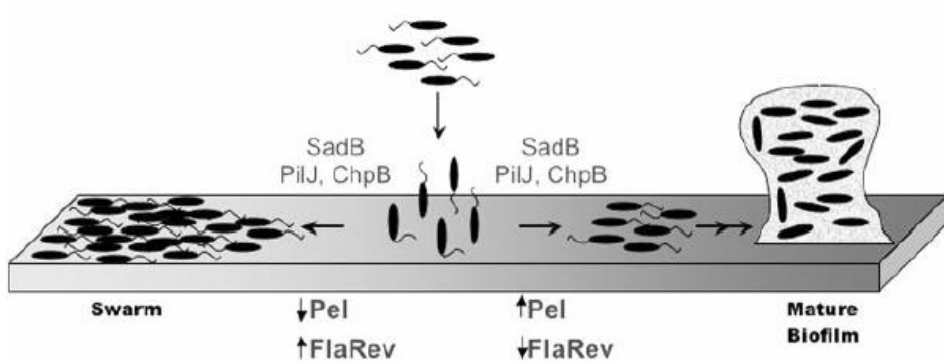
Τα βακτήρια στα φυσικά, βιομηχανικά και κλινικά ενδιαφέροντα απαντώνται συχνά ως κοινότητες προσκολλημένες σε επιφάνειες και αναφέρονται ως βιοϋμένια. Γενικά τα βιοϋμένια θεωρούνται «δυναμικές οντότητες», ετερογενείς στο χώρο και το χρόνο. Ο «δυναμικός» χαρακτήρας του βιοϋμένιου φαίνεται από τον κύκλο ζωής του, που περιλαμβάνει 3 στάδια: στο αρχικό στάδιο προσκόλλησης, οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε μια κατάλληλη επιφάνεια. Στα ενδιάμεσα στάδια, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, σχηματίζουν μικροαποικίες, περιβάλλονται από την εξωκυττάρια ουσία και αποκτούν τη χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή τους. Στο τελικό στάδιο ωρίμανσης, τμήματα από το βιοϋμένιο είναι δυνατό να αποσπαστούν, να

μεταφερθούν σε άλλες περιοχές που θα τις αποικίσουν εκ νέου οπότε και θα ξεκινήσει ένας νέος κύκλος ζωής (Hall-Stoodley et al., 2004) (Εικόνα13).



Εικόνα 13. Ο κύκλος ζωής του βιοϋμένιου. Στο αρχικό στάδιο (1) τα βακτήρια προσκολλώνται σε μια επιφάνεια. Στα ενδιάμεσα στάδια 2, 3 και 4 τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, εκκρίνουν εξωκυττάρια ουσία και αποκτούν την τρισδιάστατη σαν πύργο μορφή τους. Στο τελικό στάδιο (5) από το ώριμο βιοϋμένιο είναι δυνατό να αποσπαστούν τμήματα και να αρχίσει ένας νέος κύκλος ζωής.

Η σχέση μεταξύ κινητικότητας των βακτηρίων και σχηματισμού των βιοϋμένιων είναι πολύπλοκη διότι και στις δύο διαδικασίες μπορεί να εμπλέκονται κοινά γονίδια. Για παράδειγμα, η έναρξη της διαδικασίας σχηματισμού του βιοϋμένιου μέσω της αναστρέψιμης πρόσδεσης των κύτταρων σε μια επιφάνεια απαιτεί την παρουσία μαστιγίων. Επίσης η κινητικότητα στην επιφάνεια φαίνεται να είναι απαραίτητη διαδικασία κατά το σχηματισμό του βιοϋμένιου. Ως εκ τούτου είναι φανερό ότι τα ελεύθερα (planktonic) βακτήρια σε κάποιο στάδιο πρέπει να επιλέξουν μεταξύ της ομαδικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμένιου. Η σχέση μεταξύ βιοϋμένιου και ομαδικής κινητικότητας έχει μελετηθεί επαρκώς στην *P. aeruginosa* PA14 όπου εντοπίστηκε ότι το γονίδιο *SadB* (κυκλάση του GMP) ρυθμίζει τη συμπεριφορά του βακτηρίου όταν εγκαθίσταται σε επιφάνειες δηλαδή το εάν τα κύτταρα θα σχηματίσουν βιοϋμένια ή θα παρουσιάσουν το φαινότυπο της ομαδικής κίνησης (Caiazza et al., 2007).



Εικόνα 14. Η έκφραση του γονιδίου *SadB* επηρεάζει την τύχη των ελεύθερων κυττάρων. Αρχικά τα ελεύθερα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια. Στη συνέχεια η έκφραση του γονιδίου *SadB* (κυκλάση του GMP) ρυθμίζει το εάν τα κύτταρα θα ακολουθήσουν την πορεία προς το σχηματισμό βιοϋμένιου ή θα παρουσιάσουν τον φαινότυπο της ομαδικής κινητικότητας.

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο αρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ομαδικής κίνησης οκτώ στελεχών *Pseudomonas* τα οποία απομονώθηκαν από έδαφος θερμοκηπίων το οποίο είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανσή του με ηλιοαπολύμανση ή εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου καθώς και η ταυτοποίηση των στελεχών τα οποία παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εξάπλωση σε swarming τρυβλία. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της ομαδικής κινητικότητας επιλεγμένων στελεχών (παρουσιάζουν έντονη εξάπλωση σε swarming τρυβλία) και της ανταγωνιστικής δράσης τους (in vitro) έναντι παθογόνων και μη παθογόνων μυκήτων.

## **2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2. 1 Βακτηριακά στελέχη (Βιολογικό υλικό)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα φυτών τομάτας θερμοκηπιακής καλλιέργειας, από την Δρ Αντωνίου Π. στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το έδαφος των θερμοκηπίων αυτών είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανσή του, προ της καλλιέργειας τοματοφύτων, με ηλιοαπολύμανση ή εφαρμογή βρωμιούχου μεθύλιου κατά περίπτωση (Πίνακας 1),

Πίνακας 1. Στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

A/A	Στέλεχος	Είδος φυτού	Επέμβαση εδάφους
1	<b>P3</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ηλιοαπολύμανση (άπαξ)
2	<b>P11</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο
3	<b>P15</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο
4	<b>P14</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο
5	<b>P23</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ηλιοαπολύμανση (δισ)
6	<b>P29</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ηλιοαπολύμανση (άπαξ)
7	<b>P33</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο
8	<b>P40</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ηλιοαπολύμανση (άπαξ)

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν επίσης στελέχη ως μοντέλα για τη διαπίστωση τυχόν ανταγωνιστικής δράσης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών έναντι μυκήτων:

A) μη παθογόνων όπως *Mucor* sp., *Morchella* sp. και *Zygorhynchus* sp. από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας (Γενικής και Γεωργικής) του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

B) φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp. και *Fusarium* sp. από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ.

## 2.1 Ηλιοαπολύμανση

Η μέθοδος της ηλιοαπολύμανσης δοκιμάστηκε και εφαρμόστηκε πρώτη φορά στο Ισραήλ στα μέσα της δεκαετίας του '70 για την αντιμετώπιση εδαφογενών ασθeneιών. Η μέθοδος χρησιμοποιεί την ηλιακή θερμότητα για την αύξηση της θερμοκρασίας των επιφανειακών στρωμάτων του εδάφους. Αυτό επιτυγχάνεται τους θερμότερους μήνες του έτους (στη χώρα μας κυρίως Ιούλιο-Αύγουστο) χρησιμοποιώντας ειδικό διαφανές πλαστικό με το οποίο καλύπτεται η επιφάνεια του εδάφους αφού προηγουμένως ποτιστεί καλά. Με την ηλιοαπολύμανση επέρχονται χημικές και βιολογικές αλλαγές στο έδαφος. Η υγρή θερμότητα είναι ο σπουδαιότερος παράγοντας που μειώνει δραστικά τον πληθυσμό πολλών παθογόνων μικροοργανισμών και νηματωδών στο έδαφος δεδομένου ότι για πολλά από αυτά η αντιμετώπιση με χημικά μέσα δεν είναι αποτελεσματική (ΟΔΗΓΙΑ: Μ1./2011, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο).

