

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ&ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.

ΓΑΒΡΙΗΛΙΔΟΥ Γ. ΜΑΡΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

Η ανάθεση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας με θέμα: «Διερεύνηση της ομαδικής κινητικότητας ανταγωνιστικών βακτηρίων έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων», έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης (13η Συνεδρία/07.06.2013) του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας , κατά την οποία ορίστηκε η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια (Μέλος)



Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών», του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πριν ξεκινήσω θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ όσους με βοήθησαν στη διεκπεραίωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Τον καθηγητή, και επιβλέποντα, κ.Κατινάκη Παναγιώτη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το θέμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την επιστημονική καθοδήγησή του όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Την διδάκτορα κ.Βενιεράκη Αναστασία, για τη συνεχή υποστήριξη, τις συμβουλές της και την ουσιαστική βοήθεια κατά την εκτέλεση των πειραμάτων αλλά και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Την κ.Παπαμελετίου Πόπη για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια της στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

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

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1.1 Βακτήρια	9
1.2 Ταξινόμηση Βακτηρίων	9
1.3 Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	11
1.4 Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών.....	15
1.5 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα.....	16
1.5.1 Η χρήση παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στη βιολογική καταπολέμηση.....	18
1.6 Βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού(PGPB)	19
1.7 Τα βακτήρια ως βιολογικοί παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	21
1.8 Μηχανισμοί καταστολής φυτοπαθογόνων μυκήτων από βακτηριακούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.....	23
1.8.1 Αντιμικροβιακές ενώσεις από βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	26
1.8.1.2 Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών που παράγονται από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas spp.</i>	28
1.8.2 Ανταγωνισμός για θρεπτικά και κατάληψη των διαθέσιμων στο ριζικό σύστημα των φυτών θέσεων αποικισμού.- Παραγωγή σιδηροφόρων.....	35
1.8.3 Επαγόμενη διασυστηματική ανοχή-ISR(Induced Systemic Resistance).....	37
1.9 Η κινητικότητα των βακτηρίων. Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας.....	39
1.9.1 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων σε επιφάνειες.....	40
1.9.1.1 Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών στην ομαδική κινητικότητα.....	41
1.9.1.2 Ο ρόλος της υγρασίας και της ρευστότητας του θρεπτικού στην ομαδική κινητικότητα.....	42
1.9.1.3 Ο ρόλος της θερμοκρασίας και της αλατότητας στην ομαδική κινητικότητα. ...	43
1.10.1 Προϋποθέσεις που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα: η ύπαρξη μαστιγίων..	44
1.10.2 Επιφανειοδραστικές ουσίες.....	49
1.11 Φαινότυποι που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα.....	54
1.11.1 Η περίοδος υστέρησης(<i>swarming lag</i>).	54
1.11.2 Η επιμήκυνση των κυττάρων.....	55
1.11.3 Δημιουργία μοτίβων των αποικιών.....	56

1.11.4	Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή μολυσματικότητα και την υψηλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.	59
1.12	Ομαδική κινητικότητα και σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού.	62
1.13	Γονίδια που επάγονται ή/και καταστέλλονται κατά την ομαδική κινητικότητα....	65
1.14	Ομαδική κινητικότητα και βιοφίλμ.	70
1.15	Σκοπός μελέτης.	73
2	Υλικά και μέθοδοι.....	74
2.1	Βακτηριακά στελέχη-Βιολογικό υλικό.	74
2.2	Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών.	75
2.2.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)-Αρχή της μεθόδου.	75
2.2.2	Ενίσχυση του τμήματος DNA.	76
2.2.3	Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτική αγαρόζη.....	77
2.2.4	Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτική αγαρόζη....	78
2.2.5	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.	79
2.2.6	Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	79
2.2.6.1	Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.	79
2.2.6.2	Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation).	80
2.2.7	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	80
2.2.7.1	Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	80
2.2.7.2	Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells).	80
2.2.7.3	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο.	81
2.2.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i>	82
2.2.9	Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού.	83
2.2.10	Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing).	84
2.2.11	Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση.....	84
3	Αποτελέσματα.....	85
3.1	Διερεύνηση της ομαδικής κινητικότητας του στελέχους P14	85
3.2	Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P14 και P21 έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων.	87

3.3 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών P14 και P21 τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα τοματοφύτων.....	97
4 Συζήτηση	99
Βιβλιογραφία	103

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν δυο στελέχη του γένους *Pseudomonas sp.* τα οποία έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα φυτών τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπιακής καλλιέργειας, όπου το έδαφος των θερμοκηπίων αυτών είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανσή του, προ της καλλιέργειας των τοματόφυτων με εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου. Η ομαδική κινητικότητα (swarming motility) των στελεχών, P14 και P21 αξιολογήθηκε σε κατάλληλα τρυβλία με περιεκτικότητα σε άγαρ 0,5% και 1,5% και βρέθηκε ότι και τα δυο στελέχη αυτά μπορούν να κινηθούν ομαδικά σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 0,5%, ενώ παράλληλα το βακτηριακό στέλεχος P14 παρουσιάζει έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας και σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%. Τα στελέχη P14 και P21 ταυτοποιήθηκαν με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA και η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη P14 και P21 ομαδοποιούνται με τα είδη *Pseudomonas azotoformans* και *Pseudomonas jessenii*, αντίστοιχα. Η ανταγωνιστική δράση των στελεχών αυτών αξιολογήθηκε έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sp.* και *Rhizoctonia sp.*. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και τα δυο βακτηριακά στελέχη αποτελούν καλούς ανταγωνιστές έναντι των συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων, ιδιαίτερα όταν καλλιεργούνται σε κατάλληλα τρυβλία που ευνοούν την ανάπτυξη του φαινοτύπου της ομαδικής κινητικότητας, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην παραγωγή και την έκκριση σημαντικών ποσοτήτων αντιμικροβιακών ενώσεων κατά την ομαδική κινητικότητα.

Λέξεις κλειδιά: ομαδική κινητικότητα, ανταγωνιστική δράση, φυτοπαθογόνοι μύκητες, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas jessenii*, μοριακός φυλογενετικός χαρακτηρισμός, 16S rRNA.

Abstract

In this study, native *Pseudomonas* spp. isolates were obtained from tomato rhizosphere from soil which has been previously subjected to fumigation treatment with methyl bromide. The swarming motility of these isolates was evaluated on nutrient plates containing 0,5% agar (swarming plates) and on nutrient plates containing 1,5% agar. Both strains isolated displayed a convincing surface motility phenotype when propagated on nutrient plates containing 0,5% agar and in addition to this, strain P14 displayed a convincing surface motility phenotype when propagated on nutrient plates containing 1,5% agar. A phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences confirmed that the isolates P14 and P21 belong to the species *Pseudomonas azotoformans* and *Pseudomonas jessenii*, respectively. The antagonistic activity of the isolates against the phytopathogenic fungi *Botrytis* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp. and *Rhizoctonia* sp was evaluated in vitro. Both strain isolated exhibited antagonism towards the phytopathogenic fungi and their antagonistic activity seems to be associated with the swarming motility phenotype. It is possible that the swarming motility of both isolates results in the enhanced production and excretion of antimicrobial compounds.

Key words : swarming motility, antagonistic activity, phytopathogenic fungi, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas jessenii*, 16S rRNA, molecular phylogenetic identification.

1.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια αποτελούν ένα μεγάλο κλάδο των προκαρυωτικών μικροοργανισμών (στους οποίους συμπεριλαμβάνονται εκτός από τα Βακτήρια και τα Αρχαία). Παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Antonie van Leeuwenhoek το 1676, με τη βοήθεια ενός αυτοσχέδιου μικροσκοπίου με ένα φακό (Porter, 1976) και τα πρωτονόμασε ζωόφια. Το όνομα «βακτήρια ή βακτηρίδια» πρωτοεισήχθησε το 1828 από τον Christian Gottfried Ehrenberg. Πρόκειται για μονοκύτταρους (σπάνια πολυκύτταρους), μικροσκοπικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι συναντώνται σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς σε κάθε είδους βίοτοπο. Έχουν μέγεθος μερικά μικρόμετρα (0,5-5 μm), και ποικίλα σχήματα. Τα περισσότερα είναι τριών μορφών: σφαιρικού (coccus), ραβδοειδούς (bacillus), σπειροειδούς (spirillum).

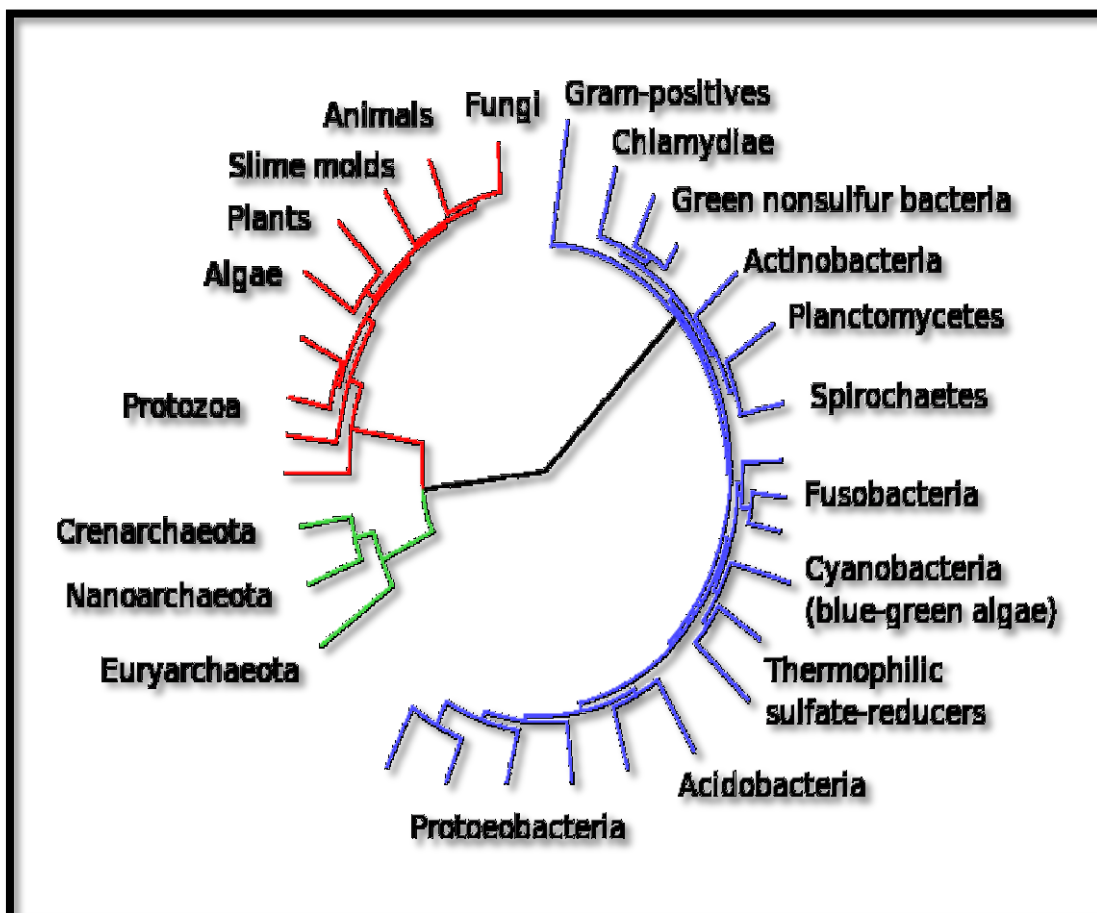
Στα προκαρυωτικά κύτταρα το DNA υπάρχει με τη μορφή δίκλωνου μορίου (βακτηριακό χρωμόσωμα) που συσσωματώνεται και σχηματίζει μια ορατή μάζα που ονομάζεται πυρηνοειδές. Το μεγαλύτερο μέρος των προκαρυωτών φέρουν μόνο ένα χρωμόσωμα, κάτι που από γενετικής άποψης, τους καθιστά απλοειδείς οργανισμούς, καθώς φέρουν ένα μοναδικό αντίτυπο κάθε γονιδίου. Επίσης περιέχουν μικρές ποσότητες μη χρωμοσωμικού DNA, σε κυκλική μορφή, που ονομάζονται πλασμίδια. Τα περισσότερα βακτήρια δεν έχουν ή έχουν ελάχιστες εσωτερικές μεμβράνες, πράγμα το οποίο συνεπάγεται την έλλειψη αρκετών οργανιδίων, ενώ τα περισσότερα από αυτά φέρουν κυτταρικό τοίχωμα το οποίο είναι διαφορετικό από αυτό των φυτών, καθώς δεν περιέχουν κυτταρίνη (όπως τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών), αλλά πεπτιδογλυκάνες. Διακρίνονται σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Gram (-) βακτήρια) στα οποία τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται τοποθετημένα σε μια στοιβάδα, και σε θετικά κατά Gram βακτήρια (Gram (+) βακτήρια) όπου τα μόρια πεπτιδογλυκάνης βρίσκονται σε πολλαπλές αλληλοεπικαλυπτόμενες στοιβάδες (Siefert, et al., 1998).

Βρίσκονται στα περισσότερα περιβάλλοντα (έδαφος, νερό, οργανική ύλη, ζωντανούς ιστούς, ραδιενεργά και τοξικά απόβλητα κ.α.), ενώ τυπικά φαίνεται να υπάρχουν περισσότερα από 40 εκατ. βακτηριακά κύτταρα σε κάθε γραμμάριο εδάφους και 1 εκατ. κύτταρα σε κάθε ml φρέσκου νερού. Μεγάλο μέρος των βακτηρίων υπολογίζεται ότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ μόνο τα μισά φύλα από τα διάφορα είδη βακτηρίων μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθήκες εργαστηρίου (Madigan, et al., 2005).

1.2 Ταξινόμηση Βακτηρίων

Τα βακτήρια αρχικά είχαν τοποθετηθεί στο βασίλειο των Plantae, αποτελώντας την τάξη Schizomycetes όπου μαζί με τα Schizophyceae (μπλε-πράσινα φύκη/ Κυανοβακτήρια) αποτελούσαν το φύλο Σχιζόφυτα. Το 1866 ο Ernst Haeckel στο βιβλίο του *Generelle Morphologie der Organismen* τοποθετεί τα Βακτήρια στο βασίλειο των Πρωτίστων και στο φύλο Μονήρη. Υποδιαιρεί μάλιστα το φύλο Μονήρη σε δυο ομάδες: στα βακτήρια με βακτηριακό φάκελο (περιελάμβανε γένη όπως *Bacterium*, *Bacillus* και *Spirillum*) και στα βακτήρια χωρίς βακτηριακό φάκελο (που περιελάμβανε τα γένη *Protomonas* και *Vampyrella* τα οποία πλέον ταξινομούνται στους Ευκαρυώτες).

Σήμερα, τα Βακτήρια (Cavalier-Smith, 2004) ανήκουν στο δικό τους Βασίλειο (αυτό των Βακτηρίων) το οποίο φέρει δυο υποδιαιρέσεις, τα *Negibacteria* (που περιλαμβάνουν τα φύλα *Eobacteria*, *Sphingobacteria*, *Spirochaetae*, *Proteobacteria*, *Planctobacteria*, *Cyanobacteria*) και τα *Unibacteria* (με τα φύλα *Posibacteria* και *Archaeobacteria*).



Εικόνα 1: ένα φυλογενετικό δένδρο που δείχνει το σύστημα των τριών Επικρατειών και την ποικιλότητα του Βασιλείου των Βακτηρίων σε σύγκριση με τα άλλα Βασίλεια. Τα Ευκάρυα φαίνονται με κόκκινο, τα Αρχαία με πράσινο και τα Βακτήρια με μπλε. (πηγή: en.wikipedia.org/wiki/Bacteria)

1.3 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια των *Pseudomonaceae*, ενώ περιλαμβάνει περισσότερα από 191 είδη (Euzebay, 1997). Το γένος των ψευδομονάδων αποτελεί την πλέον ποικιλόμορφη και οικολογικά σημαντική ομάδα βακτηρίων στον πλανήτη (Spiers, et al., 2000). Η προσαρμοστικότητα των ψευδομονάδων οφείλεται στις λιγοστές τους διατροφικές απαιτήσεις, το μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και την ποικιλότητα στο μεταβολισμό τους που εκτείνεται από αυτοτροφία έως λιθοτροφία (Todar, 2004b). Μέλη του γένους *Pseudomonas* εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολική και φυσιολογική ποικιλομορφία, γεγονός που τους επιτρέπει να αποικίζουν διάφορους χερσαίους και υδάτινους οικολογικούς θώκους (Εικόνα 2). Η παγκόσμια κατανομή των ψευδομονάδων υποδεικνύει προσαρμοστικότητα όσον αφορά στη φυσιολογία και τη γενετική αυτών των μικροοργανισμών σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Spiers et al. 2000). Μέλη του γένους έχουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της σπουδαιότητάς τους σε ασθένειες των φυτών και των ανθρώπων καθώς και της δυνατότητας να αξιοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Το γονιδίωμα αρκετών στελεχών του γένους *Pseudomonas spp.* έχει αλληλουχηθεί και είναι διαθέσιμο (Stover, et al., 2000) (Nelson, et al., 2002; Paulsen, et al., 2005) αποκαλύπτοντας ότι το μέγεθος του γονιδιώματος του γένους αυτού (>5.500ORFs) είναι μεγαλύτερο από τα περισσότερα άλλα αλληλουχημένα βακτηριακά γονιδιώματα, και παρόμοιο σε μέγεθος ή λίγο μικρότερο από το γονιδίωμα άλλων βακτηρίων που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις με φυτικούς οργανισμούς (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*) (Van Sluys, et al., 2002)

Τα είδη του γένους *Pseudomonas* ταξινομήθηκαν προς τα τέλη του 19ου αιώνα, ενώ η ετυμολογία του ονόματός τους είναι Ψευδής Μονάδα (Palleroni, et al., 2010). Κατά τον Krieg (1984) τα διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas* εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

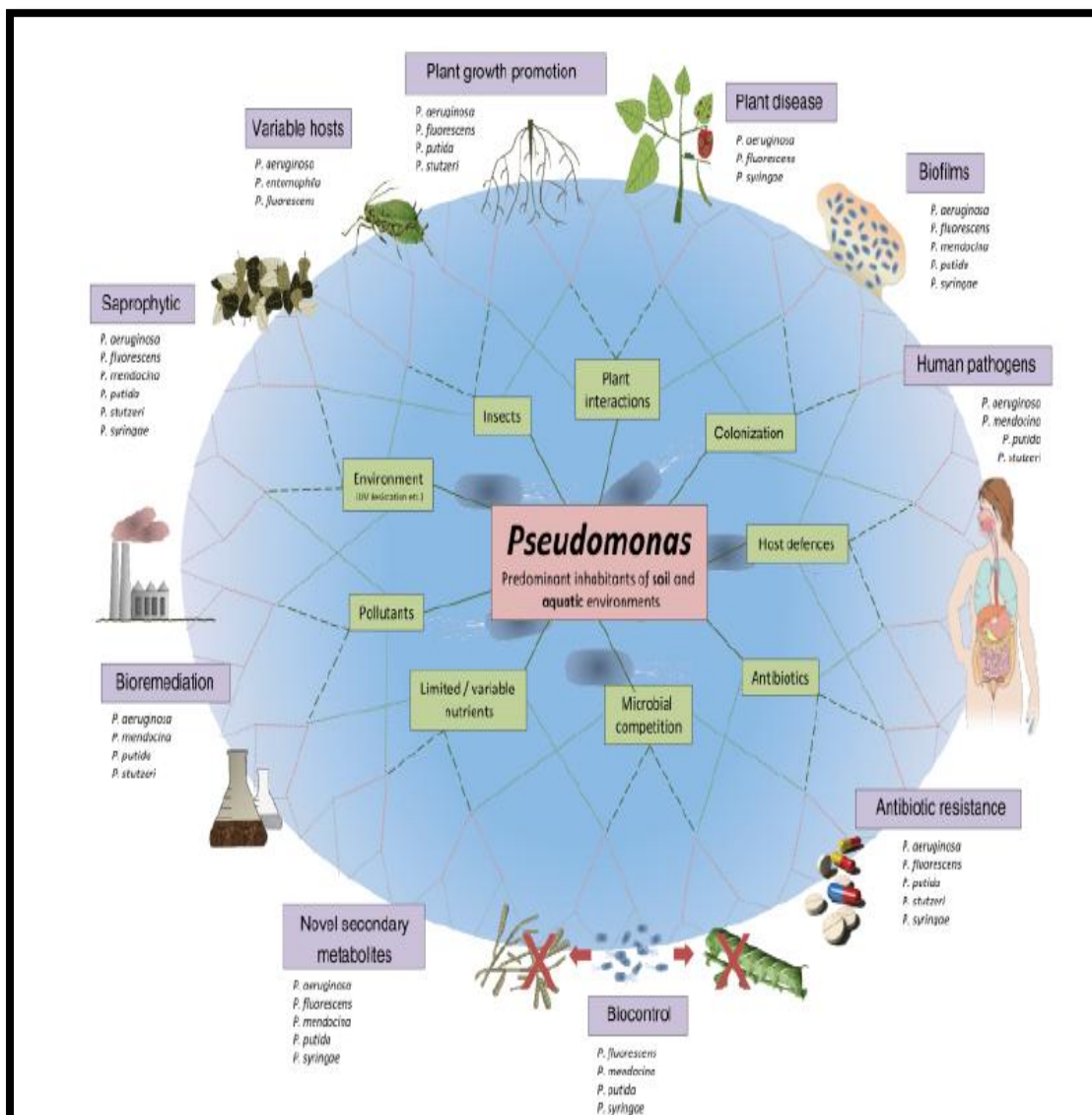
- ραβδόμορφα
- αρνητικά κατά Gram
- με ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια
- αερόβια
- μη σποροπαραγωγά

Το περιεχόμενο σε GC των ειδών που ανήκουν στο είδος των *Pseudomonas spp.* κυμαίνεται από 58% έως 69% (Palleroni, 2008).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 18 φυτοπαθογόνα βακτήρια στο γένος *Pseudomonas* καθώς και 3 είδη τα οποία είναι παθογόνα στα μανιτάρια, πολλά από τα οποία εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή (Hofte, et al., 2006). Αυτά διαχωρίζονται με βάση την αντίδρασή τους στην οξειδάση (Πίνακες 1 & 2). Εκτός όμως από αυτά, στο γένος συγκαταλέγονται και βακτήρια που προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στους ανθρώπους, όπως πνευμονία. Επίσης κάποιες ψευδομονάδες, όπως για παράδειγμα τα *P. aeruginosa* και *P. cerasia*, φαίνεται να προσβάλλουν τόσο τα φυτά όσο και τα ζώα (Scroth, et al., 2006).