## 2.3 Απολύμανση του εδάφους με τη χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου (Εισαγωγή)

Το βρωμιούχο μεθύλιο είναι ένα απολυμαντικό ευρέως φάσματος. Από τις 18-3-2009 σε όλα τα κράτη - μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης παύει η χορήγηση ή ανανέωση αδειών κυκλοφορίας στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, στη σύνθεση των οποίων περιέχεται το βρωμιούχο μεθύλιο. Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου - που κατεξοχήν χρησιμοποιείτο στην απολύμανση των εδαφών στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες - αποδείχθηκε ότι είναι επιβλαβές για τον άνθρωπο, το περιβάλλον και την υγεία των ζώων.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη από θερμοκηπιακό έδαφος που έχει υποστεί επέμβαση βρωμιούχου μεθυλίου, έχουν απομονωθεί πριν το έτος 2009.

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (NA), παρουσία 20% γλυκερόλης στους -80°C. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για διάστημα μερικών εβδομάδων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA.

## 2.4 Ομαδική και κολυμβητική κίνηση βακτηρίων

Τα στελέχη (P3 και P23) καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο (Nutrient Agar, NA) για τουλάχιστον 24 ώρες και 3μl καλλιέργειας ( $3-5 \times 10^9$  κύτταρα) εμβολιάζονται στην επιφάνεια ενός swarming τρυβλίου (NA στερεοποιημένο με 0.5% (w/v) άγαρ) ή 1-2mm κάτω από την επιφάνεια ενός swimming τρυβλίου ((NA στερεοποιημένο με 0.3% (w/v) άγαρ)). Ο εμβολιασμός και στις δυο περιπτώσεις γίνεται στο κέντρο του τρυβλίου. Τα τρυβλία επωάζονται για 18-24 ώρες στους 20, 25, 30 και 37 C°.

## 2.5 Έλεγχος της ανταγωνιστικότητας των στελεχών P3 και P23 με μύκητες

Η σύγκριση της ικανότητας των στελεχών P3 και P23 να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων εξετάστηκε μέσω της συν-καλλιέργειας των βακτηρίων και μυκήτων είτε σε swarming τρυβλία είτε σε κανονικά τρυβλία (NA στερεοποιημένο με 1.5% άγαρ). Καλλιέργεια (3μl) των στελεχών P3 και P23 εμβολιάστηκε 2.5-3 cm από το κέντρο του κανονικού ή του swarming τρυβλίου. Ο μύκητας (τμήμα  $0.6\text{cm}^2$  καλλιέργειας) εμβολιάστηκε στο κέντρο του τρυβλίου είτε ταυτόχρονα με καθένα από τα δυο στελέχη είτε 24 ωρίτερα.



## 2.6 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών

### 2.6.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - βακτήρια

Η απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit*.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB<sup>1</sup> εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία του κάθε, υπό μελέτη, στελέχους. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 30°C για 24 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µl διαλύματος R1.
- Εν συνεχεία προστίθενται 10 µl λυσοζύμης<sup>3</sup> (για Gram<sup>-</sup> βακτήρια). Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 20 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 180 µl διαλύματος R2 και 20 µl Proteinase K (10mg/100µl TE<sup>2</sup>). Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 20 min.
- Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθενται επιπλέον 20 µl RNase A<sup>4</sup>. Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 5 min.
- Προστίθενται 2 όγκοι (440 µl) από το διάλυμα BG. Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 10 min.
- Εν συνεχεία το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά στην ειδική στήλη, όπου φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA προσδένεται στη στήλη και το διάλυμα που διαπερνά αυτή απομακρύνεται.

- Προστίθενται 750 μl διαλύματος έκπλυσης (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα που διαπερνά τη στήλη απομακρύνεται.
- Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα έκπλυσης, καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, όπου πραγματοποιείται η έκλυση του DNA με προσθήκη 50 μl διαλύματος έκλυσης ή TE<sup>2</sup> ή ddH<sub>2</sub>O.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 2 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους 4 °C ή στους -20 °C.

## 2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

### 2.6.2.1 Αρχή της μεθόδου

Οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης θεωρούνται εργαλεία *in vivo* πολλαπλασιασμού του DNA. Ωστόσο, με την ανάπτυξη του συνθετικού DNA δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro*, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*.

Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94 °C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Εν συνεχεία, δύο κατάλληλα σχεδιασμένα, μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ'όψιν τα παρακάτω:

- Το μέγεθος των εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να κυμαίνεται σε λογικά πλαίσια
- Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA
- Η δομή των εκκινητών δεν θα πρέπει να είναι δευτεροταγής. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών δε θα πρέπει τα 3' άκρα τους να είναι συμπληρωματικά
- Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT
- Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C
- Στην περίπτωση όπου οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA, η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις είναι συνήθως στο κέντρο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο.

Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλωνο. Για τη συγκεκριμένη σύνθεση απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων  $Mg^{+2}$ .

Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του βακτηρίου *E. coli*. Εξαιτίας της θερμοαισθησίας του προαναφερθέντος ενζύμου και της καταστροφής του στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, συνήθως χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72 °C. Η δραστηριότητα, της αναφερόμενης ως *Taq* πολυμεράσης, παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατόπιν επανειλημμένης αύξησης της θερμοκρασίας στους 94 °C. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες μπορεί να επεκτείνονται πέρα από την αλληλουχία βάσεων που ορίζεται από τον άλλον εκκινητή και ως εκ τούτου, δημιουργούνται νέες θέσεις υβριδισμού των εκκινητών. Εν συνεχεία, οι αρχικές αλυσίδες καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94 °C, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί (n) φορές, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών, συμπεριλαμβάνοντας και τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την λειτουργία της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται, τόσο από την θερμοκρασία υβριδισμού, όσο και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στην μήτρα του DNA.

#### **2.6.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA, απευθείας από το DNA των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών, με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων ( κεφάλαιο 3).


Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από την πηγή προέλευσής του. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα 40-50 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ) (συνήθως είναι 5 °C κάτω από αυτήν). Οι ακριβείς συνθήκες, υπό τις οποίες τελούνταν οι αντιδράσεις της PCR για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (κεφάλαιο 3).

Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (100μl) προστίθενται:

1. Γονιδιωματικό DNA	50 ng
2. Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	1 μl
3. Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	1 μl
4. Μίγμα dNTPs (10mM)	1 μl
5. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα <sup>11</sup>	5 μl
6. DMSO	2μl
7. <i>Taq</i> DNA πολυμεράση (1unit/μl) <sup>l</sup>	0.5μl

Οι συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 2-4 min		35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min		
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 °C για 1 min		
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min / 1,3-15 kb αναμενόμενου προϊόντος		
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 5-10 min.		

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στη συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής 16S rRNA είναι οι εξής (Weisburg *et al.*, 1991):

**fD1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG**

**rD1 CAAGTCGTAAGGTTAGCCGT**

### 2.6.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων, βάσει του μεγέθους και της διαμόρφωσής τους, πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1-100 kb.

Τα τμήματα DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου<sup>6</sup>, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η προετοιμασία της πηκτής και των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Ποσότητα αγαρόζης αναμιγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE<sup>5</sup>. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης 1% και 3% (w/v), με εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA από 0,3-10kb.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να φτάσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου<sup>6</sup>, τελικής συγκέντρωσης 0,5mg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματισθούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.
- Εν συνεχεία η χτένα απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE<sup>5</sup> έτσι ώστε η πηκτή να παραμείνει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνεια του.
- Ακολουθεί ανάμιξη των δειγμάτων νουκλεϊνικών οξέων με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (1/10 του όγκου loading buffer)<sup>7</sup> και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης
- Τέλος στα άκρα της πηκτής εφαρμόζεται κατάλληλη τάση, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm<sup>-1</sup>.

#### 2.6.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *QIAquick Gel Extraction Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup>.

- Το τμήμα της πηκτής αγαρόζης το οποίο φέρει την επιθυμητή ζώνη DNA, απομονώνεται με τη χρήση νυστεριού. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf, ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (3 μl QG/mg πηκτής).
- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50 °C για 10 min (ανά 2-3min ανακινείται) μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης.

- Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης (1 μl ισοπροπανόλης/mg πηκτής).
- Το μίγμα ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε φορτισμένη στήλη *QIAQuick Spin* και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min
- Το DNA προσδένεται στην στήλη και το διάλυμα που διαπέρασε αυτήν απομακρύνεται.
- Ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 750 μl διαλύματος QG και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται για 1 min.
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30 μl ddH<sub>2</sub>O ή διαλύματος EB.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 1 min, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

### 2.6.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, πραγματοποιείται φωτομετρικά με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση, επιλέγεται από τον χειριστή το αντίστοιχο λογισμικό της συσκευής (DNA).

- Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1μl του εκάστοτε διαλύτη (H<sub>2</sub>O ή TE<sup>2</sup>).



- Ποσότητα δείγματος 1μl φωτομετρείται και λαμβάνονται οι λόγοι  $OD_{260}/OD_{280}$  και  $OD_{260}/OD_{230}$ , βάσει των οποίων εκτιμάται η καθαρότητα των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων
- Όταν ο λόγος  $OD_{260}/OD_{280}$  είναι 1,8 (περίπου) το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Μικρότερες τιμές της προαναφερθείσας αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών οι οποίες απορροφούν στα 280nm
- Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος  $OD_{260}/OD_{230}$ . Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, έχει δηλαδή τιμές υψηλότερες του  $OD_{260}/OD_{280}$ . Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων.

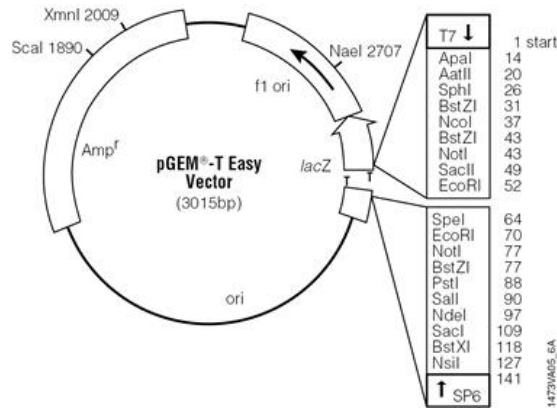
## 2.6.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

### 2.6.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο pGEM-T Easy (Promega) (Εικόνα 2.1). Σκοπός της χρήσης του, είναι η υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA, προκειμένου να καταστεί ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του προαναφερθέντος φορέα, αναφέρεται ότι οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (ori) και τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E. coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου. Το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων, ενώ η μεταγραφή μπορεί να επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίδιο). Η β-γαλακτοζιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή ουσία μπλε χρώματος. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέτη ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ*, με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal.

Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 15. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega)

### 2.6.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Λόγω των κολλωδών άκρων των τμημάτων DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιείται για την κλωνοποίησή τους ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T easy (Promega) (Εικόνα 2.1). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, αφενός για να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους, αφετέρου για να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου DNA γίνεται με τρόπο ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Σε αντίδραση ενσωμάτωσης τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

1. DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
2. DNA ένθεσης	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης <sup>8</sup>	1 μl
4. Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
5. ddH <sub>2</sub> O	6 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 4 °C για 3h ή 16h αντίστοιχα.

## 2.6.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

### 2.6.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>1</sup>, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (παραρτήματα Β'). Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

### 2.6.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells)

- 10 ml LB<sup>1</sup> θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος XL-blue) και επωάζονται, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 18 h στους 37°C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB<sup>1</sup>. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, ωσότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.<sub>600</sub>=0,3-0,4).
- Οι χειρισμοί που ακολουθούν πραγματοποιούνται στους 4°C.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 50 ml διαλύματος 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.

- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και διατηρείται σε πάγο για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού διαμοιραστούν σε σωλήνες τύπου erpendorf φυλάσσονται στους -80 °C.

### 2.6.7.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

- Σε σωλήνα τύπου erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl, δεκτικά για μετασηματισμό κύτταρα *Escherichia coli*
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA (αφότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασηματισμό κυττάρων.
- Ακολουθεί επώαση του μίγματος κυττάρων-πλασμιδιακού DNA, στον πάγο για 30 min.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα, επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (Heat-Shock) στους 42 °C για 1 min και την απ' ευθείας μεταφορά τους, στη συνέχεια, στον πάγο.
- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB<sup>I</sup> και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 h.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB<sup>I</sup> και κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T easy), ώστε να επιτευχθεί η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.
- Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10μl διαλύματος IPTG 100mM<sup>9</sup> και 50μl διαλύματος 2%<sup>10</sup> (w/v) X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές.

Αντίθετα, οι αποικίες με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ενζύμου, εμφανίζουν μπλε χρώμα.

- Τέλος, τα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 18 h.

### 2.6.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup> σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB<sup>1</sup> που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό-αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 16 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου erppendorf και φυγοκεντρώνται στις 6000 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1, το οποίο εμπεριέχει RNase A.
- Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2 (περιέχει NaOH), το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 min. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος N3 (περιέχει οξικό οξύ και υδροχλωρική γουανιδίνη), ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη *QIAprep*.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη και το διάλυμα που την έχει διαπεράσει απομακρύνεται.
- Προστίθενται 350  $\mu$ l διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεμένου στη στήλη DNA, με την προσθήκη 30  $\mu$ l διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH= 8,5) ή ddH<sub>2</sub>O και αφήνεται σε ηρεμία για 1 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

### 2.6.9 Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Τόσο η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA, όσο και η ποσότητα του ενζύμου περιορισμού, καθορίζουν το συγκεκριμένο όγκο. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20  $\mu$ l-100  $\mu$ l.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε σωλήνα τύπου erpendorf τοποθετούνται: το δείγμα DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο απαιτείται για την δράση του ενζύμου. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθεται επιπλέον και RNase A<sup>4</sup>. Τέλος προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

- Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC (όπου /: ορισμός σημείου πέψης στην αλληλουχία) και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 37 °C.

Σε μια τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30 μl αναμιγνύονται:

1. Διάλυμα DNA 1 μg (σε H <sub>2</sub> O ή TE <sup>2</sup> )	έως 10μl
2. Ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl)	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
4. RNase A <sup>4</sup> (1 mg/ml)	0,5 μl
5. ddH <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 30 μl

- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 h.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

#### 2.6.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup>, εστάλη για αυτόματη αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην εταιρεία MWG (Germany). Για κάθε κλώνο παρελήφθησαν 750-900bp και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα DNASTar ως προς την εύρεση τμημάτων που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον φορέα pGEM-Teasy, δηλαδή εντοπισμός των εκκινητών που οριοθετούν το τμήμα του DNA που έχει υποκλωνοποιηθεί.

#### 2.6.11 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών, με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

Η ευθυγράμμιση των υποκλώνων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω του αλγόριθμου πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W (Thompson et al., 1994), του προγράμματος Lasergene 7.0.

Η εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2011).