Εξαιτίας της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας των φυτοπαθογόνων βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, η συμπτωματολογία της ασθένειας στα φυτά ποικίλει από νεκρωτικές κηλίδες, νεκρωτικά τμήματα, έλκη ή και νεκρωτικό μαρασμό μέχρι σήψεις, υπερπλασίες και αδροβακτηριώσεις (Scroth et al., 2006).

Σχετικά πρόσφατα (Anzai, et al., 2000) η αλληλούχιση του 16S rRNA, μας οδήγησε στη διαπίστωση ότι είδη που μέχρι τώρα συγκαταλέγονταν στο γένος *Pseudomonas* ανήκαν σε διαφορετικά γένη (π.χ. *Ralstonia*) και το αντίστροφο, αλλάζοντας έτσι την ταξινομική κατάταξη πολλών βακτηρίων.



Εικόνα 2: Λειτουργικό και περιβαλλοντικό εύρος της *Pseudomonas spp.* (Sirk, et al., 2011).

Από τα είδη που εμφανίζουν θετική αντίδραση στην οξειδάση (Πίνακας 1), το *P. cichorii* έχει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών και εμφανίζει νεκρώσεις στα φύλλα και στα στελέχη. Επίσης μεγάλο εύρος ξενιστών εμφανίζει και το *P. marginalis* *pv. marginalis* και προκαλεί γωνιώδεις νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, και μαλακές/ καστανές σήψεις στις ρίζες. Τα είδη *P. agarici*, *P. constantinii* και *P. tolaasii* προσβάλλουν μύκητες (μανιτάρια) του γένους *Agaricus* (Munsch, et al., 2002), ενώ το είδος *P. tolaasii* φαίνεται να είναι ταξινομικά συγγενές με το *P. fluorescens*.

Πίνακας 1 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που εμφανίζουν θετική αντίδραση στην οξειδάση (Hofte and DeVos, 2006)

<i>Name</i>	<i>Host</i>	<i>Disease or symptoms</i> ^b
<i>Pseudomonas agarici</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	drippy gill
<i>Pseudomonas asplenii</i>	<i>Asplenium nidus</i>	leaf spot and blight
<i>Pseudomonas cichorii</i>	wide host range	leaf and stem spots
<i>Pseudomonas constantinii</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	brown blotch
<i>Pseudomonas corrugata</i>	tomato	pith necrosis
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Oryzae sativa</i>	leaf sheath brown rot
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>	root browning, stunting
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	wide host range	marginal leaf necrosis, soft rot
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>pastinacea</i>	<i>Pastinaca sativa</i>	brown rot of roots, soft rot
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>Lycopersicon</i>	pith necrosis
<i>Pseudomonas palleroniana</i>	<i>esculentum</i>	weakly pathogenic to rice
<i>Pseudomonas salomonii</i>	<i>Oryzae sativa</i>	café au lait disease
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Allium sativum</i>	brown blotch
	<i>Agaricus spp.</i>	

^a Information based on Young et al. (1996) and Young et al. (2004)
^b Information mainly based on Bradbury (1986) and Smith et al. (1988)

Από τα είδη τα οποία εμφανίζουν αρνητική αντίδραση στην οξειδάση (Πίνακας 2), το *P. syringae* αποτελεί το είδος με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία. Εμφανίζει περισσότερους από 50 παθότυπους, ενώ οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι τα *P.s. pv. coronafaciens*, *Ps. pv. glycinea*, *P.s. pv. lachrymans*, *P.s. pv. morsprunorum*, *P.s. pv. persicae*, *P.s. pv. phaseolicola*, *P.s. pv. pisi*, *P.s. pv. Syringae*, *P.s. pv. tabaci* και *P.s. pv. tomato*. Αμέσως μετά ακολουθεί το *P. savastanoi* με παθότυπους που προκαλούν καρκινώματα και όγκους σε διάφορα φυτά. Πρόσφατα οι Schaad et al. (2000) πρότειναν οι παθότυποι *pv. phaseolicola* και *pv. glycinea* να μην ανήκουν πλέον στο συγκεκριμένο είδος, αλλά να αποτελούν παθότυπους του είδους *P. syringae*.

Πίνακας 2 : Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που εμφανίζουν αρνητική αντίδραση στην οξειδάση (Hofte and DeVos, 2006)

<i>Name</i>	<i>Host</i>	<i>Disease or symptoms</i> ^b
<i>P. amygdali</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	bacterial canker
<i>P. avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i>	bacterial canker
<i>P. cannabina</i>	<i>Cannabis sativa</i>	
<i>P. caricapapayae</i>	<i>Carica papaya</i>	leaf spot
<i>P. ficuserectae</i>	<i>Ficus erectae</i>	leaf spot, shoot blight
<i>P. meliae</i>	<i>Melia azadarach</i>	galls
<i>P. savastanoi</i> (various pathovars)	see Table 3	
<i>P. syringae</i> (various pathovars)	see Table 4	
<i>P. tremae</i>	<i>Trema orientalis</i>	
<i>P. viridiflava</i>	wide host range	leaf necrosis, necrotic spots, stem and root rots

^a Information based on Young et al. (1996) and Young et al. (2004)
^b Information mainly based on Bradbury (1986) and Smith et al. (1988)

Το είδος *P. viridiflana* εμφανίζει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών και είναι ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας καθώς προκαλεί τόσο νεκρώσεις σε φύλλα και στελέχη των φυτών, όσο και σήψεις των ριζών (Hofte and DeVos, 2006). Τέλος το είδος *P. avellana* αναφέρθηκε πρόσφατα σε Ελλάδα και Ιταλία να προκαλεί βακτηριακά έλκη σε φουντουκίες (Scortichini, et al., 2002).

Ο Palleroni (1973) ταξινόμησε το γένος των ψευδομονάδων, όπως αυτό είχε προταθεί από τον Migula (1894), με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA σε πέντε ομάδες, τα RNA homology groups. Η φυλογενετική απόσταση μεταξύ των πέντε ομάδων καθορίστηκε αργότερα με περισσότερη ακρίβεια, με τη χρήση πιο εξελιγμένων μεθόδων, όπως ο υβριδισμός rRNA:DNA (De Vos, et al., 1983; 1985; 1989) και ο προσδιορισμός της ακολουθίας (sequencing) της 16S rRNA μονάδας αντιπροσωπευτικών στελεχών (Vandamme, et al., 1996; Woese, 1987). Επακόλουθο των ευρημάτων των ερευνών αυτών ήταν η ανακατάταξη στην ταξινόμηση και την ονοματολογία των ψευδομονάδων λόγω του υψηλού βαθμού ποικιλομορφίας που βρέθηκε στα μέλη του γένους. Το γένος *Pseudomonas* έχει πλέον περιορισθεί στο rRNA I group που ανήκει στην γ - υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων και περιλαμβάνει 30 είδη ψευδομονάδων- “αληθινές” ψευδομονάδες (δηλαδή *Pseudomonas sensu stricto*) (Moore, et al., 2006), που εμφανίζουν γονοτυπικές και φαινοτυπικές ομοιότητες με το τυπικό είδος *P. aeruginosa* (Moore, et al., 1996). Υπάρχουν μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι τα φυτοπαθογόνα είδη του *Pseudomonas* χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Αυτές οι μελέτες βασίζονται τόσο σε ομολογίες των rDNAs (Byng, et al., 1983; De Vos, et al., 1985; Palleroni, et al., 1973), στη σύσταση λιπαρών οξέων (Oyaizu, et al., 1983) καθώς και τα ενζυμικά μονοπάτια (Byng, et al., 1983; Whitaker, et al., 1981). Έτσι προέκυψαν οι ομάδες των *P. fluorescens* (ομάδα “fluorescens”), *P. solanacearum* και *P. ceracia*. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει βακτήρια τα οποία φθορίζουν στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) ενώ τα στελέχη των άλλων δύο ομάδων όχι. Η μη ικανότητα φθορισμού των στελεχών αυτών, δε οφείλεται στην απουσία φθορισμού αλλά στη συσσώρευση πολύ-β-υδροξυβουτυρικού (PHB) στα αποθηκευτικά όργανα.

Τα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι ιδιαίτερα σημαντικά εξαιτίας της ικανότητάς τους να αποικοδομούν ενώσεις που είναι ιδιαίτερα τοξικές σε άλλους οργανισμούς, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα, φυτοφάρμακα και άλλοι περιβαλλοντικοί ρύποι. Υπάρχουν είδη τα οποία μπορούν να χρησιμοποιήσουν περισσότερες από 150 διαφορετικές οργανικές ενώσεις ως μοναδική πηγή άνθρακα, με εξαιρέσεις το τεφλόν και οργανικές ενώσεις με ένα άτομο άνθρακα (μεθάνιο, μεθανόλη, φορμαλδεΰδη, κ.λπ.). Μερικά είδη ψευδομονάδων (π.χ. *Ps. fluorescens*) αποτελούν επίσης ένα από τους παράγοντες αλλοίωσης των κατεψυγμένων τροφίμων διότι έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C), και τη δυνατότητα υδρόλυσης της ζελατίνης. Οι φυτοπαθογόνες ψευδομονάδες προκαλούν τις ασθένειες των περισσότερων σημαντικών ομάδων ανώτερων φυτών. Μερικές από τις σοβαρότερες ασθένειες προκαλούνται από τους παθότυπους (pathovars) των ειδών *P. solanacearum* και *P. syringae*. Τα συμπτώματα των φυτών που προσβάλλονται από τα φυτοπαθογόνα αυτά είναι νεκρωτικές κηλίδες, υπερπλασίες, αποσυνθέσεις των ιστών και αγγειακές μολύνσεις (θρομβώσεις των αγγείων δεσμίδων). Μερικές ψευδομονάδες, όπως το *Ps. aeruginosa* και το *Burkholderia ceracia*, είναι μολυσματικές και σε φυτά και σε ζώα.

Διάφοροι παθότυποι των παθογόνων αυτών, έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης φυτοτοξινών. Η δράση των τοξινών αυτών εντοπίζεται στην παρεμπόδιση ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αμινοξέων, παρεμπόδιση της πολυμεράσης του RNA, των χλωροπλαστών και ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών. Πολλές φορές είναι δυνατόν οι τοξίνες αυτές να μην έχουν καταστροφικές ιδιότητες για το φυτό αλλά να είναι τοξικές για άλλους μικροοργανισμούς. (Durbin, 1991).

Εκτός από τις φυτοτοξίνες, οι φυτορυθμιστικές ουσίες (φυτοορμόνες) αντιπροσωπεύουν μια άλλη ομάδα ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους που παίζουν ρόλο στην παθογένεση από τα είδη του γένους *Pseudomonas*. Η διαφορά των φυτορυθμιστικών ουσιών από τις φυτοτοξίνες είναι ότι οι πρώτες μπορούν να παράγονται και από τον ξενιστή. Οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στην αύξηση του ξενιστή (κάλοι, αύξηση των ριζικών τριχιδίων) μετά την προσβολή από το βακτήριο έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να οφείλονται στη συσσώρευση των φυτοορμονών. Εννέα διαφορετικές φυτοπαθογόνες ψευδομονάδες παράγουν ινδολοξικό οξύ (IAA) in vitro όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει τρυπτοφάνη, βασικό αμινοξύ για τη βιοσύνθεση αυξινών (Bartel, 1997). Τα βακτήρια *Ps. (Ralstonia) solanacearum* και *Ps. syringae* συνθέτουν επίσης εξαιρετικά υψηλά ποσά IAA παρουσία αλλά και απουσία τρυπτοφάνης στο μέσο ανάπτυξης (Sraeren, et al., 2007). Οι φυσιολογικές και μορφολογικές μεταβολές που επιφέρει το IAA στο φυτό έχουν ως στόχο την επιτάχυνση της αύξησης των βακτηρίων. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια *Ps. syringae* pv. *savastanoi* και *Ps. (Ralstonia) solanacearum* έχουν την ικανότητα παραγωγής κυτοκινινών, μιας άλλης σημαντικής ομάδας φυτοορμονών που σχετίζεται με την αύξηση και τη διαίρεση των κυττάρων στους φυτικούς ιστούς (Akiyoshi, et al., 1987).

Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα που παρουσιάζουν ορισμένα είδη του γένους *Pseudomonas*, είναι ότι αποτελούν πυρήνες πάγου στις θερμοκρασίες άνω των -10 °C. Τρία είδη (*Ps. syringae*, *Ps. fluorescens*, και *Ps. viridiflava*) φαίνεται ότι περιέχουν παγοπυρηνωτικά στελέχη. Η μελέτη της βακτηριακής παγοπυρήνωσης έχει λάβει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, τα τελευταία χρόνια, λόγω των ζημιών παγετού που προκαλούνται από τα βακτήρια αυτά. Η ιδιότητα της παγοπυρήνωσης των βακτηρίων προέρχεται από τη σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων (πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης, Μοριακού Βάρους 118 kDa ή μεγαλύτερο) οι οποίες αποτελούν πυρήνες σχηματισμού πάγου (Morris, et al., 2004).

1.4 Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών.

Τα φυτά, που αποτελούν πηγή τροφής του ανθρώπου και των ζώων, προσβάλλονται από έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών κατηγοριών φυτοπαρασίτων. Οι αιτιολογικοί παράγοντες που προξενούν ασθένειες και διάφορες βλάβες στα φυτά είναι ποικίλοι. Παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, οι ιοί, τα ιοειδή και τα φυτοπλάσματα, τα ζιζάνια, ζωικοί και παρασιτικοί παράγοντες όπως τα αρθρόποδα, έντομα ή ακάρεα, οι νηματώδεις σκώληκες, τα μαλάκια, τα τρωκτικά κ.ά., καθώς και περιβαλλοντικά, εδαφικά και κλιματολογικά αίτια, προκαλούν σοβαρές απώλειες στη γεωργική παραγωγή. Συνεπώς, η λήψη μέτρων για την προστασία της γεωργικής παραγωγής αποτελεί θέμα μείζονος σημασίας. Τα μέτρα αυτά αφορούν στο ίδιο το φυτό, στο φυτοπαρασίτο, στο περιβάλλον ή ακόμα και στο χρόνο αλληλεπίδρασης του ξενιστή με το φυτοπαρασίτο και εφαρμόζονται με στόχο την καταπολέμηση των εχθρών και των παραγόντων που προκαλούν ασθένειες στα φυτά (Ζίωγας, και συν., 2007).

Γενικά, τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των εχθρών και των ασθενειών των φυτών ποικίλλουν ανάλογα με την περίπτωση και μπορούν να διακριθούν σε νομοθετικά, καλλιεργητικά, βιοτεχνολογικά, βιολογικά και χημικά. Οι ξεπερασμένες καλλιεργητικές μέθοδοι και τα προληπτικά μέσα καταπολέμησης, παρόλο που δεν έχουν καμία δυσμενή επίπτωση για το περιβάλλον, έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση μιας ασθένειας. Η μόλυνση εδαφών και υδροφόρων οριζώντων από τα μέσα της χημικής καταπολέμησης καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων στα μέσα αυτά, έχει αποδείξει την αναγκαιότητα ανακάλυψης και εφαρμογής μιας εναλλακτικής μεθόδου (Agris, 1996).

Τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τη βιολογική καταπολέμηση. Κατά τους Cook και Baker βιολογική καταπολέμηση στην περίπτωση των ασθενειών των φυτών, είναι η μείωση της ποσότητας του μολύσματος ή της νοσογόνου δράσης του παθογόνου, που πραγματοποιείται από έναν ή περισσότερους οργανισμούς-ανταγωνιστών του παθογόνου, εκτός από τον άνθρωπο (Cook, et al., 1983). Σύμφωνα με τον Burree (Burree, 1990), βιολογική καταπολέμηση είναι η μείωση της επιβίωσης ή της δραστηριότητας ενός εχθρού ή παθογόνου ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ ζωντανών οργανισμών. Αυτοί οι οργανισμοί-ανταγωνιστές, οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης περιλαμβάνουν: α) μη παθογόνα στελέχη του ίδιου γένους με το παθογόνο (cross protection), β) το ίδιο το παθογόνο σε μικρότερες ποσότητες μολύσματος (ανοσοποίηση- plant immunization), γ) παθογόνα στελέχη τα οποία εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή προσβάλλοντας έτσι μόνο τους εχθρούς της κύριας καλλιέργειας και δ) οργανισμούς οι οποίοι εμφανίζουν είτε ανταγωνιστικές, είτε θηρευτικές είτε παρασιτικές ιδιότητες έναντι του παθογόνου (Pal, et al., 2006).

Στην κατηγορία των βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης μπορούν να ενταχθούν και ξενιστές οι οποίοι μετά από φυσική επιλογή έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στις προσβολές συγκεκριμένων παθογόνων (Γεωργόπουλος, και συν., 1992). Μια τελευταία κατηγορία βιολογικών παραγόντων θεωρούνται διάφορα φυσικά προϊόντα, τα οποία προέρχονται από διαδικασίες ζύμωσης ή εκχύλισης και παρουσιάζουν προστατευτικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των βιοτικών παραγόντων που έχουν προαναφερθεί, είτε προάγοντας την ανάπτυξη των φυτών είτε καταστέλλοντας την ανάπτυξη ή ακόμα και θανατώνοντας τα παθογόνα (Pal, et al., 2006).

1.5 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα.

Η περιοχή του εδάφους, η οποία επηρεάζεται από το ριζικό σύστημα των φυτών και αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη διάφορων μικροοργανισμών καλείται ριζόσφαιρα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού και μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα έχουν τεράστια σημασία για τη γεωργική παραγωγή, καθώς στην περιοχή της ριζόσφαιρας πραγματοποιείται η είσοδος των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος προς το φυτό αλλά και η είσοδος των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ένα μεγάλο ποσοστό των φωτοσυνθετικών προϊόντων (5-30% σε νεαρά φυτά) εκρέει από τις ρίζες προς το έδαφος. Οι ριζικές εκκρίσεις μπορεί να προέρχονται είτε από παθητική εκροή (συνήθως μικρού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις οι οποίες μετακινούνται λόγω διαφοράς στο ηλεκτροχημικό δυναμικό) είτε από ενεργή έκκριση (μεγαλύτερου μοριακού

βάρους ενώσεις οι οποίες μεταφέρονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού καθώς σε αυτές περιλαμβάνονται ουσίες που μειώνουν την τριβή μεταξύ του ακροριζίου (καλύπτρα) και του εδάφους, βελτιώνουν την επαφή μεταξύ ρίζας και εδαφικού διαλύματος, αυξάνουν τη διαλυτοποίηση ή και την απορρόφηση διάφορων ανόργανων στοιχείων κ.ά. Ταυτόχρονα, μπορούν να προσελκύουν ωφέλιμους οργανισμούς αλλά και παθογόνους.

Λόγω της συνεχούς παροχής εύκολα αφομοιώσιμων οργανικών ουσιών από τις ρίζες, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα μπορεί να είναι 10-100 φορές μεγαλύτερος από τον πληθυσμό στο υπόλοιπο έδαφος και ένα ποσοστό της τάξης του 4-10% της επιφάνειας της ρίζας(ριζόπλανο) καλύπτεται από μικροοργανισμούς.

Η έκταση της ριζόσφαιρας εξαρτάται από την ποσότητα των εκκριμάτων, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους που επηρεάζουν τη διάχυση αυτών των ουσιών, καθώς και από τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.

Στη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας εκτός από τη σύσταση και την ποσότητα των ριζικών εκκρίσεων παίζουν ρόλο και αβιοτικοί παράγοντες. Η συγκέντρωση του O₂ στην περιοχή αυτή είναι μειωμένη λόγω της αναπνευστικής δραστηριότητας τόσο των ριζών όσο και των μικροοργανισμών. Το pH επίσης μπορεί να διαφέρει έως και 2 μονάδες από αυτό του υπόλοιπου εδάφους γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση CO₂ το οποίο σχηματίζει ανθρακικό οξύ στο εδαφικό διάλυμα. Η δημιουργία ανθρακικού οξέος βοηθά στη διαλυτοποίηση αδιάλυτων ανόργανων στοιχείων όπως είναι το ασβέστιο, ο φώσφορος, το κάλιο κ.ά.. Η απορρόφηση αμμωνιακού αζώτου από τις ρίζες, οδηγεί επίσης στην πτώση του pH λόγω της απελευθέρωσης ιόντων υδρογόνου από αυτές (Sylvia, et al., 1998).

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του πληθυσμού των μικροοργανισμών που αποικούν τη ριζόσφαιρα, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία στην περιοχή αυτή είναι έντονος και αποτελεί ένα βασικό τμήμα του μηχανισμού βιολογικού ελέγχου των εδαφογενών ασθενειών. Συνήθη πρακτική, αποτελεί ο ριζοεμβολιασμός των φυτών με ριζοβακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) και μπορούν να αποικούν ανταγωνιστικά τις ρίζες, εκδιώκοντας άλλους μικροοργανισμούς, μεταξύ αυτών και τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς.