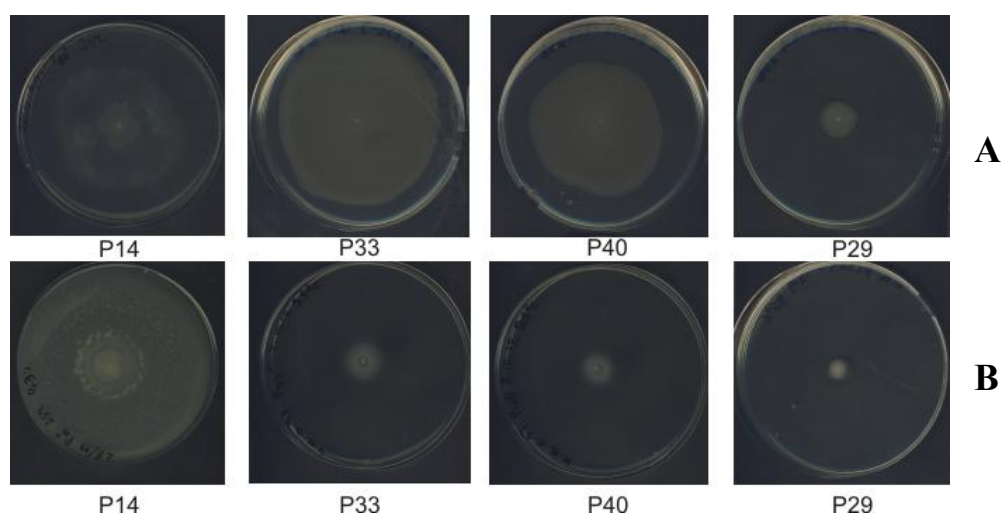
Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining, μέσω του προγράμματος MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.



### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

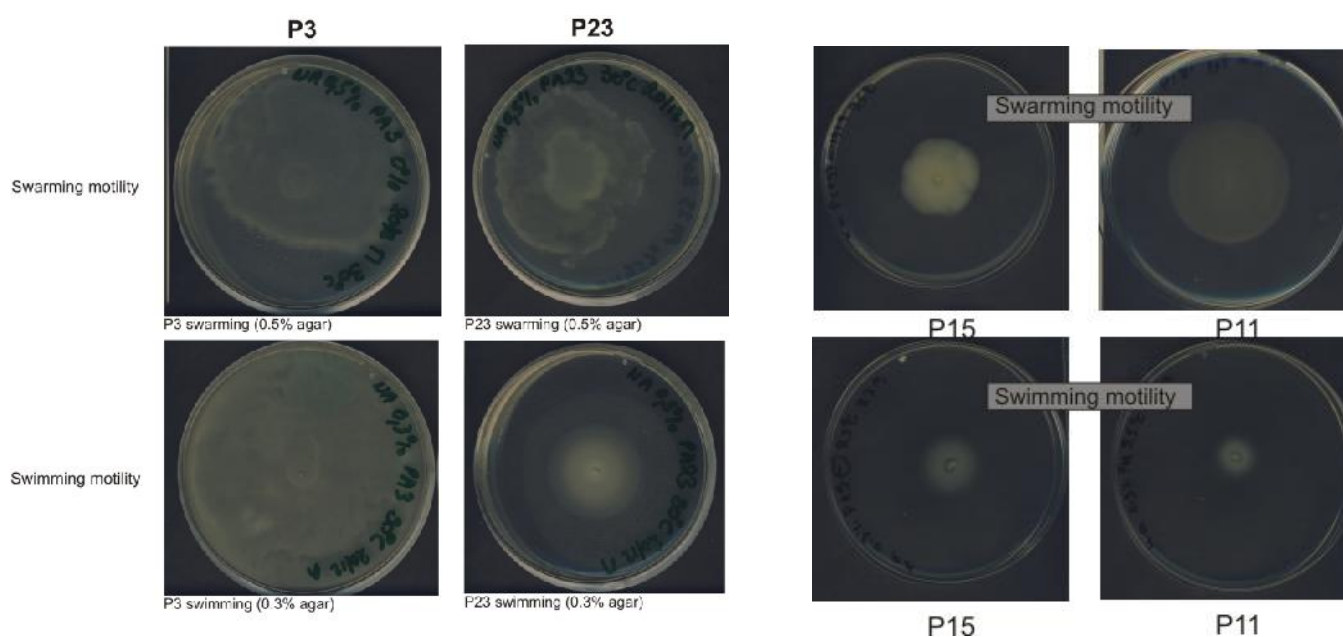
### 3. 1 Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης των υπό μελέτη στελεχών

Τα στελέχη P14, P33, P40 και P29 εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους για Α) ομαδική κίνηση σε επιφάνεια σε 0.5% ΝΑ άγαρ (swarming motility) και Β) σε 0.3% ΝΑ-άγαρ (swimming motility). Στην εικόνα 16 παρατηρούμε ότι τα στελέχη P14, P33 και P40 παρουσιάζουν ιδιαίτερα έντονη ικανότητα εξάπλωσης σε επιφάνεια (swarming), ενώ η κίνησή τους σε ημιστερεό μέσο (swimming) φαίνεται περιορισμένη κατά τις ίδιες ώρες ανάπτυξης με εξαίρεση το P14. Το στέλεχος P29 φαίνεται να μην έχει ιδιαίτερη ικανότητα ανάπτυξης στις παραπάνω συνθήκες.



Εικόνα 16. Ομαδική κίνηση σε επιφάνεια (Α) και κολυμβητική κίνηση (Β) στελεχών που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα τοματοφύτων. Η παρατήρηση και φωτογράφιση πραγματοποιήθηκε μετά από 20 ώρες επώαση στους 30°C.

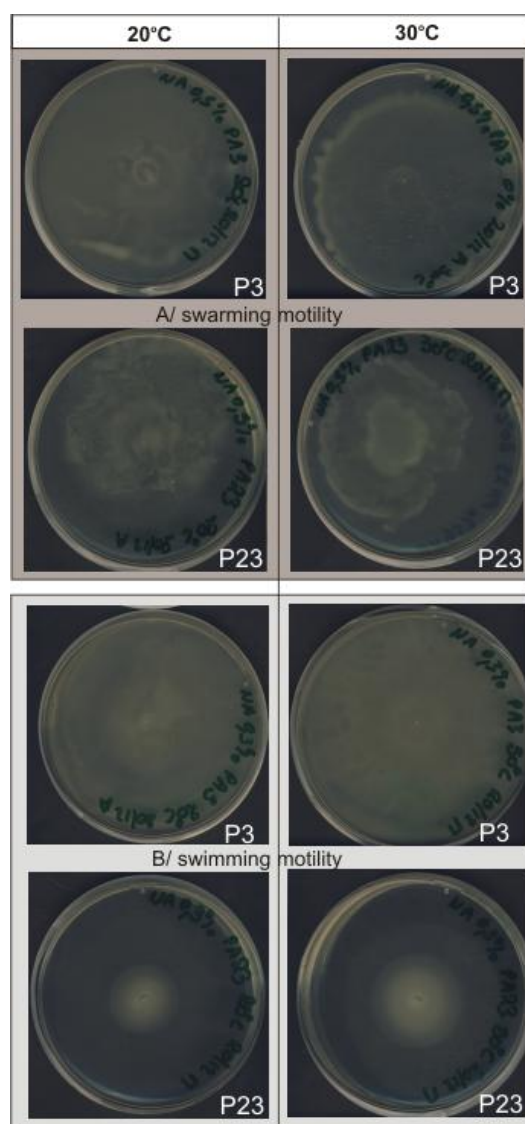
Επίσης διερευνήθηκε η ομαδική κινητικότητα και κολυμβητική κινητικότητα των στελεχών P3, P11, P15 και P23. Τα αποτελέσματα έδειξαν τα στελέχη P3 και P23 επέδειξαν αξιοσημείωτη ομαδική κίνηση σε επιφάνεια, όπως επίσης αξιοσημείωτη είναι η κίνησή τους σε ημιστερεό μέσο (Εικόνα 16). Για το λόγο ταυτοποιήθηκαν βάση του 16S rRNA γονιδίου τους και μελετήθηκε η ανταγωνιστική ικανότητα τους έναντι μυκήτων.