Στην περιοχή της ριζόσφαιρας παρουσιάζεται και εξειδίκευση ως προς το είδος των μικροοργανισμών που θα την αποικίσουν και η εξειδίκευση αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του φυτού και την ηλικία του, παράγοντες οι οποίοι προσδιορίζουν και την ποσότητα και την σύσταση των ριζικών εκκρίσεων. Ο χημειοτακτισμός και η ικανότητα προσκόλλησης είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποικίσουν τη ριζόσφαιρα και η επιλογή αυτή παρουσιάζει εξειδίκευση σε επίπεδο είδους. Επίσης έχουν αναφερθεί βακτήρια της ενδοριζόσφαιρας τα οποία παράγουν οργανικές ενώσεις (rhizoripines) οι οποίες μπορεί να λειτουργήσουν ως εκλεκτικό υπόστρωμα για ελεύθερα διαβιούντα στελέχη του ίδιου είδους (Nehf, et al., 1996).

Όπως το φυτό επηρεάζει τη μικροβιακή κοινότητα με την ποσότητα και τη σύσταση των εκκρίσεων του, έτσι και η μικροβιακή κοινότητα επηρεάζει τις εκκρίσεις του φυτού και η διέγερση αυτή μπορεί να εμφανίζει εξειδίκευση σε επίπεδο είδους.

Τα βακτήρια που έχουν αναφερθεί ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου ανήκουν σε διάφορα γένη: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Pantonea*,

Rhizobium-Bradyrhizobium, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* (Weller, 1988).

1.5.1 Η χρήση παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στη βιολογική καταπολέμηση.

Ειδικότερο, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα παθογόνα που προσβάλλουν τις ρίζες και το λαιμό των φυτών και τα οποία κατά τεκμήριο διαβιούν στο έδαφος. Οι οργανισμοί αυτοί ονομάζονται «εδαφογενή παθογόνα» και οι ασθένειες που προκαλούν «εδαφογενείς ασθένειες». Στα εδαφογενή παθογόνα περιλαμβάνονται είδη που ανήκουν σε διάφορες ομάδες ζωντανών οργανισμών, οι σπουδαιότερες των οποίων είναι οι μύκητες, τα βακτήρια και οι νηματώδεις. Ο χειρισμός των μικροοργανισμών του εδάφους με διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές αποτελεί τη βάση της βιολογικής μεθόδου αντιμετώπισης των εδαφογενών παθογόνων (Γραβάνης, 2004).

Εκτός, όμως, από τις καλλιεργητικές πρακτικές, υπήρξαν και ορισμένες παρατηρήσεις που έδωσαν νέα διάσταση στο θέμα της βιολογικής καταπολέμησης. Οι παρατηρήσεις αφορούν στα «κατασταλτικά» εδάφη, στα οποία η συχνότητα εμφάνισης των ασθενειών των φυτών είναι σημαντικά μειωμένη. Σύμφωνα με τους Baker και Cook (Cook, et al., 1983), στα εδάφη αυτά το παθογόνο είτε δεν εγκαθίσταται ή εγκαθίσταται, αλλά προκαλεί μικρή ή καθόλου ζημιά, ή –τέλος- προκαλεί ζημιά η οποία σταδιακά γίνεται ανεπαίσθητη, αν και το παθογόνο βρίσκεται στο έδαφος. Τα κατασταλτικά εδάφη χάνουν την ικανότητά τους να καταστέλλουν εδαφογενή παθογόνα όταν αποστειρωθούν. (Weller, et al., 2002). Τα κατασταλτικά εδάφη οφείλουν τις ιδιότητές τους στην ύπαρξη μικροοργανισμών που δρουν ως βιολογικοί ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων. Σε μια μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας 16S ριβοσωμικού RNA, για να ταυτοποιηθούν οι βακτηριακές κοινότητες και οι κοινότητες των Αρχαίων, με ρόλο-κλειδί στην ριζόσφαιρα φυτών που αναπτύσσονται σε κατασταλτικά εδάφη, αποκαλύφθηκε ότι η σχετική αφθονία συγκεκριμένων βακτηριακών ταξα, είναι ο πιο σημαντικός δείκτης της «κατασταλτικότητας» και όχι η παρουσία συγκεκριμένων βακτηριακών ταξα. Τα γ- και τα β-Πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadales*) και τα *Lactobacillaceae*, ταυτοποιήθηκαν ως τα πιο δυναμικά ταξα που σχετίζονται με την καταστολή εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι τα γ-Πρωτεοβακτήρια, και συγκεκριμένα το ταxon *Pseudomonadaceae*, προστατεύει τα φυτά από την προσβολή τους από τους φυτοπαθογόνους μύκητες, μέσω της παραγωγής ενός χλωριωμένου λιποπεπτιδίου που κωδικοποιείται από NRPS γονίδια, ενώ άλλα ταξα που σχετίζονται με την καταστολή ασθενειών από φυτοπαθογόνους μύκητες είναι τα *Burkholderiaceae*, *Xanthomonadales* και *Actinobacteria*. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι το περίπλοκο φαινόμενο της καταστολής των ασθενειών από το έδαφος, δεν μπορεί να αποδοθεί σε ένα βακτηριακό ταxon ή σε μια ομάδα βακτηριών, αλλά είναι πιο πιθανό να διέπεται από «μικροβιακούς συνεταιρισμούς» (microbial consortia) (Mendes, et al., 2011).

Κατασταλτικά εδάφη έχουν αναφερθεί για διάφορους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι οι: *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces euteiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora infestans*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies*, *Ralstonia solanacearum* καθώς και για τους νηματώδεις *Heterodera avenae*, *H. schachtii* και

Meloidogyne incognita (Weller, et al., 2002). Μικροβιολογικές αναλύσεις των εδαφών αυτών οδήγησαν στην απομόνωση ριζοβακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών.

1.6 Βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού (PGPB)

Οι μικροοργανισμοί που αποικούν στη ριζόσφαιρα κατατάσσονται σε ορισμένες ομάδες ανάλογα με την επίδρασή τους στα φυτά και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με τις ρίζες. Ως προς την επίδρασή τους, χωρίζονται σε παθογόνους και μη παθογόνους. Οι μη παθογόνοι, οι οποίοι είναι ταυτόχρονα και ωφέλιμοι, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η μια περιλαμβάνει μύκητες και βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό ξενιστή (*Rhizobium*, *Frankia* κ.ά.). Η άλλη κατηγορία περιλαμβάνει βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού και είναι γνωστά ως PGPB (**P**lant **G**rowth **P**romoting **B**acteria) και περιλαμβάνει βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης τα οποία επιδρούν θετικά τόσο στην ανάπτυξη του φυτού όσο και στον εμπλουτισμό του εδάφους. Τα PGPB σχετίζονται με πολλά, αν όχι όλα, τα είδη των φυτών και απαντούν συχνά σε πολλά περιβάλλοντα (Mantelin, et al., 2004). Η πιο καλά μελετημένη ομάδα των PGPB είναι τα PGPR (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria).

PGPR καλούνται τα βακτήρια τα οποία αποικούν στη ριζόσφαιρα και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη του φυτού μέσω άμεσων ή έμμεσων μηχανισμών. Στην ομάδα αυτή ανήκουν στελέχη ορισμένων γενών όπως τα γένη *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* και *Serratia* (Somers, et al., 2004). Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά, είναι επίσης δυνατό να εισέλθουν στη ρίζα και να πολλαπλασιαστούν ενδοφυτικά. (Rosenblueth, et al., 2006). Το αν η ενδοφυτική εγκαθίδρυση του πληθυσμού είναι απόρροια μιας ενεργής αλληλεπίδρασης μεταξύ του φυτού και του βακτηρίου, είναι μια πτυχή σε μικρό βαθμό μελετημένη αν και η αλληλούχηση του γονιδιώματος μερικών βακτηριακών στελεχών θα είναι καθοριστική για την διευκρίνιση και την περαιτέρω ερμηνεία της συμπεριφοράς τους (Krause, et al., 2006) Ορισμένα μάλιστα, είναι ικανά να ξεπεράσουν το εμπόδιο της ενδοδερμίδας και να εγκατασταθούν μέσω του αγγειοφόρου συστήματος και σε άλλα όργανα όπως οι βλαστοί, τα φύλλα οι βολβοί κ.ά.

Ενδοφυτικά ανταγωνιστικά ή ουδέτερα στελέχη της *Pseudomonas spp.* εντοπίζονται ως μέρος «βακτηριακών συνεταιρισμών» (consortia) σε διάφορους φυτικούς ιστούς και μερικές φορές είναι τα κυρίαρχα βακτήρια ενώ άλλες φορές αποτελούν ένα μικρό μέρος της ενδοφυτικής μικροχλωρίδας. Δεν είναι καλά μελετημένο, το αν η ενδοφυτική διαβίωση παρέχει κάποιο πλεονέκτημα στο βακτήριο (Rosenblueth, et al., 2006), αν και τα ενδοφυτικά κύτταρα είναι λιγότερο εκτεθειμένα τόσο σε βιοτικά όσο και σε αβιοτικά στρες (Hallmann, et al., 1997). Προώθηση της ανάπτυξης φυτικών οργανισμών από ενδοφυτικά στελέχη της *Pseudomonas spp.*, συνήθως σε συνδυασμό με άλλα ενδοφυτικά βακτηριακά γένη έχει αναφερθεί για τις περιπτώσεις της σόγιας (Kuklinsky-Sorbal, et al., 2004), του ρυζιού (Adhikari, et al., 2001), για την ελαιοκράμβη και την τομάτα (Nejad, et al., 2000) και για την υβριδική ερυθρελάτη (*Picea glauca x engelmannii*) (Chanway, et al., 2000).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ενδοφυτικοί πληθυσμοί της *Pseudomonas spp.* προωθούν την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών ποικίλουν. Για παράδειγμα η προώθηση της ανάπτυξης καλλιεργειών σόγιας έχει συσχετισθεί με την παραγωγή IAA (ινδολικού οξέος) και με τη διαλυτοποίηση των φωσφορικών από τα ενδοφυτικά βακτήρια,

συμπεριλαμβανομένων και εκπροσώπων του γένους *Pseudomonas spp.* (Kuklinsky-Sorbal, et al., 2004). Από την άλλη η προώθηση της ανάπτυξης του φυτικού οργανισμού μπορεί να επιτυγχάνεται λόγω του ελέγχου των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Υπάρχουν κάποια παραδείγματα δραστηριότητας βιολογικού ελέγχου από ενδοφυτικές ψευδομονάδες σε διάφορα συστήματα, αν και οι μηχανισμοί που διέπουν αυτή τη δραστηριότητα χρήζουν περισσότερης διερεύνησης. Για παράδειγμα, στελέχη 3 ενδοφυτικών ειδών (*Pseudomonas fluorescens*, *P.tolaasii* και *P.veronii*) προωθούν την ανάπτυξη του φυτού απουσία παθογόνων και μειώνουν τα συμπτώματα και τις επιπτώσεις της προσβολής από τους μύκητες *Achlya klebsiana* και *Pythium spinosum* στο ρύζι (Adhikari, et al., 2001). Ενδοφυτικό στέλεχος της *P.corrugata*, ελέγχει το μέγεθος του πληθυσμού του *Agrobacterium vitis*, το οποίο προκαλεί ασθένεια στα σταφύλια (Bell, et al., 1995). Δύο στελέχη της *P.putida* μειώνουν τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp.vasinfectum* στο βαμβάκι (Chen, et al., 1995), ενώ ενδοφυτικά στελέχη της *P.fluorescens* αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* στην πατάτα και στο μαρούλι (*Lactuca sativa L.*) (Grosch, et al., 2005).

Η σύσταση και η κατανομή των ενδοφυτικών πληθυσμών επηρεάζονται από διάφορες παραμέτρους: συγκεκριμένες στρατηγικές διαχείρισης που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες (Kuklinsky-Sorbal, et al., 2005), ανθρωπογενείς επεμβάσεις. Επιπλέον, οι ενδοφυτικοί πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* καθορίζονται από τον γονότυπο του φυτού-ξενιστή (Siciliano, et al., 1999; Germida, et al., 2001; Reiter, et al., 2003), από τη θερμοκρασία ανάπτυξης (Pillay, et al., 1997), από την παρουσία και αλληλεπίδραση με παθογόνα (Hallman, et al., 1998; Reiter, et al., 2003), από τις εποχιακές αλλαγές της θερμοκρασίας (Mocali, et al., 2003), από το στάδιο ανάπτυξης των φυτικών οργάνων (Mocali, et al., 2003) ή του φυτικού ιστού (Pirttila, et al., 2005)

Τα PGPR διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών είτε με άμεση έκκριση φυτοορμονών (Blomberg, et al., 2001; Leubhn, et al., 1997), δεσμεύοντας άζωτο στη ριζόσφαιρα (Graham, et al., 2000), διαλυτοποιώντας ανόργανες ουσίες που βρίσκονται σε αδιάλυτη μορφή όπως ο φώσφορος (Rodriguez, et al.), προάγοντας τις μυκορριζικές σχέσεις (Azon-Aguilar, et al., 1997) και ρυθμίζοντας την παραγωγή αιθυλενίου στις ρίζες (Mayak, et al., 1999), η απορρόφηση βαρέων μετάλλων-τοξικών για τα φυτά κ.ά. (Lalande, et al., 1989; Bowen, et al., 1999). Ακόμα πιο έμμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την προστασία των φυτών από φυτοπαθογόνα του εδάφους μέσω: α) παραγωγής αντιβιοτικών, β) σιδηροφόρων ουσιών, γ) ενζύμων και άλλων μεταβολιτών που εμποδίζουν τη δράση μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Κάποια στελέχη φαίνεται να έχουν και προστατευτική δράση έναντι διασυστηματικών και επιφανειακών παθογόνων. Η «ανοσοποίηση» εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και στην εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών και ονομάζεται επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) (Τζάμος, 2004) (Compant, et al., 2005) (Zehnder, et al., 2001) (Kloepper, et al., 1999).

Οι πρώτες εφαρμογές των PGPR σε καλλιέργειες έγιναν με σκοπό τη βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους, μέσω της αύξησης του διαθέσιμου αζώτου. Αργότερα, ορισμένα PGPR χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης εδαφογενών παθογόνων μυκήτων (Broadbent, et al., 1971). Γενικά, είναι δυνατόν στελέχη PGPR τα οποία αποτελούν βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης να προωθούν παράλληλα και

την ανάπτυξη των φυτών. Είναι όμως δυνατόν μερικά PGPR να καταστέλλουν την ανάπτυξη μιας ασθένειας χωρίς να ανταγωνίζονται απευθείας τον παθογόνο μικροοργανισμό. Η καταπολέμηση της ασθένειας, στην περίπτωση αυτή είναι πολύ πιθανό να οφείλεται είτε στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των φυτών που συνεπάγεται τη βράχυνση του σταδίου στο οποίο το φυτό είναι ευπαθές στην προσβολή, είτε στην επαγωγή διασυστηματικής αντοχής του φυτού έναντι του παθογόνου (Kloepper, et al., 1999).

Παρά τις έρευνες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια, προκειμένου να αναλυθούν εις βάθος οι μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιούν για την καταστολή ορισμένων παθογόνων, δεν υπάρχουν ακόμα ενδείξεις ότι όλα τα PGPR έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό, έχει προταθεί ο διαχωρισμός των PGPR από τους μικροοργανισμούς-ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων. Στα PGPR κατατάσσονται μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών χωρίς να καταστέλλουν την ανάπτυξη κάποιων άλλων, ενώ στους ανταγωνιστές κατατάσσονται μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών καταστέλλοντας τις προσβολές από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Bashan, et al., 1997). Οι μικροοργανισμοί-ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων έχουν την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών καταστέλλοντας την ανάπτυξη ή ακόμα και θανατώνοντας παθογόνα, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους μηχανισμούς καταστολής.

1.7 Τα βακτήρια ως βιολογικοί παράγοντες καταστολής των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Ο όγκος των αναφορών που πραγματεύονται την ανταγωνιστική δράση των βακτηρίων έναντι ορισμένων μυκήτων, ολοένα και αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Τα πεδία της έρευνας στρέφονται προς τη μελέτη της επιδημιολογίας της προσβολής από το παθογόνο, τη βιολογία του βακτηρίου στη σπερμόσφαιρα και τη ριζόσφαιρα καθώς και στο μηχανισμό καταστολής (είδος παρεμποδιστικών ενώσεων, γονίδια και βιοχημικές οδοί που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους, δυναμική βιοσύνθεση *in planta* σε σχέση με τη διαδικασία προσβολής και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας της ριζόσφαιρας και της σπερμόσφαιρας). Ο συνδυασμός του γενετικού και του βιοχημικού προσδιορισμού της ανταγωνιστικής αυτής δράσης βοηθά στη διερεύνηση και την ερμηνεία πολλών άλυτων έως τώρα ερωτημάτων. Ο ρόλος των βακτηρίων ως βιολογικών ανταγωνιστών είναι πλέον αδιαμφισβήτητος. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά που καθιστούν ένα βακτήριο ικανό ανταγωνιστή των φυτοπαθογόνων (Becker, et al., 1993).

Βασικό κριτήριο για την επιλογή ενός βιολογικού παράγοντα καταστολής είναι η ικανότητά του να εγκαθίσταται και να διατηρεί τον πληθυσμό του στη ριζόσφαιρα κάτω από συγκεκριμένες εδαφοκλιματικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, υγρασία, pH, μηχανική σύσταση του εδάφους, διαθεσιμότητα οξυγόνου). Ο επιτυχής αποικισμός είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης, συνεχούς και λεπτής ισορροπίας μεταξύ πολλών βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (Loper, et al., 1985) (Acea, et al., 1988; Bahme, et al., 1987; Howie, et al., 1987; Kwok, et al., 1987; Stephens, et al., 1987; Lam, 1990). Σε σύγκριση με το μεγαλύτερο μέρος του εδάφους που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών, οι ρίζες και το άμεσα γειτονικό τους περιβάλλον είναι «ελκυστικές» τοποθεσίες τόσο για τα «ευεργετικά» όσο και για τα εδαφογενή παθογόνα μικρόβια. Της εγκαθίδρυσης της

αλληλεπίδρασης φυτού-μικροβίου προηγείται η κίνηση των ελεύθερα διαβιώντων μικροοργανισμών προς τη ρίζα των φυτών.

Ο χημειοτακτισμός μέσω των εκκριμάτων της ρίζας φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση των βακτηριακών κυττάρων στη ριζόσφαιρα (Bais, et al., 2004; Welbaum, et al., 2004). Οι ψευδομονάδες που θεωρούνται «ευεργετικές» για τα φυτικά είδη, οδηγούνται χημειοτακτικά στην επιφάνεια των ριζών λόγω της κινητικότητας τους μέσω των μαστιγίων που διαθέτουν (De Weger, et al., 1987; Turnbull, et al., 2001a; Tunbull, et al., 2001b; De Weert, et al., 2002). Ο επακόλουθος ανταγωνισμός για τα θρεπτικά, είναι υπεύθυνος για την επιλογή των καλύτερα προσαρμοσμένων ατόμων δίνοντας, έτσι, το πλεονέκτημα στα άτομα αυτά για τον επιτυχημένο αποικισμό της ριζόσφαιρας. Ένα πολύ καλά μελετημένο παράδειγμα είναι αυτό του στελέχους WCS365 της *Pseudomonas fluorescens*, το έχει απομονωθεί από την πατάτα (*Solanum tuberosum*) (Geels, et al., 1983) και είναι καλός αποικιστής τόσο της ρίζας της πατάτας (Brand, et al., 1991) όσο και της τομάτας (*Lycopersicon esculentum* L.) (Simons, et al., 1996). Το στέλεχος αυτό ελέγχει αποτελεσματικά τις ασθένειες που προκαλούνται τόσο στην τομάτα όσο και στην πατάτα από τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-lycopersici* (Dekkers, et al., 2000). Επιπρόσθετα της κινητικότητας, της παραγωγής λιποπολυσακχαριτών και κυρίως του Ο-αντιγόνου, άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στον επιτυχή αποικισμό της ρίζας από το στέλεχος WCS365 είναι ο υψηλός ρυθμός της αύξησής του, η ικανότητα βιοσύνθεσης βιταμίνης B1 και η έκκριση της αφυδρογονάσης του NADH (Simons, et al., 1996; Dekkers, et al., 1998b; Camacho-Carvajal, et al., 2002). Όσον αφορά στη χρήση πηγών άνθρακα που είναι παρούσες στα εκκρίματα της ρίζας, ο αποικισμός της ρίζας της τομάτας από το συγκεκριμένο στέλεχος δεν εξαρτάται από τη χρήση συγκεκριμένων σακχάρων (Lugtenberg, et al., 1999). Τα αμινοξέα που είναι παρόντα στα εκκρίματα της ρίζας (λευκίνη, αργινίνη, ιστιδίνη, βαλίνη, ισολευκίνη και τρυπτοφάνη) παίζουν ουσιαστικό ρόλο στον επιτυχή αποικισμό της ρίζας από το στέλεχος WCS365 (Simons, et al., 1997), ενώ αντίθετα η παρουσία της πολυαμίνης πουτρεσκίνη, επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα αποικισμού της ριζόσφαιρας από το στέλεχος αυτό (Kuiper, et al., 2001). Η *in vitro* αξιολόγηση πραγματοποιείται ανάλογα με τον τρόπο δράσης και το μηχανισμό καταστολής που χρησιμοποιεί ο μικροοργανισμός.

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να παρεμποδίζει την *in vitro* ανάπτυξη ενός παθογόνου δεν συνεπάγεται σε καμία περίπτωση και την καταστολή της ασθένειας που προκαλείται από το παθογόνο *in vivo* (Wong, et al., 1984). Είναι δυνατόν, κάποια στελέχη που παρουσιάζουν μεγάλη αναστολή της αύξησής *in vitro* να μην καταστέλλουν ικανοποιητικά το παθογόνο *in vivo*.