Εικόνα 17. Ομαδική κίνηση σε επιφάνεια (swarming motility) και κολυμβητική κίνηση (swimming motility) των στελεχών P3, P11, P15 και P23 που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα τοματόφυτων. Η παρατήρηση και φωτογράφιση πραγματοποιήθηκε μετά από 20 ώρες επώαση στους 30°C.

### 3. 2 Ομαδική κίνηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες

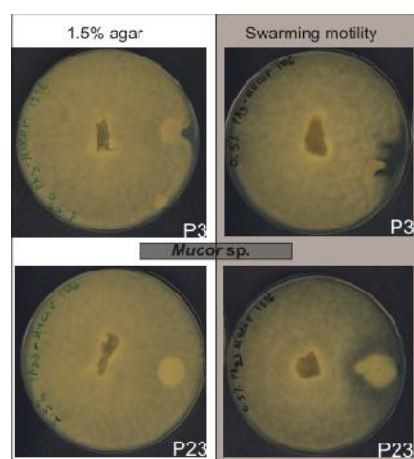
Διερευνήθηκε η ικανότητα των στελεχών P3 και P23 να αναπτύσσονται σε ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarming) και κίνηση σε ημιστερεό μέσο (swimming) στους 20°C, 42°C, 30°C και 37°C. Στην Εικόνα 18 παρατηρούμε τη συμπεριφορά τους μετά από επώαση σε θερμοκρασία 20°C και 30°C, όπου δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη διαφορά. Στις θερμοκρασίες 37°C και 42°C τα βακτήρια δεν ανέπτυξαν καμία από τις δύο ομαδικές κινήσεις.



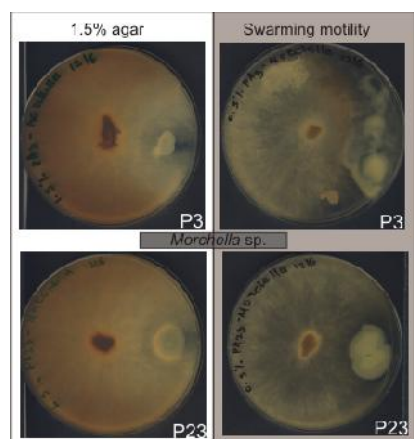
Εικόνα 18. Διερεύνηση της ικανότητας των στελεχών **P3** και **P23** να αναπτύσσονται σε ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (swarming) και κίνηση σε ημιστερεό μέσο (swimming) στους 20°C και 30°C.

### 3.3 Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P3 και P23 έναντι μη παθογόνων μυκήτων

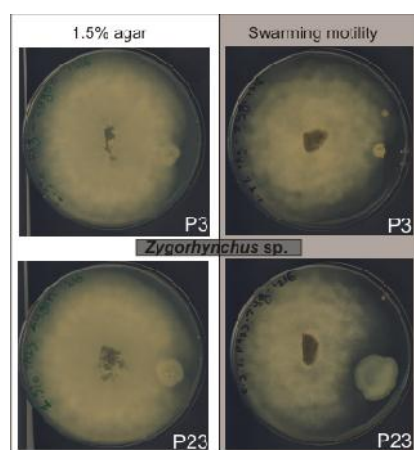
Η ικανότητα των στελεχών P3 και P23 να ανταγωνίζονται μη-παθογόνους μύκητες εξετάστηκε μέσω συν-καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο NA το οποίο φέρει 1.5% ή 0.5% άγαρ ως στερεοποιείτο παράγοντα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος P23, όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο στερεοποιημένο με 1.5% άγαρ, δεν φαίνεται να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων (Εικόνα 5). Αντίθετα, όταν παρουσιάζει το φαινόμενο της ομαδικής κίνησης (swarming motility), παρεμποδίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη των μυκήτων *Mucor* sp., *Morchella* sp. και *Zygorhynchus* sp. (Εικόνα 19).



***Mucor* sp.**



***Morchella* sp.**

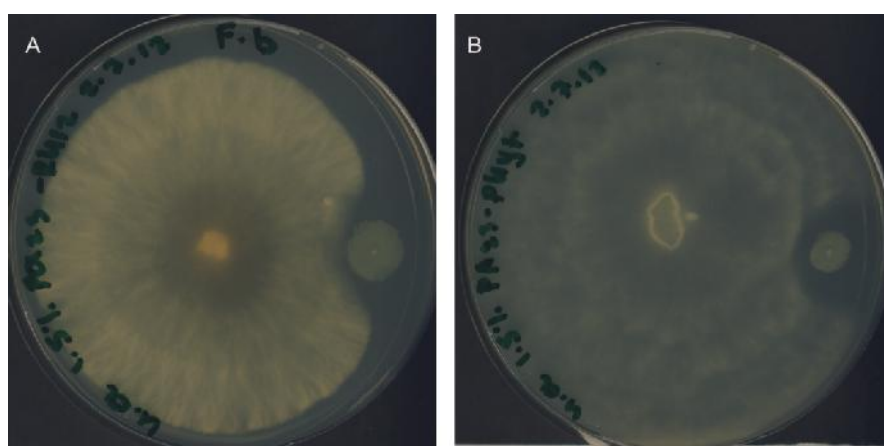


***Zygorhynchus* sp.**

Εικόνα 19. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων κατά την ανάπτυξη των στελεχών σε θρεπτικό μέσο NA που φέρει ως στερεοποιείτο παράγοντα 1.5% ή 0.5% άγαρ (swarming motility).

### 3.4 Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P3 και P23 έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων

Η ικανότητα των στελεχών P3 και P23 να ανταγωνίζονται εξετάστηκε μέσω συνκαλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο NA το οποίο φέρει 1.5% άγαρ ως στερεοποιείτο παράγοντα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δυο στελέχη αναχαιτίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Phytophthora* sp (Εικόνα 20).



Α/ P23 εναντίον του μύκητα Α/ *Rhizoctonia solani* και Β/ *Phytophthora* sp. σε 1.5% NA-άγαρ.