Τα βακτήρια τους γένους *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Streptomyces* είναι οι πιο καλά μελετημένοι βιολογικοί ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων μυκήτων, με τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* να κατέχουν την πρώτη θέση στη μεγάλη αυτή λίστα. Σύμφωνα με τον Whipps (Whipps, 2001) υπάρχουν πολλοί λόγοι που οι ψευδομονάδες κατέχουν αυτή την πρωτιά. Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται εξαιρετικά γρήγορα και είναι άριστοι αποικιστές της ριζόσφαιρας και της φυλλόσφαιρας, απομονώνονται εύκολα από το φυσικό τους περιβάλλον, αξιοποιούν ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών πηγών, αναπτύσσονται εύκολα *in vitro* και επιδέχονται γενετικής τροποποίησης.

Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα της ανταγωνιστικής τους δράσης. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* στέλεχος CHA0 αποδείχθηκε ικανός βιολογικός ανταγωνιστής του

νηματώδους *Meloidogyne javanica* που προκαλεί το σχηματισμό φυματίων στην τομάτα (Siddiqui, et al., 2003). Η φθορίζουσα ψευδομονάδα *Pseudomonas fluorescens* 2-79 και η *Pseudomonas aurofaciens* 30-84 που απομονώθηκαν από ρίζες σιταριού, αποδείχθηκε ότι μείωναν το παρασιτικό πλάγιασμα (take-all decline). Οι ψευδομονάδες αυτές εκδήλωναν την ανταγωνιστική τους δράση εναντίον του *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* μέσω της παραγωγής της αντιβιοτικής ουσίας φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ (phenazine-1-carboxylic acid) (Tomashow, et al., 1990). Το βακτήριο *Pseudomonas aurantiaca* S-1 παρήγαγε αντιμικροβιακές ενώσεις εναντίον του *Fusarium oxysporum* (Mandryk, et al., 2007) και η φθορίζουσα ψευδομονάδα *Pseudomonas fluorescens* HV37a κατέστειλε τη δράση του *Pythium ultimum* με τον ίδιο μηχανισμό (Douglas, et al., 1986). Τα βακτήρια αυτά απομονώθηκαν από τις εστίες μόλυνσης του ίδιου του παθογόνου ενώ ένα πλούσιο απόθεμα από όπου θα μπορούσαν να απομονωθούν ήταν τα κατασταλτικά εδάφη (Sneh, et al., 1987).

1.8 Μηχανισμοί καταστολής φυτοπαθογόνων μυκήτων από βακτηριακούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς.

Τα μέσα που χρησιμοποιούν τα βακτήρια προκειμένου να ανταγωνιστούν τα παθογόνα είναι ποικίλα και διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο της αλληλεπίδρασης (έμμεσος, άμεσος ανταγωνισμός) και τον μηχανισμό του ανταγωνισμού (παρασιτισμός, ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία, αντιβίωση). Ο άμεσος ανταγωνισμός προκύπτει από τη φυσική επαφή και τον υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας του βιολογικού ανταγωνιστή ως προς το παθογόνο. Οι βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης οι οποίοι ανήκουν στον άμεσο τύπο ανταγωνισμού, αλληλεπιδρούν με το παθογόνο με μηχανισμούς οι οποίοι είναι άμεσα εξαρτώμενοι από την παρουσία του παθογόνου. Με αυτή την έννοια, ο παρασιτισμός θεωρείται η πιο άμεση μορφή ανταγωνισμού διότι η καταστολή του παθογόνου επιτυγχάνεται από τον ίδιο τον βιολογικό παράγοντα, συχνά σε επαφή με τον παθογόνο μικροοργανισμό. Το φαινόμενο αυτό, λαμβάνει χώρα τόσο στη φυλλόσφαιρα όσο και στη ριζόσφαιρα μέσω της παραγωγής και απέκκρισης ενζύμων όπως οι χιτινάσες και οι κυτταρινάσες, χωρίς να μεσολαβήσει άλλος ή μέσο (Pal, et al., 2006). Μικροοργανισμο-βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης, οι οποίοι ανήκουν στον έμμεσο τύπο ανταγωνισμού, αλληλεπιδρούν με το παθογόνο με μηχανισμούς των οποίων η έκφραση δεν είναι απαραίτητα συνδεδεμένη με την παρουσία του παθογόνου. Χαρακτηριστική περίπτωση έμμεσου ανταγωνισμού είναι η επαγωγή ανθεκτικότητας, όπου η εφαρμογή των ριζοβακτηρίων δεν επηρεάζει δυσμενώς το παθογόνο αλλά επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο φυτό. Ο ανταγωνισμός θέσης στη ριζόσφαιρα καθώς και ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά συστατικά είναι πολύ γνωστοί μηχανισμοί επιβίωσης των βακτηρίων. Ορισμένα βακτήρια της ριζόσφαιρας, όπως για παράδειγμα οι φθορίζουσες ψευδομονάδες, έχουν την ικανότητα να παράγουν εξειδικευμένες ενώσεις, που ονομάζονται σιδηροφόρα, οι οποίες δεσμεύουν τον σίδηρο και τον αποστερούν από τα παθογόνα (Weller, 1988; Penyalver, et al., 2001), δρώντας ανταγωνιστικά. Μια άλλη χαρακτηριστική περίπτωση ανταγωνισμού είναι ο ανταγωνισμός με παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από τους βιολογικούς παράγοντες φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μηχανισμοί καταπολέμησης, που χρησιμοποιούνται από τους βιολογικούς παράγοντες της κατηγορίας αυτής, είναι δυνατόν

να παίζουν διαφορετικό ρόλο στη φυσιολογία του βιολογικού παράγοντα από το ρόλο που παίζουν στο παθογόνο (Pal, et al., 2006).

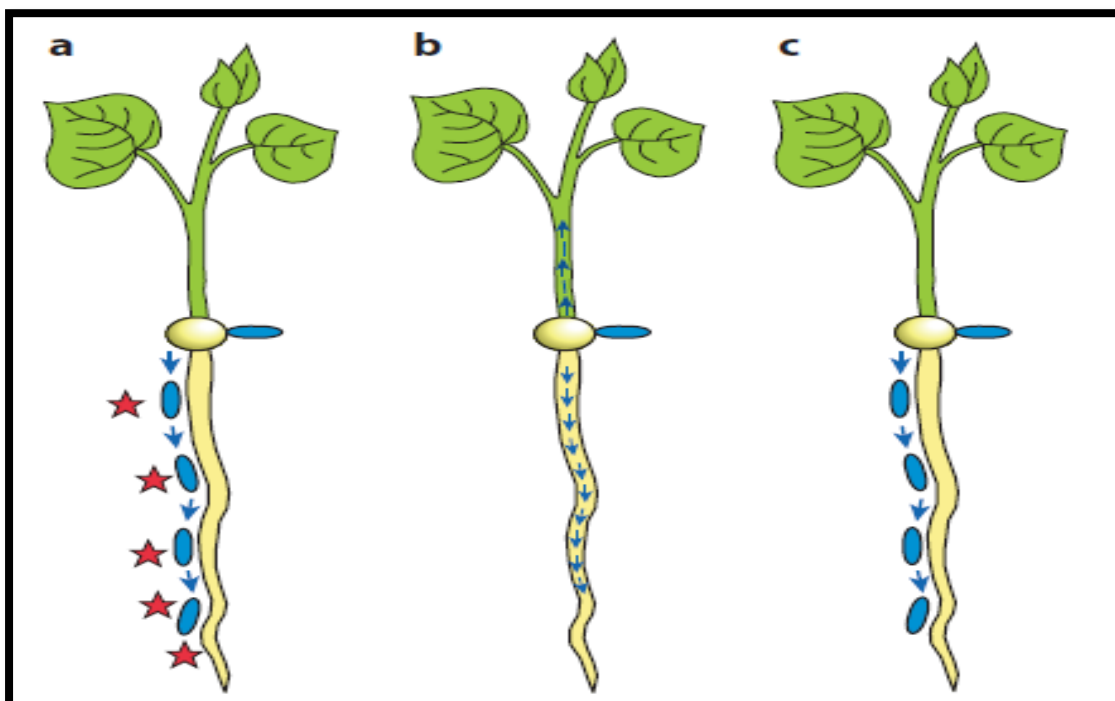
Ο τύπος αλληλεπίδρασης καθώς και οι μηχανισμοί καταπολέμησης που θα αναπτύξει ένας μικροοργανισμός στο ενδιαίτημά του εξαρτώνται άμεσα από πολλούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί περιπλέκουν τη μελέτη των μηχανισμών καταπολέμησης, γεγονός που απαιτεί την απλοποίηση των συνθηκών κάτω από τις οποίες διεξάγεται η εκάστοτε μελέτη. Η δημιουργία μετταλλαγμένων στελεχών και η μελέτη τους σε απλοποιημένα πειραματικά συστήματα αλλά και στο πεδίο, επιτρέπει την διερεύνηση μοριακών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, τα οποία καθιστούν συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ικανούς να καταστείλουν ένα παθογόνο (Handelsman, et al., 1996).

Πίνακας 3: Τύποι ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων σε συσχετισμό με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από τους παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης (Pal, et al., 2006)

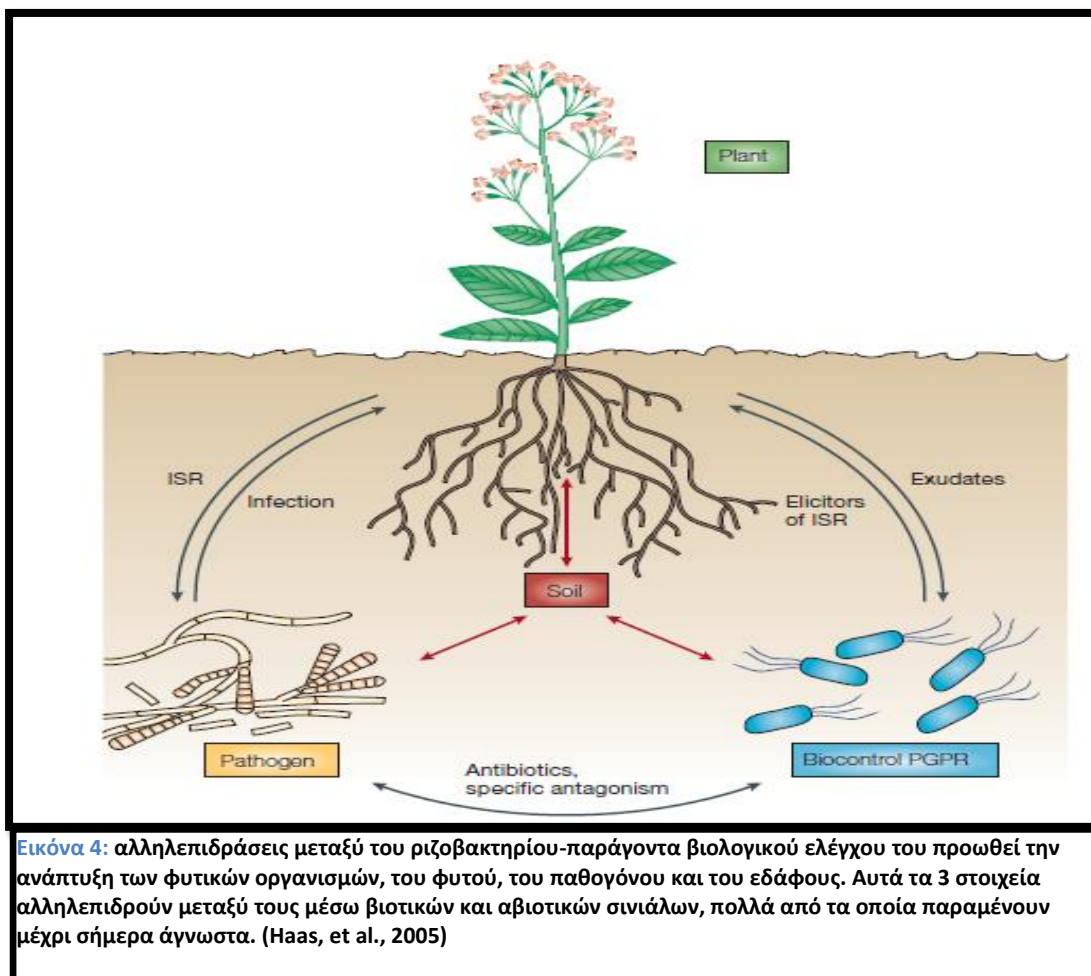
Τύπος ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης	Μηχανισμοί καταπολέμησης
Άμεσος ανταγωνισμός	Παρασιτισμός-Θήρευση
Έμμεσος ανταγωνισμός	Παραγωγή αντιβιοτικών
	Παραγωγή κυκλικών λιποπεπτιδίων αντιμικροβιακής δράσης
	Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία
	Οικολογικός αποκλεισμός
	Παραγωγή πτητικών ενώσεων
	Επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας.

Οι μικροοργανισμοί-ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων φαίνεται ότι δρουν μέσω 3 κύριων μηχανισμών:

- Παραγωγή αντιβιοτικών
- Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή.
- Ανταγωνισμός για θρεπτικά και μικροθέσεις στη ριζόσφαιρα.



Εικόνα 3: Απεικόνιση των πιο σημαντικών μηχανισμών βιολογικού ελέγχου των φυτικών ασθενειών από τα βακτήρια. Σε όλες τις περιπτώσεις που απεικονίζονται, ο βιολογικός έλεγχος ξεκινά με την εναπόθεση του βακτηρίου-παράγοντα βιολογικού ελέγχου στα σπέρματα του φυτού. **(a) Παραγωγή αντιβιοτικών.** Το βακτήριο αποικεί το αναπτυσσόμενο ριζικό σύστημα και «διανέμει» αντιβιοτικά μόρια γύρω από τη ρίζα, βλάπτοντας έτσι τα παθογόνα που προσεγγίζουν τη ρίζα (υποδεικνύονται με αστέρια), **(b) Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR).** Ο τοπικός αποικισμός της ρίζας αρκεί για την επαγωγή της ISR. Πολλά βακτηριακά προϊόντα επάγουν την μεταγωγή σήματος, που μπορεί να οδηγήσει στην προστασία ολόκληρου του φυτού από ασθένειες που προκαλούνται από διαφορετικούς οργανισμούς, **(c) Ανταγωνισμός για θρεπτικά και μικροθέσεις.** Τα βακτήρια-παράγοντες βιολογικού ελέγχου, που δρουν μέσω αυτού του μηχανισμού, υπερτερούν σε γρήγορη χημειοτακτική κίνηση κατά μήκος της αναπτυσσόμενης ρίζας, και είναι πιο αποτελεσματικά στο «κυνήγι» των εκκρινμάτων της ρίζας, και έτσι ανταγωνίζονται το παθογόνο απομακρύνοντας θρεπτικά και καταλαμβάνοντας θέσεις στη ρίζα. (Lugtenberg, et al., 2009).



Εικόνα 4: αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ριζοβακτηρίου-παράγοντα βιολογικού ελέγχου του προωθεί την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών, του φυτού, του παθογόνου και του εδάφους. Αυτά τα 3 στοιχεία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω βιοτικών και αβιοτικών σιγμάτων, πολλά από τα οποία παραμένουν μέχρι σήμερα άγνωστα. (Haas, et al., 2005)

1.8.1 Αντιμικροβιακές ενώσεις από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

Οι αντιμικροβιακές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού και περιλαμβάνουν αντιβιοτικές ενώσεις, ένζυμα και πτητικές ουσίες όπως το υδροκυάνιο (Weller, 1988; Tomashow, et al., 1995), οι οποίες σε μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Οι αντιβιοτικές ενώσεις συγκεκριμένα, είναι οργανικά μόρια μικρού μοριακού βάρους όπου σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη και τις μεταβολικές διεργασίες των μικροοργανισμών. Το έδαφος είναι πλούσιο σε μικροοργανισμούς ικανούς να συνθέτουν αντιβιοτικές ενώσεις και το γεγονός αυτό είναι αποδεδειγμένο τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Το ενδιαφέρον, σήμερα, έχει στραφεί στα γονίδια και τις βιοχημικές οδούς που ελέγχουν τη βιοσύνθεσή τους καθώς και στη δυναμική βιοσύνθεση *in planta* σε σχέση με τη διαδικασία προσβολής και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας της ριζόσφαιρας και της σπερμόσφαιρας. Η ανάπτυξη μοριακών και γενετικών τεχνικών σε συνδυασμό με την χρήση ποικίλων βιοαναλυτικών εφαρμογών έχει αποδείξει ότι μικροοργανισμοί παράγουν μια ποικιλία αντιβιοτικών ενώσεων τόσο στη σπερμόσφαιρα όσο και στη ριζόσφαιρα του φυτού ξενιστή. Πολλοί αβιοτικοί παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, οι πηγές αζώτου, άνθρακα και μικροστοιχείων καθώς και άλλων προϊόντων του μεταβολισμού που απελευθερώνονται από τα φυτά μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση των αντιβιοτικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι αντιβιοτικές ενώσεις ανταγωνίζονται ή/και καταστέλλουν τη δράση

παθογόνων μικροοργανισμών στα φυτά, όμως, ο ακριβής μηχανισμός δράσης για πολλές από αυτές δεν είναι απόλυτα γνωστός (Tomashow, et al., 2002).

Είναι, επίσης, γνωστό, ότι για την βιοσύνθεση των αντιβιοτικών ενώσεων, που είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, απαιτούνται σημαντικά ποσά ενέργειας. Η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών στη ρίζα, και επομένως η επίδρασή τους στη σύνθεση της μικροχλωρίδας, σχετίζεται στενά με τα επίπεδα αποικισμού των οργανισμών που τις παράγουν. Οι μικροοργανισμοί με δυνατότητα παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών πλεονεκτούν σημαντικά έναντι των παθογόνων ανταγωνιστών τους γιατί μπορούν να αξιοποιούν οικοθέσεις-κλειδιά, που τους εξασφαλίζουν πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων που απελευθερώνονται από τις ρίζες και διασφαλίζουν την ανάπτυξή τους. Παραγωγή αντιβιοτικών είναι δυνατόν να παρατηρείται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες και ως εκ τούτου, ενώ άλλα βακτηριακά στελέχη έχουν την ικανότητα παραγωγής αντιβιοτικών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, για άλλα η ικανότητα αυτή περιορίζεται μόνο *in vivo* και παρουσία παθογόνου.

Πολλοί παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης, έχουν την ικανότητα να παράγουν περισσότερα από ένα αντιβιοτικά τα οποία έχουν την ικανότητα καταστολής του παθογόνου. Στην περίπτωση αυτή, τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να δρουν είτε συνδυασμένα είτε μεμονωμένα και το καθένα να έχει διαφορετικό ποσοστό συμμετοχής στην καταπολέμηση (Weller, 1988). Το κάθε αντιβιοτικό, το οποίο είναι δυνατόν να παράγεται από πολλά στελέχη του ίδιου γένους ή και από στελέχη διαφορετικών γενών, ενδέχεται να παρουσιάζει μη εξειδικευμένη δράση. Αυτό υποδηλώνει ότι συγκεκριμένα αντιβιοτικά, τα οποία είναι δυνατό να παράγονται από μία μικροβιακή κοινότητα ή από ένα μόνο παράγοντα καταπολέμησης, μπορεί να έχουν κατασταλτική δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος παθογόνων (Raaijmakers, et al., 2002).

Ιστορικά, το πιο γνωστό παράδειγμα βιολογικής καταπολέμησης λόγω παραγωγής αντιβιοτικών είναι αυτό της καταπολέμησης του παθογόνου βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium radiobacter* K84. Το παθογόνο *Agrobacterium tumefaciens* είναι το μοναδικό που προκαλεί την ευρέως διαδεδομένη ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών, που ονομάζεται καρκίνος. Το στέλεχος K84 του *Agrobacterium radiobacter* είναι μη παθογόνο και παράγει την βακτηριοσίνη αγροσίνη 84, η οποία αποτελεί αντιβιοτικό και καθιστά το στέλεχος *Agrobacterium radiobacter* παράγοντα βιολογικής καταπολέμησης του *Agrobacterium tumefaciens*.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν απομονωθεί πολλές αντιβιοτικές ενώσεις από βιολογικούς ανταγωνιστές που ανήκουν σε διαφορετικά γένη βακτηρίων (Raaijmakers, et al., 2002; Haas, et al., 2003). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνών που αναδεικνύουν την παραγωγή αντιβιοτικών ως τον σημαντικότερο μηχανισμό βιολογικής καταπολέμησης έχουν πραγματοποιηθεί σε βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές (Handelsman, et al., 1996; Whipps, 1997; Lugtenberg, et al., 2003) να διατυπώσουν την άποψη ότι το γένος αυτό κατέχει σημαντική θέση στην βιολογική καταπολέμηση, εξαιτίας ενός ευρέος φάσματος αντιβιοτικών που έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει.

Από το γένος *Pseudomonas*, 4 είδη (*Ps. aeruginosa*, *Ps. entomophila*, *Ps. syringae* και *Ps. fluorescens*) κατέχουν εξέχουσα θέση στην παραγωγή μιας πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι αντιβιοτικά. Το γονιδίωμα 22 στελεχών από τα 4 προαναφερθέντα είδη, έχει αλληλουχιθεί πλήρως και με τη βοήθεια της

βιοπληροφορικής έχει υπολογιστεί ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν περίπου το 6% ολόκληρου του γονιδιώματος. Μεταξύ των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών συγκαταλέγονται γονίδια των οποίων η έκφραση έχει μελετηθεί αλλά και γονίδια για τα οποία υπάρχουν δεδομένα που προέρχονται μόνο από βιοπληροφορική ανάλυση (Gross, et al., 2009). Είναι, λοιπόν, λογικό να έπονται ανακαλύψεις νέων γονιδίων και νέων βιοσυνθετικών μονοπατιών δευτερογενών μεταβολιτών, άγνωστων μέχρι σήμερα.

1.8.1.2 Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών που παράγονται από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.*

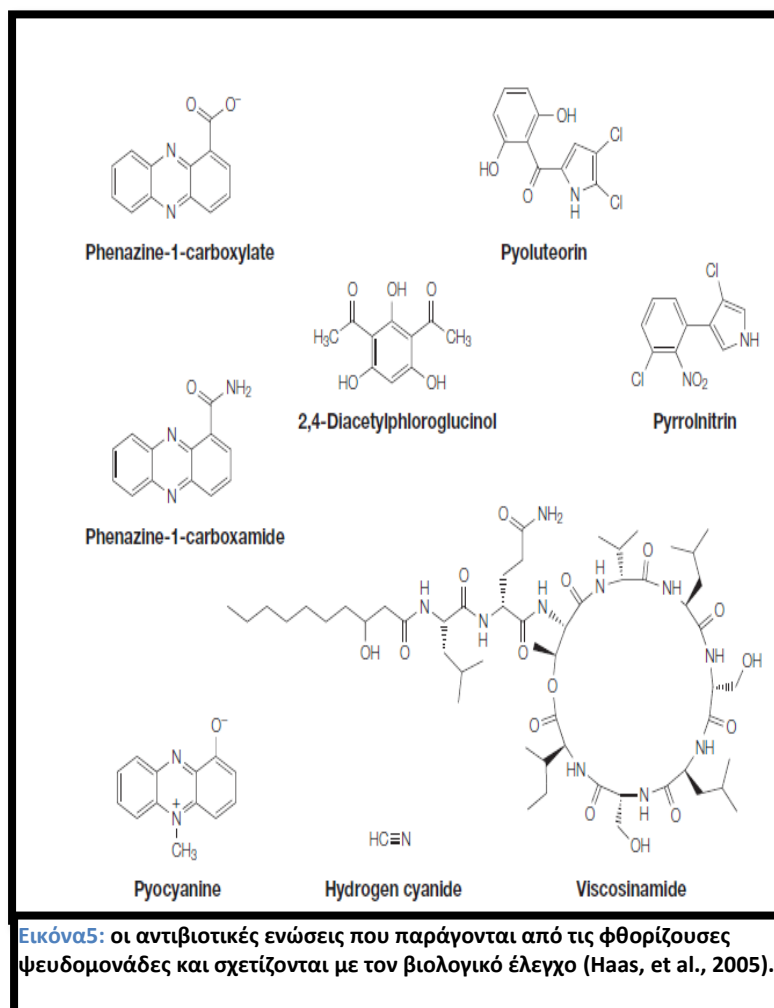
Τις τελευταίες 2 δεκαετίες έχουν απομονωθεί πάρα πολλά αντιβιοτικά από διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων. Για τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά αυτά έχει μελετηθεί ο τρόπος δράσης, η δομή και το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών που βιοσυντίθενται σε διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων του γένους *Pseudomonas*, το παθογόνο το οποίο έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν, την καλλιέργεια στην οποία παρατηρείται η βιολογική καταπολέμηση καθώς και η χώρα στην οποία έχει απομονωθεί ο βιολογικός παράγοντας. Αναλόγως του μονοπατιού βιοσύνθεσης του κάθε αντιβιοτικού και των ενζύμων που εμπλέκονται σε αυτό, τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις ομάδες (Gross, et al., 2009). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει αντιβιοτικά στους οποίων το βιοσυνθετικό μονοπάτι εμπλέκονται μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες (**Non-Ribosomal Peptide Synthases, NRPS**). Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται τα αντιβιοτικά αερουτζίνη, σαφρασίνη και πυρρολιντρίνη, καθώς και κάποιες τοξίνες (μανγκοτοξίνη, ταμπτοξίνη, φασεολοτοξίνη), ορισμένα σιδηροφόρα (πυοχελίνες, πυοβερντίνες) καθώς και κάποια **λιποπεπτίδια**, τα οποία εμφανίζουν είτε φυτοτοξική είτε αντιβιοτική δράση (Gross, et al., 2009). Στη δεύτερη ομάδα κατατάσσονται αντιβιοτικά στη βιοσύνθεση των οποίων εμπλέκονται πολυκετιδικές συνθάσες (**Polyketide Synthases, PKS**) ή συνθάσες λιπαρών οξέων (**Fatty Acids Synthases, FAS**). Στην ομάδα αυτή κατατάσσεται το αντιβιοτικό DAPG και το σιδηροφόρο ψευδομονικό οξύ (Gross, et al., 2009). Η τρίτη ομάδα αποτελείται από αντιβιοτικά τα οποία προέρχονται από τη συνδυαστική δράση των NRPS και PKS συνθετασών και σε αυτή την ομάδα ανήκει το αντιβιοτικό πυολουτερίνη και κάποιες φυτοτοξικές ενώσεις (συριγκολίνες, κορονατίνη και περεδίνες). Τέλος, στην τέταρτη ομάδα, βρίσκονται τα αντιβιοτικά φεναζίνες, κινολόνες, αλλά και το υδροκυάνιο. Η βιοσύνθεση των αντιβιοτικών της ομάδας αυτής είναι ανεξάρτητη από τις συνθάσες NRPS και PKS (Gross, et al., 2009).

Πίνακας 4: αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αντιβιοτικών ουσιών που παράγονται από βακτηριακούς ανταγωνιστές.

Αντιβιοτικό	Είδος/Στέλεχος	Παθογόνο στόχος	Ξενιστής/Προέλευση
Φλορογλουκινόλες (DAPG)	<i>Pseudomonas</i> spp.		
	Q2-87	Ggt	Σιτάρι/ΗΠΑ
	CHA0	Ggt, Tb, Pu	Καπνός/Ελβετία
	F113	Pu	Ζαχαρότευτλο
	PFM2	St	Ιρλανδία
	Pf5	Pu, Rs	Σιτάρι/ΗΠΑ
	Q8R1-96	Ggt	Βαμβάκι/Τέξας, ΗΠΑ
Φεναζίνες (Phenazines)	<i>Pseudomonas</i> spp.		
	2-79RN10	Ggt	Σιτάρι/ΗΠΑ
	<i>Ps.aureofaciens</i> 30-24	Ggt	Σιτάρι, Κάνσας/ΗΠΑ
	<i>Ps.aureofaciens</i> PGS12	Fo	Δημητριακά/Βέλγιο
	In-b-109	Rs, Gg	Ρύζι/Φιλιππίνες
	PCL1391	Fo	Ντομάτα/Ισπανία
	PNA1	Fo, Ps	Ρεβίθι/Ινδία
Αερουτζίνη	<i>Ps.fluorescens</i> MM-B16	Pc, Co	Πιπεριά-αγγούρι/Κορέα
Ομοκίνη Α	<i>Ps.fluorescens</i> Hv37a	Pu	Κριθάρι/ΗΠΑ
Πυρρολιτρίνες	<i>Ps.fluorescens</i> BL915	Rs	Βαμβάκι/ΗΠΑ
	<i>B.cepacia</i> B37w	Fs	πατάτα
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bc, Rs	Αμπέλι/Ουζμπεκιστάν
	<i>Serratia</i> spp.	Vd, Rs, Ss	Ελακράμβη
Πυολουτερίνες	<i>Pseudomonas</i> spp.		
	Pf5	Pu, Rs	Βαμβάκι/Τέξας, ΗΠΑ
	CHA0	Tb, Pu	Καπνός/Ελβετία
2,3-διεπόξυ-2,3 διδεδροριζοξίνη (DDR)	<i>Ps.borealis</i> MA342	Pt, Tc	Σιτάρι-Δημητριακά
Βισκοσυναμίδη	<i>Ps.fluorescens</i> DR54	Rs, Pu	Ζαχαρότευτλο/Δανία
Βουτυρολακτόνες	<i>Ps.aureofaciens</i> 63-28	Pu, Pc	Καναδάς
N-βουτυλβενζέν-σουλφοναμίδιο (N-BBS)	<i>Pseudomonas</i> sp.AB2	Pu, Rs, Bc	Έδαφος/Κορέα
Παντοσίνη	<i>Ps.agglomerans</i> EH318	Eh	Μήλο/ΗΠΑ

Συντομογραφίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στον πίνακα: DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol, At – *Agrobacterium tumefaciens*, Ggt *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, Tb – *Thielaviopsis basicola*, Pu, *Pythium ultimum*, St – *Septoria tritici*, Rs – *Rhizoctonia solani*, Fo – *F. oxysporum*, Gg – *G. graminis*, Ps – *Pythium splendens*, Fs – *Fusarium sambucinum*, Pt – *Pyrenophora teres*, Tc – *Tilletia caries*, Pc – *Phytophthora cryptogea*, Bc – *Botrytis cinerea*, Eh – *Erwinia herbicola*, Vd – *Verticillium dahliae*, Ss – *Sclerotinia sclerotiorum*, Pc – *Phytophthora capsici*, Co – *Colletotrichum orbiculare*. (Raaijmakers, et al., 2002; Pal, et al., 2006)

Στην ομάδα των φλορογλουκινολών, κατατάσσονται ενώσεις οι οποίες περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο στο μόριο τους. Οι ενώσεις αυτές είναι είτε φυτικής είτε βακτηριακής προέλευσης και εμφανίζουν αντική, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να είναι φυτοτοξικές (Bangera, et al., 1999; Keel, 1992). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πάνω από 60 παράγωγα φλορογλουκινόλης, από αυτά όμως, μόνο τρία, η μονοακετυλοφλορογλουκινόλη (MAPG), η 2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλη (2,4-DAPG) και η τριακετυλοφλορογλουκινόλη (TAPG), παράγονται από στελέχη ψευδομονάδων (Reddi, et al., 1969; Shanahan, et al., 1992). Η **2,4-DAPG**, έχει παρατηρηθεί μόνο σε στελέχη του γένους *Pseudomonas* και στην αντιμικροβιακή της δράση, αποδίδεται το μεγάλο ενδιαφέρον το οποίο έχει αποκτήσει το γένος *Pseudomonas spp.* στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων του εδάφους, όπως στελέχη των γενών *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Gaeumannomyces spp.* και *Thielaviopsis spp.* (Delany, et al., 2000). Ο τρόπος δράσης της 2,4-DAPG δεν είναι ακόμα πλήρως μελετημένος αλλά φαίνεται ότι εμπλέκεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παρεμποδίζοντας την λειτουργία των μιτοχονδρίων και μεταβάλλοντας τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς όμως να έχει λυτική δράση. Έχει αναφερθεί, ότι η 2,4-DAPG προκαλεί βλάβες στην μεμβράνη στελεχών του *Pythium spp.* και είναι ιδιαίτερα ανασταλτική στη βλάστηση των ζωοσπορίων του συγκεκριμένου ωομύκητα (de Souza, 2003) Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι η 2,4-DAPG μπορεί να επάγει την διασυστηματική αντοχή στα φυτά (Ramos, 2004).



Εικόνα5: οι αντιβιοτικές ενώσεις που παράγονται από τις φθορίζουσες ψευδομονάδες και σχετίζονται με τον βιολογικό έλεγχο (Haas, et al., 2005).

Στα αντιβιοτικά της ομάδας των **φenaζινών** κατατάσσονται χρωμοφόρες, αρωματικές, ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες περιέχουν άζωτο στο μόριο τους. Οι ενώσεις της ομάδας αυτής παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης με κορυφές στα 250-290 nm και στα 350-400nm (Anjiaiah, 2004). Η βασική δομική μονάδα μιας φenaζίνης περιλαμβάνει δυο βενζολικούς δακτύλιους συνδεδεμένους με ένα δακτύλιο πυραζίνης. Η ποικιλομορφία των διάφορων φenaζινών έγκειται στην πρόσδεση υδροξυλομάδων και

καρβοξυλομάδων στους βενζολικούς δακτυλίους καθώς και αμινομάδων και μεθυλενομάδων στα δύο άτομα αζώτου του δακτυλίου πυραζίνης (Gross, et al., 2009). Οι φεναζίνες παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης, το οποίο αποδίδεται στη μεγάλη οξειδοαναγωγική τους ικανότητα (Whelan, et al., 2006).

Διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην αναπνοή και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχει βρεθεί ότι επάγουν την διασυστηματική ανθεκτικότητα των φυτών, ενισχύουν τη δημιουργία βιοφίλμ, είναι δυνατόν να αποτελούν μοριακά σήματα στο σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου(Fe^{3+}) παίζοντας ρόλο σιδηροφόρων και παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA (Pierson, et al., 2010). Οι ενώσεις πυοκυανίνη και η 1-υδρόξυ-φεναζίνη απομονώθηκαν από την *Pseudomonas aeruginosa* και προσδιορίστηκε η δομή τους με φασματομετρία μαζών (Keer, et al., 1999). Η ουσία φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ απομονώθηκε από καλλιέργεια της *Pseudomonas fluorescens 2-79* και κατέστειλε τις προσβολές των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Gaeumannomyces graminis var. tritici* και *Pythium spp.* που προσβάλλουν τα σιτηρά (Sarangamat, et al., 1986). Οι ενώσεις, φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ, 2-υδρόξυ-φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ και 2-υδρόξυφεναζίνη παράγονται από την *P. aureofaciens 30-84* (Delaney, et al., 2001). Η φεναζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ της *Pseudomonas aeruginosa PNA1* καταστέλλει τη σήψη της ρίζας που προκαλείται από τον *Pythium spp.* στο φασόλι (Perneel, et al., 2008), της *Pseudomonas sp. CMR12a* καταστέλλει τη σήψη της ρίζας που προκαλείται από την *R. solani* στο φασόλι (D'aes, et al., 2011), ενώ της *P. chlororaphis Phz24* μειώνει την ανάπτυξη των υφών του μύκητα *Sclerotium rolfsii* (Le, et al., 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη *CMR12a* και *PNA1* παράγουν επίσης ραμνολιπίδια και κυκλικά λιποπεπτιδία τα οποία συνδυάζονται με τις φεναζίνες και πιθανότατα βοηθούν τη διαλυτότητα των φεναζινών ή υποβοηθούν τη μεταφορά τους ή/και την είσοδό τους στα κύτταρα των μυκήτων (Perneel, et al., 2008). Ενδιαφέρον είναι ότι η ανηγμένη φεναζίνη-1-καρβοξαμίδιο μπορεί να απελευθερώσει ιόντα διαλυτού Fe^{2+} , από το αδιάλυτο $Fe^{3+}(OH)_3$ σε ουδέτερο pH, γεγονός το οποίο αυξάνει την πιθανότητα της συμμετοχής των φεναζινών στην «κινητοποίηση»(mobilization) του σιδήρου στο έδαφος (Hernandez, et al., 2004).

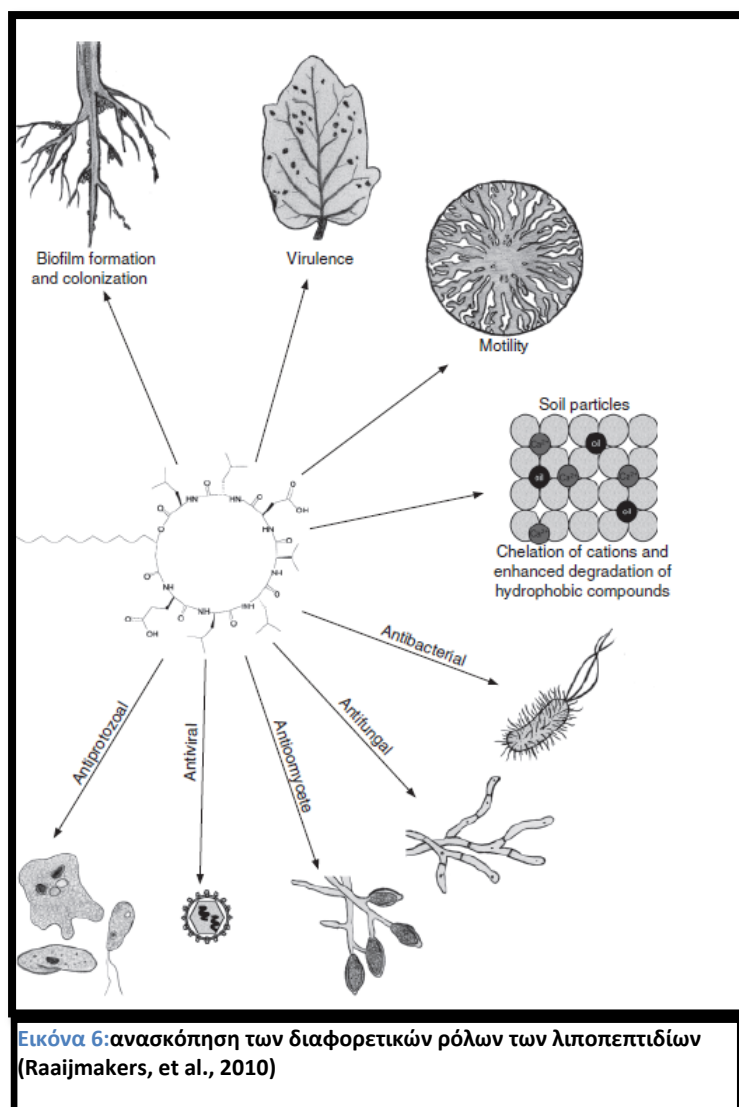
Η ομάδα των **φαινολοπυρρολικών** αντιβιοτικών περιλαμβάνει ενώσεις με τη δομή ενός χλωριωμένου αρωματικού πολυπεπτιδίου. Στο γένος *Pseudomonas* έχει παρατηρηθεί η ικανότητα βιοσύνθεσης δύο αντιβιοτικών της ομάδας αυτής. Τα 2 αντιβιοτικά αυτά είναι η πουλουτεορίνη(PLT) και η πυρρολιτρίνη(PRN) (van Pee, et al., 2000). Η αντιμικροβιακή δράση των φαινολοπυρρολικών αντιβιοτικών είναι ευρέως αποδεκτό ότι οφείλεται στην διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων παρεμποδίζοντας τη λειτουργία της κυτοχρωμικής οξειδάσης C. Πρόσφατα έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα αντιβιοτικά της ομάδας αυτής επάγουν τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών και τη συσώρευση γλυκερόλης, γεγονός που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής των κυτταρικών μεμβρανών και τελικά την κυτταρική λύση (van Pee, et al., 2000). Η παραγωγή PLT ανιχνεύθηκε πρώτη φορά, στα μέσα της δεκαετίας του '50, από τα στελέχη της *Ps. aeruginosa T359* και *IFO3455*. Σήμερα, η ικανότητα βιοσύνθεσης PLT απαντάται στα στελέχη βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης *Ps. fluorescens CHA0*, *M18* και *Pf5*, στα οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων και συγκεκριμένα ωομυκήτων (Gross, et al., 2009). Όσον αφορά στην PRN, πρόσφατες αναφορές αποδίδουν ικανότητα βιοσύνθεσης της, σε στελέχη βιολογικών παραγόντων

καταπολέμησης *Ps.fluorescens* BL195, Pf5 και CHA0 και στα στελέχη αυτά η PRN παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων (Gross, et al., 2009).

Αντιβιοτικές ενώσεις που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και παράγονται από στελέχη-παράγοντες βιολογικού ελέγχου της *Pseudomonas spp.* είναι το D-γλουκονικό οξύ(D-glucosil acid) που παράγεται από την *Pseudomonas sp.AN5* και καταστέλλει τον *Gaeumannomyces graminis var.tritici* (Kaur, et al., 2006) και η 2-εξυλο-5-προπυλ-ρεσορκινόλη(2-hexyl-5-propyl-resorcinol) που παράγεται από την *Pseudomonas fluorescens PCL1606* καταστέλλει τον μύκητα *Dematophora necatrix* που προσβάλλει τις ρίζες του αβοκάντο (Cazorla, et al., 2006). Επίσης, μια νέα φουρανόνη απομονώθηκε από το στέλεχος *Ps.aureofaciens* 63-28 με ικανότητα να καταστέλλει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *P.ultimum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* και *Thielaviopsis basicola* (Paulitz, et al., 2000).