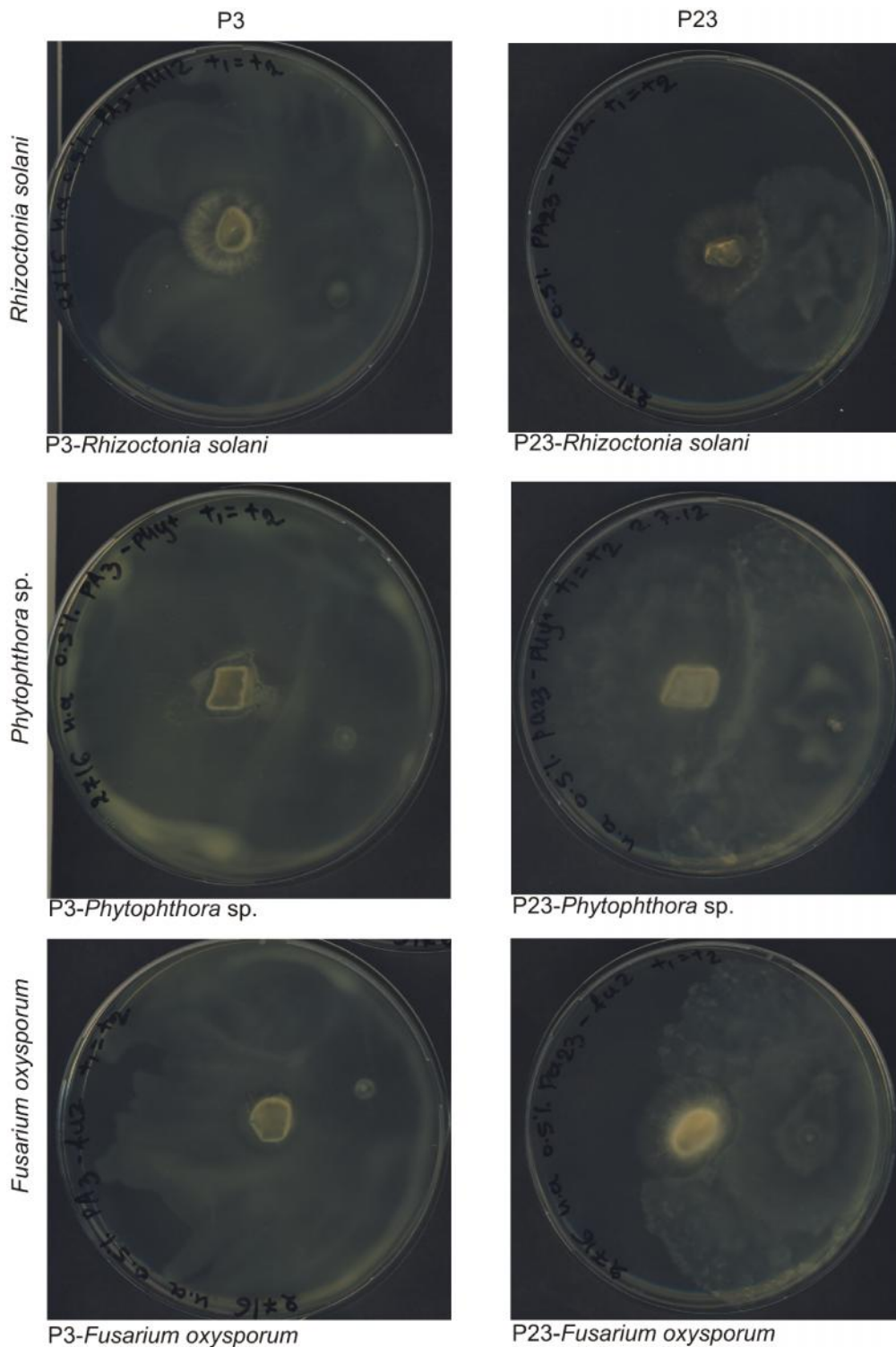
Εικόνα 20. Τα στελέχη P3 και P23 παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

### 3.5 Η ομαδική κίνηση των στελεχών P3 και P23 παρεμποδίζει την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων

Η ικανότητα των στελεχών P3 και P23, όταν παρουσιάζουν τον φαινότυπο της ομαδικής κίνησης, να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτοπαθολόγων μυκήτων εξετάστηκε σε δυο παρόμοια πειράματα. Στο πρώτο πείραμα ο μύκητας και τα στελέχη P3 ή P23 εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα στα swarming τρυβλία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη των μυκήτων παρεμποδίστηκε ολοκληρωτικά (Εικόνα 21Α). Πιθανά αυτό να οφείλεται στην ταχύτερη εξάπλωση των βακτηρίων στο τρυβλίο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του μύκητα. Στο δεύτερο πείραμα επιτρέψαμε στους μύκητες να αναπτυχθούν για 24 ώρες και μετά εμβολιάσαμε το τρυβλίο με τα στελέχη P3 ή P23. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και

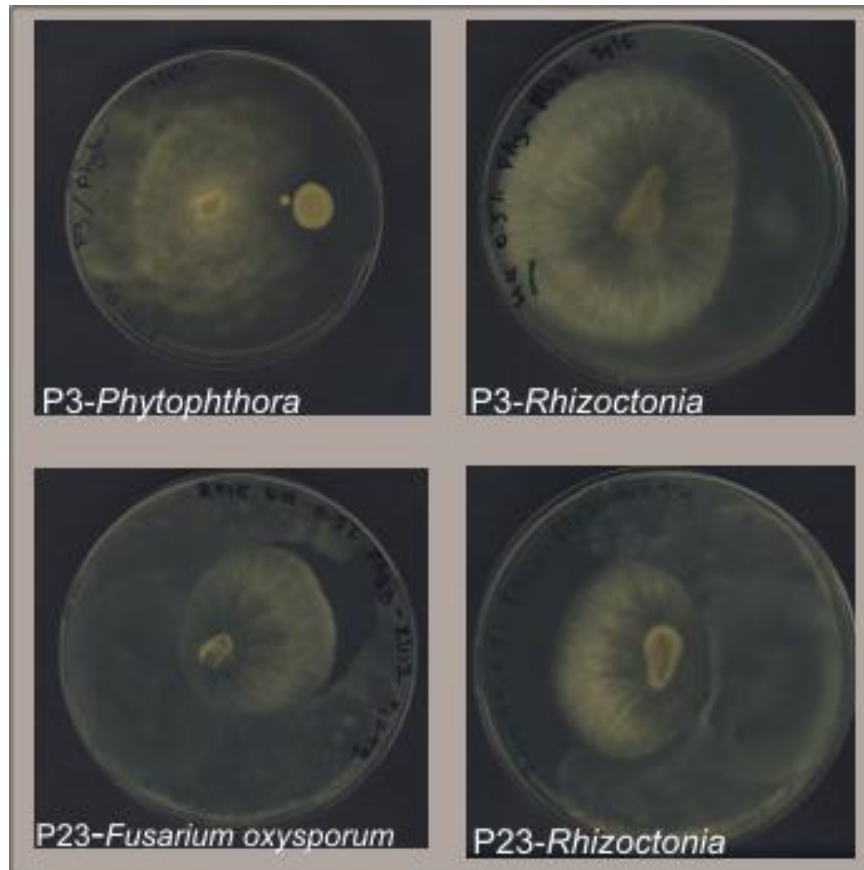
τα δυο στελέχη αναχαιτίσαν αποτελεσματικά την ανάπτυξη των μυκήτων (Εικόνα 21B). Ιδιαίτερα εντυπωσιακή είναι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων από το στέλεχος P23. Το στέλεχος P23 κατά την ομαδική κίνηση φαίνεται να έρχεται σε επαφή με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium* και τον απωθεί. Αντίθετα το στέλεχος P23 απωθεί (αναχαιτίζει) τον αναπτυσσόμενο μύκητα *Rhizoctonia* χωρίς να έρχεται σε επαφή.

A) Ο εμβολιασμός των στελεχών P3 ή P23 και των μυκήτων πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα





Β) Ο εμβολιασμός των μυκήτων προηγήθηκε κατά 24 ώρες του εμβολιασμού των βακτηρίων P3 ή P23



Εικόνα 21. Η ομαδική κίνηση των στελεχών P3 και P23 παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων ανεξάρτητα από στάδιο ανάπτυξης τους. Ο εμβολιασμός των στελεχών P3 και P23 και των μυκήτων έγινε ταυτόχρονα (Α). Ο εμβολιασμός των μυκήτων προηγήθηκε κατά 24 ώρες του εμβολιασμού των βακτηρίων P3 και P23 (Β).