Τα κυκλικά **λιποπεπτίδια** (CLPs) αποτελούν μια σχετικά νέα οικογένεια μορίων με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Συνήθως, αποτελούνται από μια αλυσίδα ενός λιπαρού οξέος η οποία είναι προσδεσμένη στο αμινοτελικό άκρο μιας σχετικά μικρής πεπτιδικής αλυσίδας. Πολλές φορές, στην πεπτιδική αλυσίδα υπάρχει ένας δακτύλιος λακτόνης, ο οποίος δημιουργείται από κυκλοποίηση δυο αμινοξικών καταλοίπων της. Αναλόγως του μεγέθους της πεπτιδικής αλυσίδας και της αλυσίδας του λιπαρού οξέος τα CLPs κατηγοριοποιούνται σε διάφορες ομάδες, οι οποίες διαφέρουν από γένος σε γένος (Raaijmakers, et al., 2006). Η ικανότητα βιοσύνθεσης τέτοιων ενώσεων έχει βρεθεί σε διάφορα γένη βακτηρίων και μυκήτων, μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση κατέχουν τα γένη *Bacillus spp.* και *Pseudomonas spp.* και για αυτά τα γένη υπάρχει πληθώρα πληροφοριών σε σχέση με τη δομική ποικιλότητα των CLPs, την βιοσύνθεσή τους και τις ευρέως φάσματος αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Gross, et al., 2009; Raaijmakers, et al., 2006; Ongena, και συν., 2008). Ο πρωταρχικός τρόπος δράσης που είχε αποδοθεί στα CLPs ήταν ο σχηματισμός πόρων στην μεμβράνη, που οδηγεί σε ανισοροπία στη διαμεμβρανική ροή των ιόντων με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο (Baltz, 2009). Με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά τα CLPs που παράγονται από το γένος *Pseudomonas spp.* αρχικά κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: **βισκοσίνες, αμφισίνες, συριγγομυκίνες και τολασίνες** (Nybroe, et al., 2004). Σχετικά πρόσφατα, έχουν ταυτοποιηθεί νέα CLPs, συμπεριλαμβανομένων της αρθροφακτίνης που παράγεται από το στέλεχος *Pseudomonas sp. MIS38* (Roongsawang, et al., 2003), οι πουτισολβίνες I και II που παράγονται από την *Pseudomonas putida* (Kuijper, et al., 2004) και των ψευδοδεσμίνων A και B που έχουν απομονωθεί από στέλεχος *Pseudomonas sp.* από το δέρμα σαλαμάνδρας (Sinnaeve, et al., 2009). Επιπλέον, σχετικά πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί και ένας μεγάλος αριθμός γραμμικών λιποπεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένων των συριγγοφακτινών της *Pseudomonas syringae* pv.totato στέλεχος DC3000 (Betri, et al., 2007) και της πεπτίνης-31(perptin31), ενός γραμμικού παραγώγου της συριγγοπεπτίνης, που παράγεται από το στέλεχος *P.syringae* 31R1 (Fiore, et al., 2008). Με τη μελέτη του προφίλ των μεταβολιτών έχει αποδειχθεί ότι στελέχη της *Pseudomonas sp.* μπορούν να παράγουν αρκετούς αντιπροσώπους διάφορων οικογενειών λιποπεπτιδίων, καθώς επίσης και διάφορα δομικά ανάλογα ενός συγκεκριμένου λιποπεπτιδίου. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι το στέλεχος *P.fluorescens* SS101 παράγει τουλάχιστον 8 δομικά ανάλογα λιποπεπτίδια της μασσετολίδης

Α(οικογένεια βισκοσινών) (De Bruijn, et al., 2008). Οι τρεις κύριες φυσικές λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στα λιποπεπίδια και έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα είναι ο ρόλος του στον ανταγωνισμό απέναντι σε άλλους (μικρο)οργανισμούς, ο ρόλος τους στην κινητικότητα και στην προσκόλληση σε επιφάνειες (Nybroe, et al., 2004; Raaijmakers, et al., 2006). Στο φυσικό περιβάλλον, τα λιποπεπίδια έχει προταθεί ότι προσδίδουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στους μικροοργανισμούς με ικανότητα βιοσύνθεσής τους στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλους μικροοργανισμούς. Όταν ελέγχονται *in vitro*, τα λιποπεπίδια που παράγονται από είδη της *Pseudomonas spp.* επιδεικνύουν λυτική δράση και προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ιών, μυκοπλασμάτων, βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων (Raaijmakers, et al., 2010). Η αντιική δραστηριότητα των βισκοσινών έχει αναφερθεί από το 1951 από τους Groupe et al. (Nybroe, et al., 2004). Η καταπολέμηση παθογόνων παραγόντων, όπως ιοί, μύκητες και βακτήρια από στελέχη βιολογικών παραγόντων, τα οποία έχουν ικανότητα παραγωγής CLPs, βασίζονται στις επιφανειοδραστικές του ιδιότητες. Η ικανότητα τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση είναι αποτέλεσμα των ιδιοτήτων των επιμέρους δομικών μονάδων. Η πεπτιδική αλυσίδα έχει πολικές ιδιότητες, οι οποίες ποικίλουν ανάλογα με το βαθμό υδροφοβικότητας του κάθε αμινοξέος, ενώ η αλυσίδα του λιπαρού οξέος έχει υδρόφοβο χαρακτήρα και έτσι οι δύο αυτές δομικές μονάδες των CLPs τους προσδίδουν αμφιφιλικές ιδιότητες και επομένως επιφανειοδραστική ικανότητα (Raaijmakers, et al., 2006). Η βισκοσίνη, οι μασσετολίδες, οι συριγκοπεπτίνες και οι συριγκομυκίνες που παράγονται από στελέχη του γένους *Pseudomonas spp.* έχουν την ικανότητα καταπολέμησης των *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intercellulate* και *Mycobacterium smegmatis* (Gerard, et al., 1997), ενώ στελέχη που παράγουν τολασίνες έχουν την ικανότητα καταπολέμησης του *B.megaterium* (Lavermicocosa, et al., 1997; Emanuele, et al., 1998; Soler-Rivas, et al., 1999). Τα CLPs που παράγονται από στελέχη τους γένους *Pseudomonas spp.*, έχουν ακόμα μια κατασταλτική ιδιότητα, απέναντι στους ωομύκητες που ανήκουν στα είδη *Pythium spp.* και *Phytophthora spp.*, και η σημαντικότερη επίπτωση είναι η λύση των ζωοσπορίων. Οι επιπτώσεις στα ζωοσπόρια που προκαλούνται από τη δράση των CLPs, είναι καλά μελετημένες για την βισκοσίνη, τη βισκοσιναμίδα, την μασσετολίδη A, τις πουτισολβίνες και την ορφαμίδα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η μασσετολίδη A και η βισκοσιναμίδα επάγουν την εγκύστωση των ζωοσπορίων της *Phytophthora infestans* και του στελέχους P11 του *Pythium spp.*, αντίστοιχα (Thrane, et al., 2000; Van de Mortle, et al., 2009). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μασσετολίδη A, οι πουτισολβίνες και η ορφαμίδα ακινητοποιούν τα ζωοσπόρια από διαφορετικούς ωομύκητες και προκαλούν λύση σε ολόκληρο τον πληθυσμό των ζωοσπορίων (De Souza, et al., 2003a; De Souza, et al., 2003b; Gross, et al., 2007; Tran, et al.; Kruijt, et al., 2009; Van de Mortle, et al., 2009). Οι επιπτώσεις που προκαλούν τα CLPs, μοιάζουν με αυτές που προκαλούν τα ραμνολιπίδια που παράγονται από την *Ps. aeruginosa*, αλλά τα ραμνολιπίδια προκαλούν λύση και ακινητοποιούν τα ζωοσπόρια σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Yoo, et al., 2005). Επιπλέον, τα CLPs έχουν επιπτώσεις και στην μορφολογία και την φυσιολογία των μυκηλίων των μυκήτων. Προσθήκη βισκοσιναμίδης στο θρεπτικό μέσω ανάπτυξη έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διακλάφωση των υφών, τη δημιουργία πολλών σέπτων και το «πρήξιμο»(swelling) των υφών του μύκητα *Pythium spp.* καθώς και μείωση του μεγέθους του πυρήνα, μειωμένη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων



και μειωμένο ενδοκυτταρικό pH (Thrane, et al., 1999). Οι γενετικοί και φυσιολογικοί μηχανισμοί που διέπουν την κυτταρική απόκριση των ωομυκήτων και των μυκήτων παραμένουν κατά κύριο λόγο άγνωστοι μέχρι σήμερα. Έχει υποτεθεί, ότι κάποιες επιπτώσεις προκαλούνται από την αυξημένη εισροή Ca^{2+} και H^+ στα κύτταρα στόχους και εκροή ιόντων K^+ (Thrane, και συν., 1999). Προκειμένου για τις φυτοτοξικές CLPs, όπως είναι κάποιες συριγγομυκίνες, συριγγοπεπτίνες και τολασσίνες από το γένος *Pseudomonas*, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι έχουν την ικανότητα να πολυμερίζονται δημιουργώντας μια τεχνητή μεμβράνη πάνω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτού. Η

μεμβράνη, η οποία δημιουργείται από CLPs, έχει πόρους ενεργητικής διάχυσης ιόντων από και προς το εσωτερικό τους. Οι πόροι αυτοί, οι οποίοι έχουν διαφορετική διάμετρο αναλόγως των πολυμερών που σχηματίζονται, διαθέτουν την ικανότητα να μεταφέρουν ιόντα H^+ και Ca^+ προς το εσωτερικό και ιόντα K^+ προς το εξωτερικό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του pH των φυτικών μεμβρανών και την επαγωγή διαφόρων μοριακών σημάτων του φυτού τα οποία έχουν σαν περιβαλλοντικό ερέθισμα την μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, με τελική συνέπεια την λύση των κυττάρων. Ακόμα, ορισμένες από τις φυτοτοξικές CLPs έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη δράση των φυτικών ΑΤΡασών και φωσφολιπασών (Ramos, 2004).

Για πολλά CLPs, συμπεριλαμβανομένων και των συριγγοπεπτινών από τα φυτοπαθόγωνα στελέχη της *Ps.syringae*, έχει αναφερθεί η ικανότητα παρεμπόδισης της εκβλάστησης σπορίων και κονιδίων των μυκήτων. Η ικανότητα αυτή είναι ακόμα πιο έντονη όταν το στέλεχος που παράγει CLPs παράγει και ένζυμα που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των κονιδίων (ενδοχιτινάσες, γλουκανάσες) (Ramos, 2004). Σε ορισμένα στελέχη του γένους *Bacillus* έχει αποδειχθεί ότι τα CLPs έχουν την ικανότητα να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με διάφορα κατιόντα (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα των στοιχείων αυτών από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς.

Κάτι ανόλογο δεν έχει αναφερθεί ακόμα, για τα στελέχη της *Pseudomonas spp.*. Η ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων είναι ανάλογη της υδροφοβικότητας των αμινοξικών καταλοίπων της πεπτιδικής αλυσίδας των CLPs (Ramos, 2004).

Συnergιστική επίδραση στην καταπολέμηση έχει παρατηρηθεί μεταξύ των CLPs και φεναζινών. Τα CLPs, λόγω μεγάλης τασιενεργής δράσης, συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των υφών του φυτοπαθογόνου μύκητα αραιώνοντας τις υφές, καταστρέφοντας τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών και δημιουργώντας ένα λεπτό φιλμ γύρω από αυτές. Ακόμα πιστεύεται ότι λειτουργούν ως μόρια μεταφορείς των φεναζινών, με αποτέλεσμα τη μεταφορά των αντιβιοτικών στο εσωτερικό του φιλμ αυτού, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση των φεναζινών στα σημεία όπου έχει καταστραφεί η δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη και πιο άμεση επαφή των φεναζινών με το κυτταρόπλασμα του παθογόνου, γεγονός που καθιστά πιο δραστική την καταπολέμηση. Ένας τέτοιος μηχανισμός πιστεύεται ότι χρησιμοποιείται από το στέλεχος *Pseudomonas CMR12a* στην βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων των γενών *Rhizoctonia*, *Pythium* και *Verticillium* (Debode, et al., 2006; D'aes, et al., 2011). Ο ρόλος των λιποπεπτιδίων στην κινητικότητα, στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην επαγωγή της διασυστηματικής ανοχής θα συζητηθεί σε επόμενα κεφάλαια.

1.8.2 Ανταγωνισμός για θρεπτικά και κατάληψη των διαθέσιμων στο ριζικό σύστημα των φυτών θέσεων αποικισμού.- Παραγωγή σιδηροφόρων.

Λόγω του γεγονότος ότι ο σίδηρος δεν είναι διαθέσιμος σε αφομοιώσιμη μορφή στο έδαφος από τους μικροβιακούς πληθυσμούς, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μια συγκεκριμένη στρατηγική για την πρόσληψη του διαθέσιμου σιδήρου. Η στρατηγική αυτή είναι πολύ σημαντική για τα βακτήρια που διαβιούν στο έδαφος, καθώς η συγκέντρωση του σιδήρου (Fe^{3+}) στο έδαφος είναι περίπου $10^{-18}M$. Η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει την βιοσύνθεση και έκκριση μικρού μοριακού βάρους χηλικής ένωσης, η οποία έχει υψηλή συγγένεια δέσμησης για τον Fe^{3+} και ονομάζεται σιδηροφόρο. Η παραγωγή σιδηροφόρων από βακτήρια που αλληλεπιδρούν με φυτικούς οργανισμούς, λαμβάνει μεγάλης προσοχής λόγω του ρόλου που διαδραματίζουν τόσο στην βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών όσο και στο έλεγχο της μολυσματικής ικανότητας των φυτοπαθογόνων (Neilands, et al., 1986; Loper, et al., 1991). Η παραγωγή και η χρήση των σιδηροφόρων θεωρείται ως μια εξελικτική προσαρμογή των βακτηρίων που διαβιούν σε περιβάλλοντα με περιορισμένη διαθεσιμότητα σιδήρου (Ishimaru, et al., 1993).

Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες, οφείλουν το φθορισμό τους σε μια εξωκυτταρική διαχεόμενη χρωστική ουσία που ομονάζεται πυοβερντίνη (PVD-pyoverdine) ή ψευδοβακτίνη (pseudobactin). Η ουσία αυτή έχει υψηλή συγγένεια για τα ιόντα σιδήρου Fe^{3+} (η σταθερά δέσμησης- K_{ass} –για την αλληλεπίδραση αυτή είναι περίπου 10^{24} σε pH 7) και παίζει ρόλο σιδηροφόρου για το στέλεχος που την παράγει (Meyer, et al., 1978). Η σίδηροπυοβερντίνη (ferripyoverdine), που είναι το σύμπλοκο της πυοβερντίνης με το ιόν Fe^{3+} , αλληλεπιδρά με έναν ειδικό υποδοχέα της εξωτερικής μεμβράνης, που υπάρχει στο στέλεχος που την παράγει αλλά είναι δυνατόν να τον διαθέτουν και μη-παραγωγά στελέχη. Στη συνέχεια, ο Fe^{3+} μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και ανάγεται σε Fe^{2+} . (Visca, 2004).

Σε καλά αεριζόμενα, ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη, ο Fe^{3+} , είναι ελάχιστα διαλυτός, και ο συνολικός Fe^{3+} των μικροοργανισμών του εδάφους που είναι διαλυτός αντιπροσωπεύει το

10^{-10} M σε κατάσταση ισορροπίας με τον σίδηρο του εδάφους. Η διαθεσιμότητα των σιδηροφόρων στο έδαφος μειώνεται λογαριθμικά με την αύξηση του pH, και έτσι η καταστολή της ασθένειας λόγω των σιδηροφόρων είναι μεγαλύτερη σε ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. (Simeoni, et al., 1987).

Τα παθογόνα είναι ευαίσθητα στην παρουσία σιδηροφόρων γιατί δεν παράγουν δικά τους σιδηροφόρα ή είναι ανίκανα να χρησιμοποιήσουν σιδηροφόρα που παράγονται από άλλα βακτήρια ή από άλλους οργανισμούς. Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι μερικές φορές έχουν τη δυνατότητα παραγωγής μικρών ποσοτήτων σιδηροφόρων ή ασθενέστερης συγγένειας ως προς τον σίδηρο, σε σχέση με τα σιδηροφόρα των βακτηριών ή ότι τα παραγόμενα από τα παθογόνα σιδηροφόρα μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τους ανταγωνιστές (Weller, 1988). Σε απεμπλουτισμένο από σίδηρο θρεπτικό, στελέχη της *Pseudomonas* spp. που παράγουν πυοβερντίνη αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων που παράγουν λιγότερο ισχυρά σιδηροφόρα (Kloerper, et al., 1980a; Kloerper, et al., 1980b). Σε τρυβλία άγαρ, χαμηλής περιεκτικότητας σε σίδηρο, η εναπόθεση πυοβερντίνης (υπό τη μορφή δίσκου από χαρτί), μπορεί να δημιουργήσει ζώνη αναστολής για έναν ευαίσθητο μικροοργανισμό. Συμπερασματικά, η πυοβερντίνη λειτουργεί ως ένα διαχεόμενο βακτηριοστατικό ή μυκοστατικό μόριο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Kloerper, et al., 1980a; Kloerper, et al., 1980b; Scher, et al., 1982).

Συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas* spp. έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν και ετερόλογα σιδηροφόρα (Bakker, et al., 1988; Jukevitch, et al., 1992; Mirleau, et al., 2000). Η στρατηγική αυτή τους προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου: οικονομία στον μεταβολισμό, αυξημένη ανταγωνιστική δράση στη ριζόσφαιρα, αυξημένες ικανότητες ως προς την καταστολή ασθενειών. Η στρατηγική αυτή συνεπάγεται και την επαγωγή της σύνθεσης ειδικών πρωτεϊνών που είναι ειδικές για το εξωγενή σιδηροφόρο. Για παράδειγμα, το στέλεχος-παράγοντας βιολογικού ελέγχου της *P.putida* στέλεχος WSC358 έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί το δικό του σιδηροφόρο (ψευδοβακτίνη-358) μέσω ενός εξειδικευμένου υποδοχέα της εξωτερικής του μεμβράνης (Bitter, et al., 1991) καθώς επίσης έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί και ετερόλογα σιδηροφόρα μέσω άλλων-επιπρόσθετων υποδοχέων (Koster, et al., 1993). Αντίθετα, η ψευδοβακτίνη-358 μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ένα πολύ περιορισμένο εύρος ψευδομονάδων (Marrug, et al., 1989).

Η προκύπτουσα υπόθεση για το ρόλο των σιδηροφόρων σε βακτήρια-παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης προτείνει ότι τα σιδηροφόρα δρουν στερώντας το σίδηρο από τα παθογόνα (Kloerper, et al., 1980b; Schroth, et al., 1982). Για παράδειγμα, σε συνθήκες θερμοκηπίου, η *Pseudomonas putida* στέλεχος B10 καταστέλλει τον μήκυτα *Fusarium* spp., αλλά η καταστολή παύει όταν προστεθεί στο έδαφος σίδηρος (Kloerper, et al., 1980a). Μια κριτική αξιολόγηση της υπόθεσης για τον ρόλο των σιδηροφόρων, αποκαλύπτει, ότι σε κάποια συστήματα φυτού-παθογόνου, που έχουν ελεγχθεί σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, μεταλλαγμένα στελέχη φθορίζουσων ψευδομονάδων που δεν παράγουν πυοβερντίνη (pvd⁻), προστατεύουν τα φυτά-ξενιστές λιγότερο αποτελεσματικά από τα πατρικά στελέχη. (Keel, et al., 1989; Loper, et al., 1991). Συμπερασματικά, τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι τα σιδηροφόρα τύπου-πυοβερντίνης μπορεί να συμβάλλουν στην καταστολή της ασθένειας σε κάποιες περιπτώσεις, αλλά από μόνα τους δεν είναι ικανά για καταστολή των ασθενειών, καθώς αν ίσχυε κάτι τέτοιο θα ήταν δύσκολο να ερμηνευθεί το γιατί δεν

έχουν οι περισσότερες φθορίζουσες ψευδομονάδες ικανότητα βιολογικού ελέγχου ασθενειών που προκαλούνται από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Haas, et al., 2005). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για τη δράση των σιδηροφόρων στην καταστολή παθογόνων μικροοργανισμών. Οι Lemanceau et al. (Lemanceau, et al., 1992; Lemanceau, et al., 1993) συσχέτισαν την παραγωγή ψευδοβακτίνης-358 από το στέλεχος WCS358 της *Pseudomonas putida* με την καταστολή του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* στο γαρύφαλλο. Τα σιδηροφόρα που παράγονται από στελέχη *Pseudomonas spp.* και συγκεκριμένα από το στέλεχος 7NSK2 της *Pseudomonas aeruginosa* φαίνεται ότι εμπλέκονται και στην καταστολή του *Fusarium spp.* στο ραπανάκι (*Raphanus sativus L.*) (Raaijmakers, et al., 1995a) και των *Pythium spp.* (Buysens, et al., 1996) και *Botrytis cinerea* (Audenaert, et al., 2002) στην τομάτα.

Ένα άλλο σιδηροφόρο των ψευδομονάδων, που έχει αναγνωριστεί ως αντιμυκητιακό αντιβιοτικό είναι η πυοχελίνη(pyochelin) (Phoebe, 2001). Ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί ακόμα αν η στέρση του σιδήρου από τους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην ενεργότητά της. Καθώς η πυοχελίνη είναι σχετικά ασθενής χηλικός παράγοντας για τον Fe^{3+} , αλλά σχετικά ισχυρός χηλικός παράγοντας για τα ιόντα Cu^{2+} και Zn^{2+} (Cuppels, et al., 1987; Visca, 1992), μπορεί να δρα στερώντας από τους παθογόνους μικροοργανισμούς χαλκό ή/και ψευδάργυρο.

1.8.3 Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή-ISR(Induced Systemic Resistance).

Ο μηχανισμός αντοχής των φυτικών οργανισμών ενάντια στις ασθένειες, ο οποίος αναπτύσσεται διασυστηματικά ως αντίδραση στον αποικισμό της ρίζας από μη παθογόνα στελέχη ριζοβακτηρίων (PGPRs), τα οποία έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα φυτά, ονομάζεται επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance- **ISR**). Ο όρος «επαγόμενη διασυστηματική αντοχή» προτάθηκε και καθιερώθηκε από τον Kloepper (Kloepper, et al., 1992), ώστε να διαχωριστεί από την επίκτητη διασυστηματική αντοχή(**Systemic Acquired Resistance-SAR**) που επάγεται από τα παθογόνα. Ο τύπος αυτός της αντοχής έχει δειχθεί αποδειχθεί σε πολλά είδη φυτικών ειδών κάτω από συνθήκες στις οποίες τα ριζοβακτήρια παραμένουν διαχωρισμένα από το παθογόνο περιορίζοντας την ανάπτυξή του. Η ISR εκφράζεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και εξέλιξη της ασθένειας συγκρινόμενη με το μάρτυρα (Van Loon, et al., 1998). Η ISR ανακαλύφθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι το ριζοβακτήριο *Pseudomonas sp.* στέλεχος WSC417r μπορεί να επάγει την ανθεκτικότητα ενάντια στον μύκητα *Fusarium spp.* (Van Peer, et al., 1991)στο γαρύφαλλο και από συγκεκριμένα ριζοβακτήρια ενάντια στο μύκητα *Colletotrichum orbiculare* στο αγγούρι (Wei, et al., 1991). Τα σήματα της ISR είναι κυρίως το ιασμονικό οξύ(jasmonic acid) και το αιθυλένιο (Van Loon, 2007) και τα ριζοβακτηρια που επάγουν την ISR παρουσιάζουν εξειδικευμένη δράση, όπου φανερώνεται η εξειδικευμένη σχέση μεταξύ βακτηρίου και ξενιστή για την ενεργοποίηση του σήματος κατά την ISR.