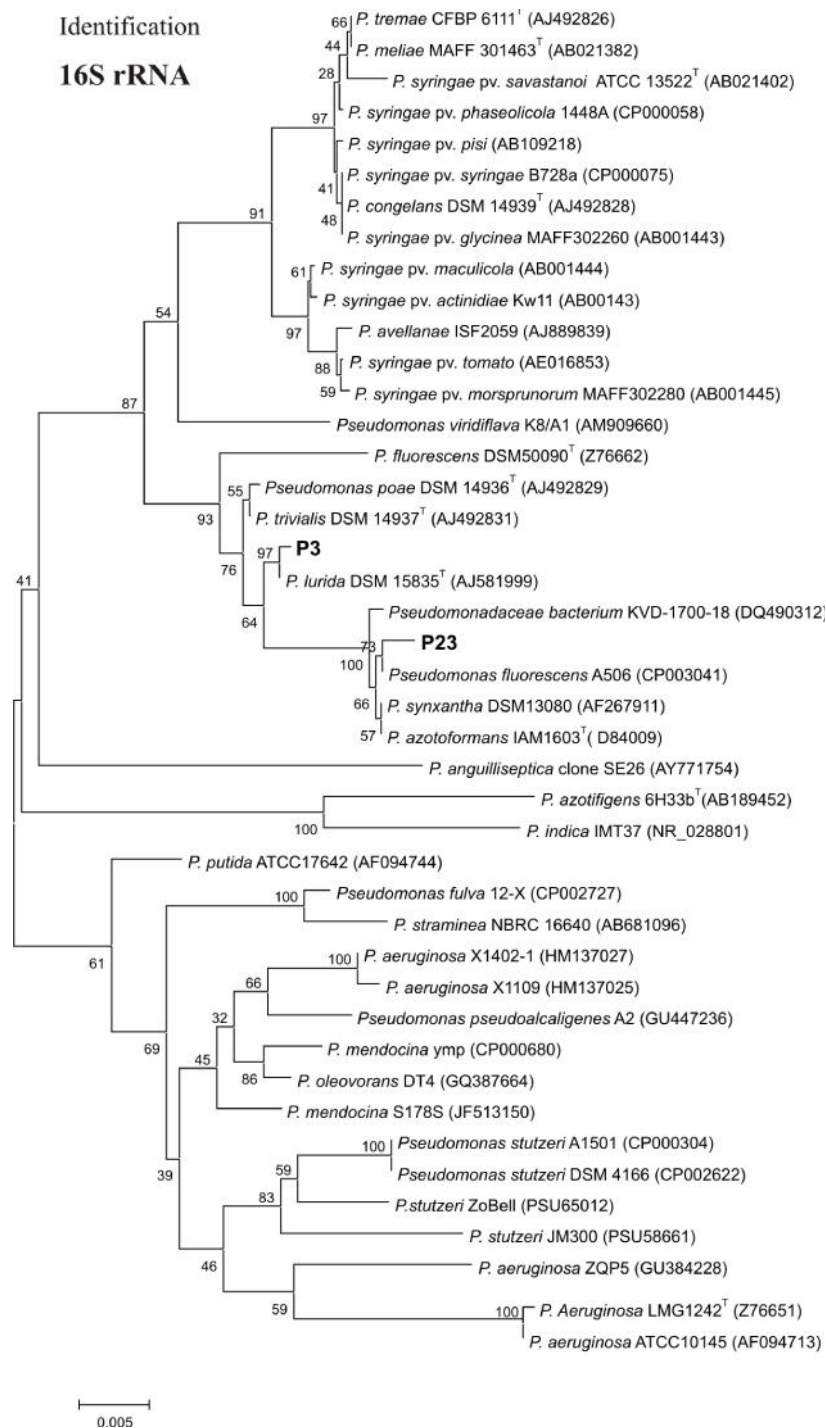
### 3.6 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών P3 και P23 τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα τοματοφύτων

Τα στελέχη P3 και P23 ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA. Στοιχίση των διαθέσιμων αλληλουχιών (multiple alignment) του 16S rRNA των στελεχών P3 και P23 έδειξε μεγάλη ομολογία με το 16S rRNA των τυπικών στελεχών βάσει του προγράμματος EzTaxon (Chun et al., 2007). Το P3 παρουσιάζει ομολογία 99.933% με το *Pseudomonas lurida* DSM 15835<sup>T</sup>, ενώ το P23 παρουσιάζει ομολογία 99.462% με το *Pseudomonas azotoformans* IAM1603<sup>T</sup> (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ομολογία του 16S rRNA γονιδίου των στελεχών P3 και P23 με τυπικά στελέχη

Στέλεχος	16S rRNA identification	Ομολογία με το τυπικό στέλεχος (EzTaxon)
<b>P3</b>	<i>Pseudomonas lurida</i>	99.933%
<b>P23</b>	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99.462%

Φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA των υπό διερεύνηση στελεχών επιβεβαίωσε ότι τα στελέχη P3 και P23, ομαδοποιούνται με τα τυπικά στελέχη *Pseudomonas lurida* και *Pseudomonas azotoformans*, αντίστοιχα. Το στέλεχος P23 ιδιαίτερα ομαδοποιείται κοντά στα *Pseudomonas fluorescents*, *P. synxantha* και παρουσιάζει ομολογία με αυτά μεγαλύτερη του 99% (Εικόνα 22). Τούτο είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον διότι μέχρι σήμερα τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που παρουσιάζουν βιολογική ανταγωνιστικότητα έναντι των μυκήτων ανήκουν στα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas aeruginosa* (McSpadden Gardener, 2007)



Εικόνα 22. Φυλογενετικό δέντρο των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς κατασκευασμένο με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τυπικά στελέχη των, *P. mendocina*, *P. fulva*, *P. aeruginosa*, *P. syringae* και *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. congelans*, *P. balearica*, *P. stutzeri*, *P. poae*, *P. trivialis*, *P. lurida*, *P. azotoformans*, *P. syringae* κ.α. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2011) και η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αποικισμός της ριζόσφαιρας και της ρίζας από ανταγωνιστικά βακτήρια είναι βασική προϋπόθεση για την επιτυχημένη βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων. Η επιβίωση και η ανάπτυξη του ανταγωνιστικού βακτηρίου, η χημειοτακτική κίνηση, η πρόσδεση του στη ρίζα καθώς και η ομαδική κίνηση και ο σχηματισμός βιοϋμένων αποτελούν επιθυμητά γενετικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού βακτηρίου (Lugtenberg and Kamilova , 2009). Η ερευνητική ομάδα του Lugtenberg έδειξε ότι μεταλλαγμένα στελέχη (απενεργοποιήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στον χημειοτακτισμό) της *Pseudomonas fluorescens* , σε σύγκριση με το άγριου τύπου στέλεχος, επέδειξαν τόσο μειωμένη κινητικότητα όσο και μειωμένα επίπεδα αποικισμού της ρίζας των φυτών ντομάτας (de Weert et al.,2003). Η ανταγωνιστική *P. fluorescens* F113 φαίνεται να παρουσιάζει μια φαινοτυπική ποικιλομορφία σχηματίζοντας τρεις διαφορετικής μορφής αποικίες, οι οποίες επιδεικνύουν διαφορετική κινητικότητα. Εξέταση όλων των φαινοτυπικά διαφορετικών στελεχών έδειξε ότι το στέλεχος με την καλύτερη κινητικότητα επέδειξε τον καλύτερο αποικισμό της ρίζας, σε σύγκριση με τα άλλα στελέχη, των φυτών τομάτας (Martinez-Granero et al., 2006). Η ομάδα του Losick έδειξε ότι η επιτυχής ανταγωνιστική δράση στελεχών *Bacillus subtilis* έναντι της *Rastonia solanacearum* εξαρτάται τόσο από γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό βιοϋμένων όσο και από την παράγωγή του κυκλικού λιποπεπτιδίου, surfactin (Chen et al., 2012). Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειώσουμε ότι η παραγωγή της surfactin είναι βασική προϋπόθεση για την ομαδική κίνηση του *B. subtilis*. Ως εκ τούτου, ο φαινότυπος της ομαδικής κινητικότητας φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταγωνιστικότητα των βακτηρίων. Απενεργοποίηση του γονιδίου FlhC το οποίο εμπλέκεται στην ομαδική κινητικότητα της ανταγωνιστικής *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, παρεμπόδισε την έκκριση της βακτηριοσίνης carosin με αποτέλεσμα την απώλεια τόσο της ομαδικής κίνησης όσο και της ανταγωνιστικής δράσης του βακτηρίου έναντι του παθογόνου (Chan et al., 2009 ).