Διάφορα βακτηριακά συστατικά επάγουν την ISR, όπως είναι η παρουσία λιποπολυσακχαριτών(LPs) στις μεμβράνες τους, τα μαστίγια, το σαλικυλικό οξύ και τα σιδηροφόρα (Van Loon, 2007). Σχετικά πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι και τα CLPs (Ongena, et al., 2007), ο αντιμυκητιακός παράγοντας 2,4-DAPG (Iavicoli, et al., 2003), τα μόρια σινιάλα AHLs (Shuhegge, et al., 2006), και μίγματα πτητικών ουσιών που παράγονται από τον *Bacillus subtilis GB03*, και σε μικρότερο βαθμό οι πτητικές ουσίες 2,3-βουτανεδιόλη και

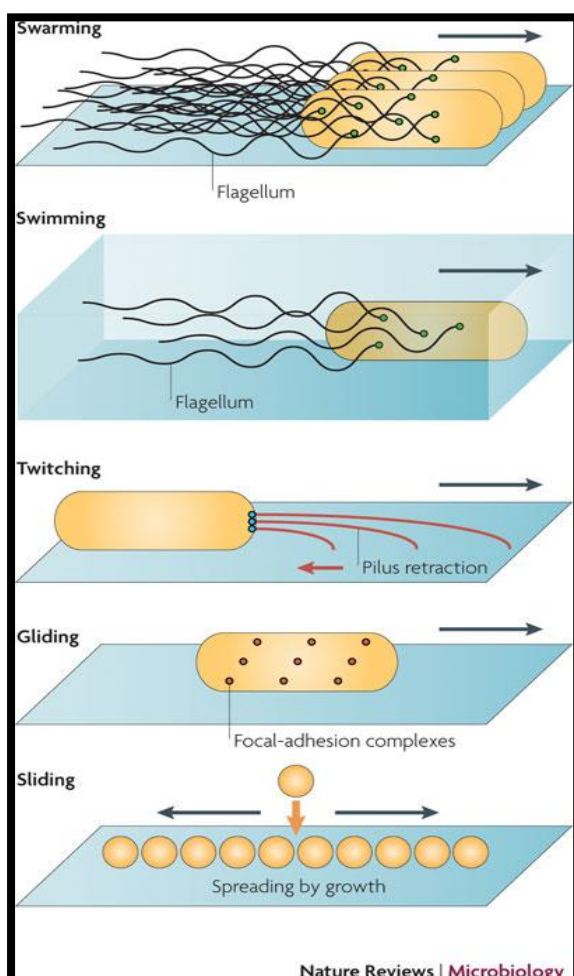
η ακετοΐνη επάγουν την ISR (Ryu, et al., 2003). Στο φασόλι, η επαγωγή της ISR από την *Pseudomonas putida*, συσχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα της εξανάλης (hexanal), η οποία είναι μια πτητική αντιμυκητιακή ένωση και με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεσή της (Ongena, et al., 2004). Σε μελέτη που έγινε με ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος της *P.fluorescens* P3, που υπερπαράγει σαλικυλικό οξύ, φάνηκε ότι τα στέλεχος αυτό παρέχει αυξημένη προστασία στο καπνό ενάντια στον ιό της νέκρωσης του καπνού, σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου, γεγονός που προτείνει την συμμετοχή του σαλικυλικού οξέος στην επαγωγή της ISR (Maurhofer, 1998). Το στέλεχος του βιολογικού παράγοντα *Pseudomonas fluorescens* R15S101, το οποίο έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης μασσετολιδών, επάγει την ISR σε φυτά τομάτας έναντι σαπροφυτικών στελεχών της *Pseudomonas fluorescens*, αλλά επαγωγή της ISR έναντι στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Phytophthora infestans* δεν ήταν εφικτή (Tran, et al., 2007).

Σε αντίθεση με άλλους μηχανισμούς που εμπλέκονται στον βιολογικό έλεγχο των ασθενειών, για την επαγωγή της ISR δεν απαιτείται εκτεταμένος αποικισμός του ριζικού συστήματος του φυτού-ξενιστή, και το γεγονός αυτό αποδείχθηκε ,με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών της *Pseudomonas fluorescens* WSC365 (Dekkers, et al., 2000) με μειωμένη ικανότητα αποικισμού της ριζόσφαιρας. Είναι σχεδόν απίθανο, ένα στέλεχος που δεν είναι καλός αποικιστής της ρίζας να δρά μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών, καθώς το «σύστημα διανομής» των αντιμυκητιακών αυτών ουσιών είναι το ριζικό σύστημα του φυτού-ξενιστή (Chin-A-Woeng, et al., 2000). Ως εκ τούτου οι Rudrappa et al. (Rudrappa, et al., 2008) ανέφεραν ότι η μόλυνση των φύλλων φυταρίων του *Arabidopsis thaliana* με το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Pst DC3000, οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης του L-μηλικού οξέος από τις ρίζες, και τα αυξημένα επίπεδα του L-μηλικού οξέος σηματοδοτεί επιλεκτικά την «στρατολόγηση» του ριζοβακτηρίου *Bacillus subtilis* FB17, το οποίο είναι και το βακτήριο που τελικά προστατεύει το φυτό μέσω της επαγωγής ISR. Οι De Weert et al. είχαν επίσης δείξει ότι το ρβακτήριο-παραγοντας βιολογικού ελέγχου που δρα επίσης μέσω της επαγωγής ISR, επιδεικνύει χημειοτακτική κίνηση ως προς το κυρίαρχο συστατικό του εκκρίματος της ρίζας της τομάτας(κιτρικό οξύ) (De Weert, et al., 2002).

Η επαγωγή της ISR δεν οδηγεί σε εκτεταμένες αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ του φυτού-ξενιστή, αλλά ενεργοποιεί τα γονίδια που είναι εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας (Couillerot, et al., 2009). Οι επιδράσεις τριών διαφορετικών στελεχών *Pseudomonas* spp. που επάγουν την ISR στο *Arabidopsis thaliana* έχουν διερευνηθεί μέσω ανάλυσης του μεταγραφικού προφίλ(transcriptome) των φυτών, των οποίων οι ρίζες έχουν αποικιστεί με ένα από τα στελέχη αυτά (*P.fluorescens* WCS417r, *Pseudomonas thivervalensis*, *P.fluorescens* CHA0). Και στις τρεις περιπτώσεις, τα επίπεδα μεταγραφής στα φύλλα δεν άλλαξαν σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τον μη-εμβολιασμένο μάρτυρα, και οι συστηματικές αποκρίσεις, που παρατηρούνται τυπικά μετά από προσβολή από νεκρωτικά παθογόνα, δεν παρατηρούνται κατά την ISR (Verhagen, 2003; Cartileaux, 2003). Σε μια μελέτη (Verhagen, 2003), παρατηρήθηκαν ουσιαστικές αλλαγές στο επίπεδο της έκφρασης διάφορων γονιδίων στη ρίζα, ωστόσο παραμένει ασαφής ο μηχανισμός μέσω του οποίου αντιδρούν οι φυτικοί οργανισμοί στα βακτήρια που επάγουν την ISR. Γενικεύσεις σχετικά με τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος που εμπλέκονται στην επαγωγή της ISR, δεν μπορούν να γίνουν καθώς η επαγωγή της ISR εξαρτάται τόσο από το φυτικό είδος όσο και από την ποικιλία (Van Loon, et al., 2003).

1.9 Η κινητικότητα των βακτηρίων. Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας.

Τα βακτήρια αποικούν επιφάνειες σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα. Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, τα βακτήρια μπορούν να παραμείνουν στην επιφάνεια, να κινηθούν ώστε να αποικίσουν μεγαλύτερες επιφάνειες, να εισβάλλουν σε ιστούς ξενιστών ή να σχηματίσουν ενδοσπόρια και να περιμένουν πιο ευνοϊκές συνθήκες. Ως ένα σύνολο, τα βακτήρια που σχηματίζουν αποικίες πάνω σε επιφάνειες, έχουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ελεύθερα διαβιούντα κύτταρα καθώς μπορούν να βελτιστοποιήσουν: την αύξησή τους και την επιβίωσή τους έχοντας ξεχωριστούς-διακριτούς τύπους-κυττάρων για να εκτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες, την πρόσβασή τους στα διαθέσιμα θρεπτικά, τους αμυντικούς μηχανισμούς των βακτηριακών κυττάρων για την προστασία τόσο από τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες όσο και από τον ανταγωνισμό. Τα βακτήρια αλληλεπιδρούν δυναμικά με την επιφάνεια για να εντοπίσουν περιβαλλοντικά σιγάλα καθώς και για να εντοπίσουν την παρουσία άλλων βακτηρίων (Fuqua, et al., 2001). Πριν από 40 περίπου χρόνια, ο J.Henrichsen (Henrichsen, 1972), μελέτησε την επιφανειακή κινητικότητα εκατοντάδων στελεχών από 40 βακτηριακά είδη που ανήκουν σε 18 διαφορετικά γένη, και εντόπισε έξι διαφορετικές κατηγορίες κινητικότητας: την **swarming(ομαδική)**, την **swimming(κολυμβητική)**, την **gliding**, την



Εικόνα 7: κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας (Kearns, 2010)

twitching, την **sliding** και την **darting** κινητικότητα. Μόνο η κολυμβητική κινητικότητα και η ομαδική κινητικότητα εξαρτώνται από την ύπαρξη μαστιγίων (Harsey, 1994a; Macnab, 1996), η twitching κινητικότητα απαιτεί την παρουσία ινιδίων τύπου IV, όπως και κάποιες μορφές gliding κινητικότητας (Mattick, 2002), ενώ για κάποιες άλλες μορφές gliding κινητικότητας ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος (McBride, 2001), ενώ η sliding κινητικότητα είναι μια μορφή παθητικής επιφανειακής εξάπλωσης (Martinez, et al., 1999). Τέλος, για την darting κινητικότητα δεν είναι σχεδόν τίποτα γνωστό. Η **κολυμβητική κινητικότητα** σε υγρό θρεπτικό μέσο έχει μελετηθεί σε μεγάλη λεπτομέρεια στην *E.coli* και στην *Salmonella typhimurium* τα τελευταία 30 χρόνια (Macnab, 1996). Τυπικά, τα 5-8 περίτριχα μαστίγια τυχαία εκφυόμενα από την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου κινούνται με τη βοήθεια μιας περιστροφικής συσκευής που υπάρχει στη βάση του κάθε μαστιγίου, η οποία

χρησιμοποιεί ως κινητήριο δύναμη τη διαμεμβρανική διαφορά της συγκέντρωσης των πρωτονίων. Η κολυμβητική κινητικότητα, αφορά στην κίνηση μεμονωμένων κυττάρων σε υγρά ενδαιτήματα. Η **gliding** κινητικότητα, ορίζεται ως μια ομαλή ενεργητική κίνηση των κυττάρων κατά μήκος του μεγάλου άξονα του βακτηριακού κυττάρου (Henrichsen, 1972) και έχει παρατηρηθεί σε 3 μεγάλες κατηγορίες βακτηρίων: στα μυξοβακτήρια (myxobacteria), στα κυανοβακτήρια και στην ομάδα *Cytophaga-Flavonobacterium* (McBride, 2001). Πολλά μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την gliding κινητικότητα, συμπεριλαμβανομένων της ώθησης, έσω μεταφοράς μακρομορίων όπως είναι οι πολυσακχαρίτες, της κίνησης συστατικών της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης από πρωτεϊνικά σύμπλοκα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, καθώς και η συστολή ινιδίων στα κυτταρικά τοιχώματα. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα σαφή στοιχεία που να υποστηρίζουν κάποιο από αυτά τα μοντέλα, και είναι πιθανό ότι αρκετοί διαφορετικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την gliding κινητικότητα (Harsey, 2003). Η gliding κινητικότητα φαίνεται ότι έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους μηχανισμούς επιφανειακής κινητικότητας (Mignot, 2007). Η **twitching** κινητικότητα αρχικά προσδιορίστηκε ως μια διακοπτόμενη και σπασμωδική κίνηση την οποία παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο μεμονωμένα κύτταρα (Henrichsen, 1972). Αυτός ο τρόπος κινητικότητας υιοθετείται από ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων (Henrichsen, 1972; Mattick, 2002; Wall, et al., 1999), απαιτεί υγρή επιφάνεια και επιτρέπει στα κύτταρα να κινηθούν τόσο προς τα μπροστά όσο και προς τα πίσω με ταχύτητες κάποιων δεκάτων του $\mu\text{m}/\text{sec}$. Οι Henrichsen και Bloom (Henrichsen, et al., 1975), πρότειναν την πιθανή ανάμειξη των πολικών ινιδίων στην twitching κινητικότητα. Με βάση της παρατηρήσεις που έγιναν μετά από μόλυνση με βακτηριοφάγο στην *Pseudomonas aeruginosa*, ο Barley (Barley, 1980), πρότεινε ότι η συστολή των πολικών ινιδίων ήταν η κινητήριο δύναμη της twitching κινητικότητας. Σήμερα, είναι πλέον ξεκάθαρο, ότι η έκταση και η συστολή των ινιδίων τύπου IV είναι υπεύθυνες για την twitching κινητικότητα (Merz, et al., 2000; Skerker, et al., 2001; Sun, et al., 2000). Η **sliding** κινητικότητα είναι αποτέλεσμα των εκτατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται σε μια αναπτυσσόμενη αποικία σε συνδυασμό με την μειωμένη επιφανειακή τάση και έχει παρατηρηθεί σε πολλά βακτήρια (Henrichsen, 1972). Η sliding κινητικότητα είναι μια μορφή παθητικής επιφανειακής εξάπλωσης και υπάρχει ισχυρή συσχέτιση αυτού του τύπου επιφανειακής κινητικότητας με την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών όπως είναι τα λιποπεπτίδια, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα ραμνολιπίδια (Brown, et al., 2001; Recht, et al., 2000). Αν και παθητική μορφή εξάπλωσης, παίζει σημαντικό ρόλο στον αποκισμό επιφανειών από βακτήρια (Recht, et al., 2001).

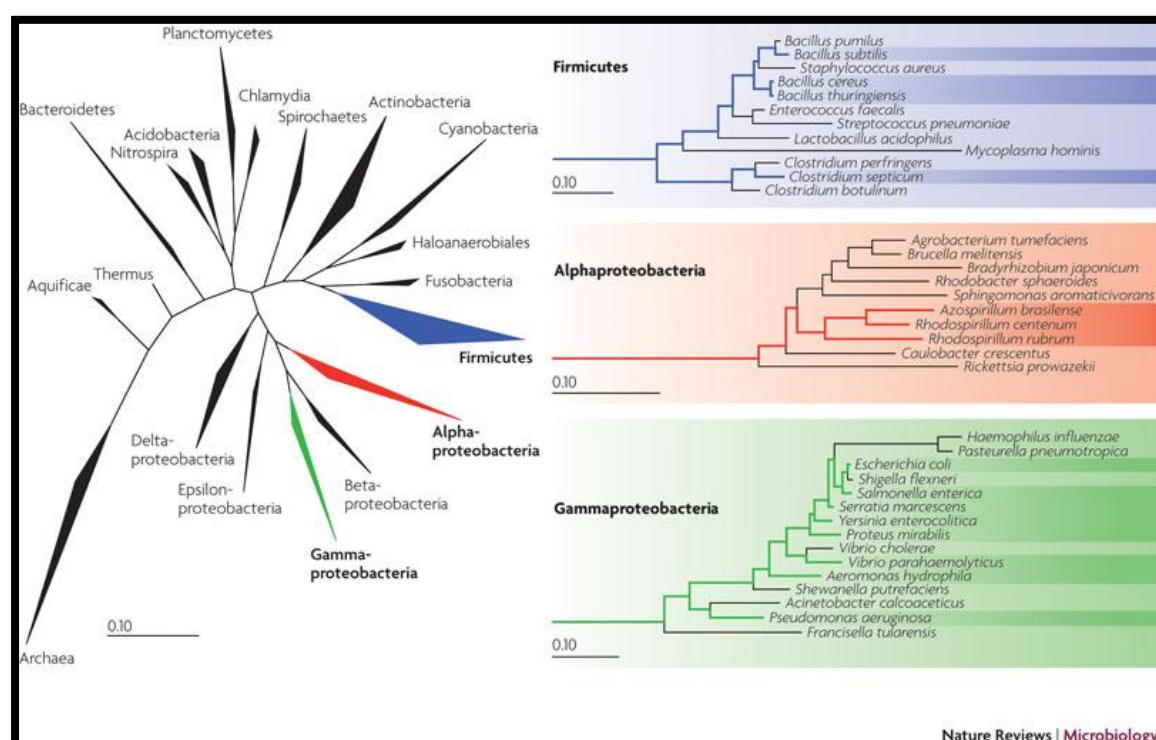
1.9.1 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων σε επιφάνειες.

Ως ομαδική κινητικότητα περιγράφηκε με λειτουργικό τρόπο η ταυτόχρονη, γρήγορη μετακίνηση ομάδων βακτηριακών κυττάρων πάνω σε επιφάνειες, η οποία τροφοδοτείται από την περιστροφική κίνηση των μαστιγίων (Henrichsen, 1972). Ο ορισμός αυτός, αν και είναι απλός, ακριβής και μηχανιστικά ορθός, δεν δικαιολογεί τη μεγάλη ποικιλία των φαινοτύπων που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα, ούτε δίνει έμφαση σε όλα εκείνα τα στοιχεία που παραμένουν άγνωστα μέχρι σήμερα και σχετίζονται με αυτή τη συμπεριφορά (Kearns, 2010). Ο Hauser περιέγραψε πρώτος την ομαδική κινητικότητα, στο γένος *Proteus* το 1885, και από τότε έχει αποδειχθεί ότι είναι αρκετά διαδεδομένη μεταξύ των βακτηρίων που φέρουν μαστίγια, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο τρόπος αυτός

κινητικότητας παίζει καθοριστικό ρόλο στον αποικισμό του φυσικού (Berg, et al., 1979) περιβάλλοντος από τους μικροοργανισμούς. Η ικανότητα ομαδικής κινητικότητας φαίνεται ότι είναι αυστηρά συντηρημένη μεταξύ των βακτηριών και τώρα περιορίζεται σε 3 φύλα. Ο αριθμός των ειδών με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας είναι υποεκτιμημένος, καθώς η ομαδική κινητικότητα αναστέλλεται από τα κοινά εργαστηριακά μέσα καθώς επίσης σε στελέχη που καλλιεργούνται εργαστηριακά (Kearns, et al., 2003; Patrick, et al., 2009; Ghelardi, et al., 2007; Kim, et al., 2005), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα στο εργαστηριακό περιβάλλον (Velicer, et al., 1998).

1.9.1.1 Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών στην ομαδική κινητικότητα

Η ομαδική κινητικότητα, γενικά, απαιτεί ένα ενεργειακά πλούσιο, στερεό θρεπτικό μέσο, αλλά και συγκεκριμένες-ειδικές συνθήκες, που υποστηρίζουν την ομαδική κινητικότητα και εξαρτώνται από τον οργανισμό που μελετάται.



Εικόνα 8: φυλογενετικό δένδρο, βασισμένο στο γονίδιο 16S rRNA. Τα βακτηριακά είδη των οποίων το όνομα είναι πιο έντονα χρωματισμένο, έχουν την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, ενώ στα υπόλοιπα δεν έχει παρατηρηθεί προς το παρών ικανότητα ομαδικής κινητικότητας (Kearns, 2010).

Κάποια βακτήρια όπως ο *Bacillus subtilis*, παρουσιάζει έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε ένα ευρύ φάσμα πλούσιων σε ενέργεια θρεπτικών μέσων, ενώ άλλα βακτήρια όπως η *Salmonella enterica* και η *Yersinia enterocolitica*, απαιτούν παρουσία ιδιαίτερων συμπληρωμάτων όπως η γλυκόζη (Julkowska, et al., 2005; Young, et al., 1999; Harsey, et al., 1994). Σε πολλά βακτήρια, δεν παρατηρείται ομαδική κινητικότητα σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα, γεγονός που πιθανά αντανακλά στο υψηλό μεταβολικό κόστος της σύνθεσης αυξημένου αριθμού μαστιγίων. Επίσης, κάποια βακτήρια, όπως το *Vibrio parahaemolyticus*, επιδεικνύει ομαδική κινητικότητα ακόμα και σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα (McCarter, 1999).

1.9.1.2 Ο ρόλος της υγρασίας και της ρευστότητας του θρεπτικού στην ομαδική κινητικότητα.