Στην παρούσα μελέτη καταρχήν αξιολογήθηκε ο φαινότυπος της ομαδικής κίνησης οκτώ στελεχών *Pseudomonas* τα όποια απομονώθηκαν από έδαφος θερμοκηπίου το όποιο είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανση του με

ηλιοαπολύμανση ή εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου. Τα στελέχη τα οποία παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εξάπλωση (P3 και P23) σε swarming τρυβλία, ταυτοποιήθηκαν με βάση τις αλληλουχίες βάσεων του γονιδίου 16S. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη P3 και P23 ανήκουν στο είδος *Pseudomonas lurida* και *Pseudomonas azotoformans*, αντίστοιχα. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της ομαδικής κινητικότητας των στελεχών P3 και P23 και της ανταγωνιστικής δράσης τους (in vitro) έναντι παθογόνων και μη παθογόνων μυκήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κανονικά τρυβλία (θρεπτικό μέσο NA και 1.5% άγαρ) και τα δυο στελέχη φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Εικόνα 21). Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην έκκριση χημικών ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση (2,4-diacetylphloroglucinol phenazine, promylasin και pyoluteorin ), σιδηροφόρων (pyoverdine ) ή βακτηριοσινών (lectin-like bacteriocins ) (Haas and Defago 2005, Parret et al., 2005, Li et al., 2010, Raaijmakers et al., 2010). Οι βακτηριοσίνες και οι αντιμικροβιακές ενώσεις διαχέονται στην επιφάνεια του τρυβλίου και έτσι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων. Η παρεμπόδιση αυτή μπορεί επίσης να οφείλεται στην παράγωγή εξαερώσιμων ενώσεων όπως το HCN (Haas and Defago, 2005).

Ο Andersen έδειξε ότι η συνεργιστική δραστηριότητα της ομαδικής κινητικότητας της *Pseudomonas* sp. DSS73 και η παράγωγή μιας ομάδας αντιμικροβιακών ενώσεων αναχαιτίζει και τερματίζει την ανάπτυξη των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum* (Andersen et al., 2003). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα στελέχη P3 και P23 αναχαιτίζουν την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και μη-παθογόνων μυκήτων (Εικόνα 21). Ως εκ τούτου, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί ο μηχανισμός αυτής της αναχαιτίσης και να προσδιοριστούν οι αντιμικροβιακές ενώσεις που εκκρίνονται από τα δυο στελέχη.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersen JB, Koch AB, Nielsen TH, Sørensen D, Hansen M, Nybroe O, Christophersen C, Sørensen J, Molin S, Givskov M. 2003. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology*. 147: 37-46.

Butler MT, Wang Q, Harshey RM. 2010. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:3776–3781.

Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, O'Toole GA. 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189: 2601-3612.

Chan YC, Wu HP, Chuang DY. 2009. Extracellular secretion of Carocin S1 in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* occurs via the type III secretion system integral to the bacterial flagellum. *BMC Microbiol.* 9:181.

Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R, Guo JH. 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.

Chun J, Lee H-K, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim Y-M. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2259 -2261.

De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ. 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Inter.* 15: 1173-1180.

- De Weert S, Kuiper I, Legendijk EL, Lamers GE, Lugtenberg BJ. 2004. Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:1185–1191.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology.* 149:2005–2013.
- Fan B, Carvalhais LC, Becker A, Fedoseyenko D, von Wirén N, Borriss R. 2012. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol.* 12:116.
- Ghelardi E, Celandoni F, Salvetti S, Ceragioli M, BeecherDJ, Senesi S, Wong CL. 2007. Swarming behavior of an hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4089-4095.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 95-108.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249-273.
- Hibbing M, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:15-25.
- Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. 2007. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 189:950-957.
- Julkowska D, Obuchowski M, Holland IB, Séror SJ. 2004. Branch swarming patterns on a synthetic medium formed by wild type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of

different cellular morphologies and constellations of cell as the complex architecture develops. *Microbiology* 150:1839-1849.

Kearns D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* 8(9): 634–644

Lai HC, Soo PC, Wei JR, Yi WC, Liaw SJ, Horng YT, Lin SM, Ho SW, Swift S, Williams P. 2005. The *RssAB* two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J. Bacteriol.* 187:3407-3414.

Li W, Estrada-de los Santos P, Matthijs S, Xie GL, Busson R, Cornelis P, Rozenski J, De Mot R. 2012. Promylasin, a salicylate-containing *Pseudomonas putida* antibiotic, promotes surface colonization and selectively targets other *Pseudomonas*. *Che. Biol.* 18: 1320-1330.

Lugtenberg B, Kamilova F: 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63:541–556.

McSpadden Gardener BB. 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 97:221–226

Mastropaolo MD, Silby MW, Nicoll JS, Levy SB. 2012. Novel genes involved in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 motility and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4318-4329.

Martinez-Granero F, Rivilla R, Martin M. 2006. Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3429–3434.

Matilla MA, Ramos JL, Duque E, de Dios Alché J, Espinosa-Urgel M, Ramos-González MI. 2007. Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 9:1842-1850.

Matsuyama T, Bhasin A, Harhsey RM. 1995. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low agar medium. J. Bacteriol. 177:987-991.

Michaels B, Tisa LS. 2011. Swarming motility of *Photobacterium temperate* is influenced by environmental conditions and uses the same flagella as that used in swimming motility. Can. J. Microbiol. 57:196-203.

Nogales J, Bernabéu-Roda L, Cuéllar V, Soto MJ. 2012. ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 194:2027-2036.

O'Rear J, Alberti L, Harshey RM. 1992. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. J. Bacteriol. 174:6125–6137.

Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. J. Bacteriol. 190:2671–2679.

Overhage J, Lewenza S, Marr AK, Hancock RE. 2007. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-*lux* mutant library. J. Bacteriol. 189:2164–2169.

Parret, A.H.A., Temmerman, K., De Mot, R. 2005. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5197–5207.

Pearsons MM, Rasko DA, Smith SN, Mobley HL. 2010. Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis*. Infect. Immun. 28:7834-7845.

Pehl MJL, Jamieson WD, Kong K, Forbester JL, Fredendall RJ, Gregory GA, McFarland JE, Healy JM, Orwin PM. 2012. Genes that influence swarming motility and biofilm formation in *Variovorax paradoxus* EPS. PLoS ONE. 7: e31832.



Potvin, E., Lehoux D E, Kukavica-Ibrulj I, Richard K L, Sanschagrin F, Lau GW, Levesque RC. 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ. Microbiol.* 5: 1294–1308

Quinones B, Dulla G, Linlow SE. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharides production, motility and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Micr. Interact.* 18:682-693.

Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062.

Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW, Bais HP. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148:1547-1556.

Salveti S, Faegri K, Ghelardi E, Kolstø AB, Senesi S. 2010. Global gene expression profile for swarming *Bacillus cereus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5149-5156.

Soutourina OA, Semenova EA, Parfenova VV, Danchin A, Bertin P. 2001. Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3852-3859.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.

Toutain CM, Zegans ME, O'Toole GA. 2005. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187:771–777.

Tremblay J, Deziel E. 2010. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genom.* 11:587.

Tremblay J, Richardson A-P, Lepine F, Déziel E. 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behavior. Environ. Microbiol. 9:2622-2630.

Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J. 2008 Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends Microbiol. 16:496–506.

Wang Q, Frye JG, McClelland M, Harshey RM: 2006. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium* : genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. Mol. Microbiol. 52:169-197.

Wang L, Zhang C, Gong F, Li H, Xie X, Xia C, Chen J, Song Y, Shen A, Song J. 2012. Influence of *Pseudomonas aeruginosa pvdQ* gene on altering antibiotic susceptibility under swarming conditions. Cur. Microbiol. In Press.

Weisburg WS, Barns SM, Pelletier DA, Lane DI. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol.173:697-703.

Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. 2007. The Flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. PLoS ONE. 2: e564.