Η κινητικότητα των βακτηρίων σε επιφάνειες σε εργαστηριακές συνθήκες εξαρτάται από τη ρευστότητα του θρεπτικού μέσου, δηλαδή από την ποσότητα του άγαρ που έχει χρησιμοποιηθεί για την στερεοποίηση του θρεπτικού, εξαιτίας κυρίως ενός συγκεκριμένου επιπέδου υγρασίας που είναι απαραίτητο για την ομαδική κινητικότητα. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές για την ομαδική κινητικότητα στα είδη *Serratia* (Alberti, et al., 1990; Eberl, et al., 1996), *Escherichia*, *Salmonella* (Harsey, et al., 1994), *Aeromonas* (Harsey, 1994a), *Bacillus* (Harsey, 1994a; Senesi, et al., 2002), *Yersinia* (Harsey, 1994a; Young, et al., 1999) και *Pseudomonas* (Kohler, et al., 2000). Τα βακτήρια αυτά επιδεικνύουν βέλτιστη ομαδική κινητικότητα σε άγαρ συγκέντρωσης μεταξύ 0,5-0,7% και γενικά δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα σε συγκεντρώσεις άγαρ μεγαλύτερες του 1%. Η ιδιάζουσα συμπεριφορά του στελέχους *E.coli* K-12, που απαιτεί άγαρ συγκεκριμένης εμπορικής προέλευσης (Eiken) για την επίδειξη του φαινοτύπου της ομαδικής κινητικότητας (Harsey, et al., 1994), πιθανότα οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα συγκράτησης της υγρασίας από το άγαρ αυτό (Togushi, et al., 2000). Αυτό προκύπτει από την συμπεριφορά των μεταλλαγμάτων της *S.marcescens* που έχουν χάσει την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας λόγω ελαττωματικής παραγωγής μιας επιφανειοδραστικής ουσίας της σεραβετίνης (serrawettin), καθώς και μεταλλαγμάτων της *S.typhimurium* ελαττωματικών ως προς τη σύνθεση λιποπολυσακχαριτών, τα οποία δεν επιδεικνύουν φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε κανονικό άγαρ, αλλά ο φαινότυπος αυτός επανέρχεται όταν τα στελέχη αυτά αναπτυχθούν σε άγαρ τύπου *Eiken* (Matsuyama, et al., 1995; Togushi, et al., 2000). Η τελευταία παρατήρηση, είναι σε συμφωνία με την απουσία της λιποπολυσακχαριτικής στιβάδας του O-αντιγόνου στα στελέχη K-12 της *E.coli*, καθώς και με την ικανότητα της *E.coli* με ανεπηρέαστα O-αντιγόνα να κινείται ομαδικά και σε κανονικό άγαρ εκτός από το άγαρ τύπου *Eiken* (Harsey, et al., 1994). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε μεταλλαγμένα στελέχη του *B.subtilis*, που δεν παράγουν την επιφανειοδραστική ουσία σουρφακτίνη (Mireles, et al., 2001). Η εξωγενής προσθήκη σουρφακτίνης στο θρεπτικό μέσο αποκαθιστά την ικανότητα της ομαδικής κινητικότητας όχι μόνο στον *B.subtilis* αλλά και σε μεταλλαγμένα στελέχη της *S.typhimurium* ελαττωματικών ως προς τη σύνθεση λιποπολυσακχαριτών, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι λιποπολυσακχαρίτες δρουν ως επιφανειοδραστικές ουσίες (Togushi, et al., 2000). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως η σουρφακτίνη και η σεραβετίνη, είναι εξωλιπίδια τα οποία μειώνουν την επιφανειακή τάση και βελτιώνουν τις αλληλεπιδράσεις των μορίων του νερού με τις στερεές επιφάνειες (surface wettability), επιτρέποντας την εξάπλωση των υγρών σε υδρόφοβες επιφάνειες (Matsuyama, et al., 1992; 1986). Αυτά και άλλα εξωλιπίδια, προωθούν την ομαδική κινητικότητα (Eberl, et al., 1999; Kohler, et al., 2000; Mireles, et al., 2001), και επιτρέπουν στα κύτταρα να εξαπλωθούν απουσία ενεργού κινητικότητας (Matsuyama, et al., 1995; 1992) και πιθανόν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μικροβιακό αποικισμό υδρόφοβων επιφανειών. Κάποια είδη όπως το *Proteus* (Henrichsen, 1972; Rauprich, et al., 1996), το *Vibrio* (McCarter, 1999), το *Rhodospirillum* (Ragatz, et al., 1995) και το *Azospirillum* (Alexander, et al., 1999; Henrichsen, 1972), μπορούν να επιδείξουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και σε άγαρ υψηλότερων συγκεντρώσεων (1,5%-2%). Αυτά τα βακτήρια πιθανότατα εκκρίνουν ειδικές μορφές επιφανειοδραστικών πολυσακχαριτών για να παγιδεύσουν αποτελεσματικά την υγρασία, στις επιφάνειες αυτές που χαρακτηρίζονται

από χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας. Αν και κάποια βακτήρια επιδεικνύουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας σε οποιαδήποτε σχεδόν επιφάνεια άγαρ, τα περισσότερα απαιτούν συγκεντρώσεις άγαρ εντός ενός στενού πεδίου. Θρεπτικά μέσα που στερεοποιούνται με άγαρ συγκέντρωσης 0,3% ή μεγαλύτερης, αποκλείουν την κολυμβητική κίνηση και ωθούν τα βακτήρια να κινηθούν πάνω στην επιφάνεια, ενώ συγκεντρώσεις άγαρ μεγαλύτερες του 1% αναστέλλουν την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας πολλών βακτηριακών στελεχών. Είναι αρκετά πιθανό, η ευρέως χρησιμοποιούμενη για τη στερεοποίηση των θρεπτικών μέσων συγκέντρωση άγαρ-1,5%- να είχε αρχικά επιλεγεί για την αναστολή της ομαδικής κινητικότητας (Kearns, 2010). Μεμονωμένα κύτταρα με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, γενικά, δεν κινούνται αν η συγκέντρωση του άγαρ δεν είναι χαμηλή ή αν στο άγαρ δεν έχει προστεθεί κάποια επιφανειοδραστική ουσία. Ο συνασπισμός των κυττάρων, σε μια ομάδα, διευκολύνει την κίνηση, αυξάνοντας την συγκράτηση της υγρασίας (Matsuyama, et al., 2001). Αν προστεθεί μια σταγόνα υγρού στην επιφάνεια μιας swarming αποικίας, τα βακτήρια θα διασκορπιστούν αμέσως και μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να επιδείξουν ικανότητα αποτελεσματικής κολυμβητικής κινητικότητας. Η ικανότητα ομαδικής κινητικότητας μπορεί να ειπωθεί και ως μια εξειδικευμένη περίπτωση κολυμβητικής κινητικότητας πάνω σε επιφάνειες. Τα κύτταρα με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, συνήθως κινούνται προς μια κατεύθυνση και αντιστροφή της κατεύθυνσης αυτής συμβαίνει μόνο μετά από «σύγκρουση» με άλλη ομάδα κυττάρων ή λόγω της ύπαρξης κάποιου φραγμού. Ο ρυθμός του αποικισμού των επιφανειών μέσω της ομαδικής κινητικότητας είναι ισοδύναμος ή συχνά υπερβαίνει τον ρυθμό με τον οποίο τα «κολυμβητικά» κύτταρα του ίδιου είδους αποικούν το άγαρ συγκέντρωσης 0,2%-0,35%(swimming άγαρ). Η πιο ενεργή ομαδική κινητικότητα παρατηρείται κόντα στην περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας, όπου εκεί εντοπίζονται τα πιο επιμήκη και τα φέροντα περισσότερα μαστίγια κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό της αποικίας, είναι λιγότερο κινητά και φαίνεται να αποδιαφοροποιούνται σε πλαγκτονικά κύτταρα. Βακτήρια με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις άγαρ(1%-2%), παρουσιάζουν πιο εντυπωσιακή μορφολογία, που συνίσταται σε πιο επιμήκη κύτταρα που φέρουν αυξημένο αριθμό μαστιγίων. Συχνά, εμφανίζονται σχεδίες (rafts) σε διάφορα σημεία κατά μήκος του αναπτυσσόμενου άκρου της αποικίας, οι οποίες μπορούν να ελιχθούν και να συγχωνευτούν με άλλους σχηματισμούς οδηγώντας στη δημιουργία ενός δικτύου μέσα στο οποίο τα κύτταρα κινούνται σε δύο κατευθύνσεις (Harsey, 2003).

1.9.1.3 Ο ρόλος της θερμοκρασίας και της αλατότητας στην ομαδική κινητικότητα.

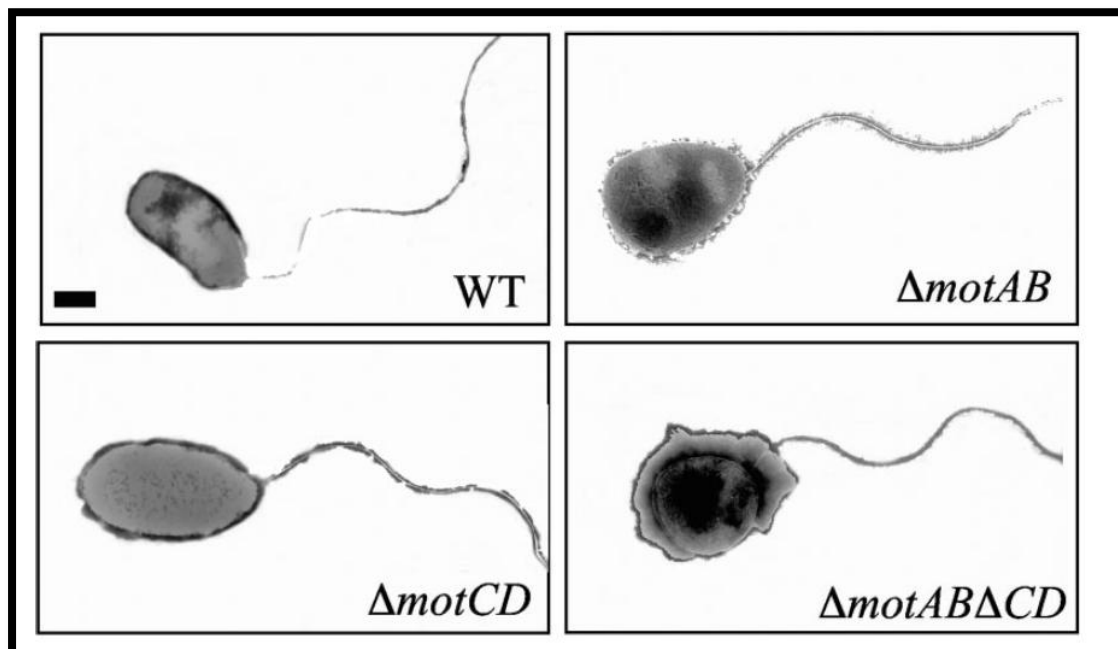
Η εξάπλωση των περισσότερων βακτηρίων σε επιφάνειες εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης και τη συγκέντρωση αλάτων στο θρεπτικό μέσο. Για παράδειγμα η ομαδική κινητικότητα στο *R. leguminosarum* παρουσιάζει το βέλτιστο εξάπλωσης σε θερμοκρασία επώασης στους 22°C και σχεδόν μηδενίζεται/παρεμποδίζεται στους 30°C (Matilla, et al., 2007). Στην *Serratia marcescens*, η κολυμβητική, η ομαδική και η sliding κινητικότητα αναστέλλονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τους 32°C (Alberti, et al., 1990; Matsuyama, et al., 1995; 1989). Αύξηση της εξάπλωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε επίσης στο *S. marcescens* (Lai, et al., 2005) και στην *Pseudomonas putida* KT2440 (Matilla, et al., 2007). Αντίθετα, ο *Bacillus subtilis* στέλεχος 3610, επέδειξε μέγιστη 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 Βαϊκάλη (Soutourina, et al., 2001). Αντίθετα, η προσθήκη NaCl ή KCl στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του *Protorhabdus temperate* επέδρασε θετικά στην εξάπλωσή του (Michaels, et al., 2011).

1.10.1 Προϋποθέσεις που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα: η ύπαρξη μαστιγίων.

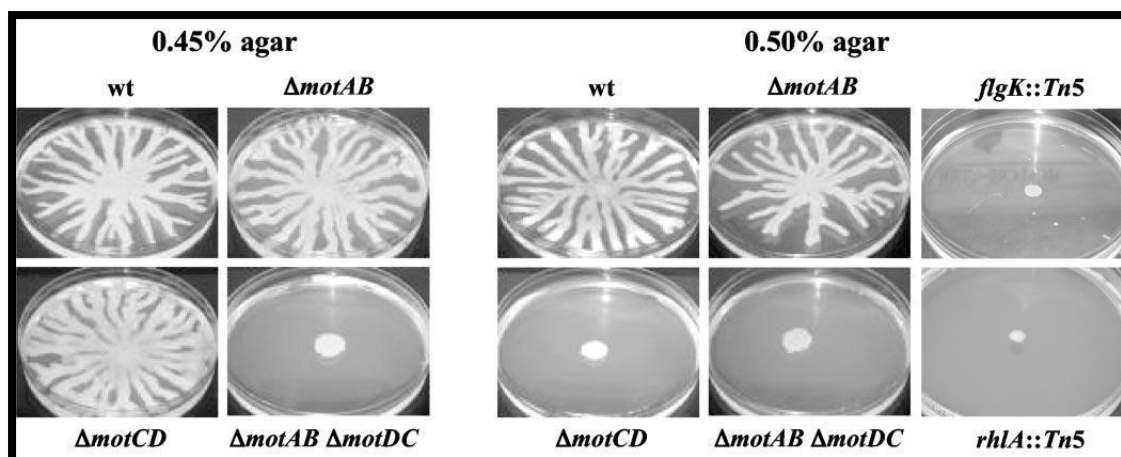
Η ύπαρξη λειτουργικών μαστιγίων είναι βασική προϋπόθεση για την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων, η οποία απαιτεί επίσης και αύξηση της βιοσύνθεσης των μαστιγίων, αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών (Kearns, 2010). Τα βακτηριακά μαστίγια αποτελούνται από το βασικό σωματίο, το άγκιστρο και το νημάτιο. Το βασικό σωματίο, βρίσκεται βυθισμένο στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρικό τοίχωμα, και απαρτίζεται από 15 ή περισσότερες πρωτεΐνες που σχηματίζουν μια πολύπλοκη δομή ενός βασικού άξονα που περιβάλλεται από δακτυλίδια. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια οι δακτύλιοι είναι δυο ενώ στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια οι δακτύλιοι είναι τέσσερις. Το άγκιστρο, που βρίσκεται εξωκυττάρια, είναι μια απλή δομή και αποτελείται από μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 42kDa. Η ευλυγισία αυτής της δομής επιτρέπει τη μεταβίβαση της περιστροφικής κίνησης από το βασικό σωματίο στο νημάτιο. Το νημάτιο που είναι κεκλιμένη προέκταση του άγκιστρου στον εξωκυττάριο χώρο, αποτελείται από την πρωτεΐνη φλαγγελίνη, που σχηματίζει μια άκαμπτη ελικοειδή αλυσίδα, με διάμετρο 15-30nm και μήκος 2,0-2,5μm ανά στροφή έλικας γύρω από έναν κοίλο πυρήνα. Η πηγή ενέργειας για την περιστροφή του βασικού σωματίου είναι η δύναμη από την κίνηση των πρωτονίων διαμέσου της βακτηριακής πλασματικής μεμβράνης (Μαργαρίτης, και συν., 2004). Τα μαστίγια μπορούν να παρατηρηθούν είτε με μικροσκόπια αντίθεσης φάσης χρησιμοποιώντας μια απλή χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (Mayfield, et al., 1977), είτε με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από χρώση των μαστιγίων με φθορίζουσες ουσίες (Turner, et al., 2000; Copeland, et al., 2010) είτε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hoeniger, 1965; Jones, et al., 2004). Η παρουσία κυττάρων που φέρουν μαστίγια, στο μπροστινό μέρος της αναπτυσσόμενης αποικίας συνάδει με τον μηχανισμό της ομαδικής κινητικότητας αλλά δεν αποτελεί από μόνη της ικανή συνθήκη. Για να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός της ομαδικής κινητικότητας, μεταλλαγές που προκαλούν ελαττώματα στη βιοσύνθεση ή στη λειτουργικότητα των μαστιγίων θα πρέπει να αναστέλλουν την εξάπλωση της αποικίας (Chevance, et al., 2008). Τα περισσότερα βακτήρια, με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας έχουν περίτριχη διάταξη μαστιγίων, όπου τα μαστίγια προβάλλουν σε όλες τις κατευθύνσεις και κατανέμονται τυχαία στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου (Kearns, et al., 2003; Harsey, et al., 1994; Hoeniger, 1965; Shinoda, et al., 1977; Alberti, et al., 1990; Merino, et al., 2006). Το *Vibrio parahaemolyticus*, το *Rhodospirillum centenum* και η *Aeromonas*, φέρουν ένα πολικό μαστίγιο, που αρκεί για την κολυμβητική κινητικότητα, αλλά πρέπει να βιοσυνθέσουν περίτριχα μαστίγια για να επιδείξουν ομαδική κινητικότητα (Shinoda, et al., 1977; Merino, et al., 2006; Ragatz, et al., 1995; Gavin, et al., 2002). Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των πολικών και των περίτριχων μαστιγίων κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα μαστίγια αυτά κινούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς κίνησης (μοτέρ) και υπόκεινται σε διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Gavin, et al., 2002; Kim, et al., 2000; Kirov, et al., 2002; McCarter, et al., 1993; Merino, et

al., 2006). Για παράδειγμα, η *Pseudomonas aeruginosa*, κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας διατηρεί το πολικό της μαστίγιο αλλά φέρει και άλλα δύο συστήματα περιστροφής που είναι απαραίτητα για την ώθηση της κίνησης πάνω σε επιφάνειες αλλά και στο ενδιάμεσο παχύρρευστων ενδοκυτταρίων (Doyle, et al., 2004; Toutain, et al., 2005). Έτσι, η έκφραση εναλλακτικών μηχανισμών περιστροφής είναι ένας ακόμα τρόπος που διευκολύνει την ομαδική κινητικότητα, εκτός από την ύπαρξη περίτριχων μαστιγίων.



Εικόνα 9: απεικόνιση του στελέχους αγρίου τύπου της *Pseudomonas aeruginosa* και των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta motAB$, $\Delta motCD$, $\Delta motAB\Delta CD$. Τα μεταλλάγματα $\Delta motAB$, $\Delta motCD$, $\Delta motAB\Delta CD$ φέρουν μεταλλαγές στο σύστημα περιστροφής AB, CD ή και στα 2 συστήματα αντίστοιχα, και φαίνεται ότι διατηρούν το πολικό τους μαστίγιο (Toutain, et al., 2005).

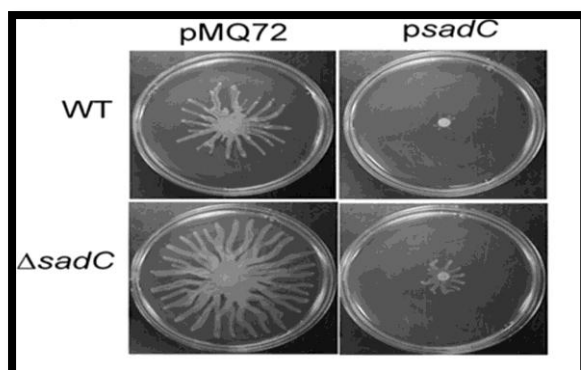
Όταν τα κύτταρα μεταβαίνουν από την κολυμβητική στην ομαδική κινητικότητα, ο αριθμός των μαστιγίων ως προς την επιφάνεια των κυττάρων αυξάνεται. Τα βακτήρια που έχουν την δυνατότητα εναλλακτικών συστημάτων μαστιγίων, κατά τη μετάβαση τους από την κολυμβητική στην ομαδική κινητικότητα βιοσυνθέτουν πολλαπλά περίτριχα μαστίγια. Ακόμα και τα βακτηριακά στελέχη που διαθέτουν μόνο ένα σύστημα μαστιγίων, φαίνεται ότι βιοσυνθέτουν επιπλέον μαστίγια, και έτσι και σε αυτά αθξάνεται ο αριθμός των μαστιγίων που εκφύονται από την βακτηριακή επιφάνεια κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας (Alberti, et al., 1990; Eberl, et al., 1999; Furness, et al., 1997; Harsey, et al., 1994; Hoeniger, 1965; Lai, et al., 1998; Matsuyama, et al., 1992; Senesi, et al., 2002). Στελέχη της *P.aeruginosa* που «κολυμπούν» με ένα πολικό μαστίγιο, μπορεί να παράγουν δύο πολικά μαστίγια κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας σε επιφάνειες. Έτσι, μεταλλαγές που μειώνουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των μαστιγίων, μειώνουν τον αριθμό ή τη λειτουργικότητα των μαστιγίων με αποτέλεσμα να καταργείται ή να ελαττώνεται η ομαδική κινητικότητα, ενώ αντίθετα μεταλλαγές που επάγουν τη βιοσύνθεση των μαστιγίων, ενισχύουν την ομαδική κινητικότητα (Kearns, 2010).



Εικόνα 10: (αριστερά) Ομαδική κινητικότητα του στελέχους της *Pseudomonas aeruginosa* αγρίου τύπου, των μεταλλαγμάτων Δ motAB, Δ motCD και του διπλού μεταλλάγματος Δ motAB Δ CD σε τρυβλίο με άγαρ συγκέντρωσης 0,45%. (δεξιά) ο φαινότυπος της ομαδικής κινητικότητας στα ίδια στελέχη και του μεταλλάγματος *flgK*, που δεν φέρει μαστίγια και του στελέχους *rhIA*, που δεν παράγει ραμνολιπίδια σε τρυβλίο με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% (Toutain, et al., 2005).

Σε μελέτες που έγιναν σε μεταλλαγμένα (μέσω ένθεσης τρανσποζονίου) στελέχη της *P. fluorescens Pf0-1* που ήταν αναποτελεσματικά ως προς τον αποικισμό, την εξάπλωσή και την παραμονή τους στο έδαφος (Marshall, 2001), στο σχηματισμό βιοφίλμ και ως προς την κινητικότητα (Casaz, 2001), αποδείχθηκε ότι η μεταλλαγή του *adnA* γονιδίου, που οδηγεί στην έλλειψη μαστιγίων επιφέρει τις επιπτώσεις που αναφέρθηκαν. Το γονίδιο *adnA* είναι ομόλογο με το *fleQ* γονίδιο της *Pseudomonas aeruginosa* PAb1 (Casaz, 2001), το οποίο είναι ο κυρίαρχος μεταγραφικός ρυθμιστής στην βιογένεση των μαστιγίων στην *P. aeruginosa* (Dasgupta, 2003; Arora, et al., 1997).

Σε μια πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιώντας ανάλυση μικροσυστοιχιών, συγκρίθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων της *P. aeruginosa* PF0-1 (*adnA*⁺) και της *P. fluorescens* Pf0-2x (έλλειψη του γονιδίου *adnA*) και βρέθηκε ότι η έκφραση 103 κωδικών αλληλουχιών επηρεάζεται απουσία του προϊόντος του γονιδίου *adnA* (92 κωδικές αλληλουχίες εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης-11 κωδικές αλληλουχίες εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης). Από τις 92 κωδικές αλληλουχίες εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, οι 48 κωδικοποιούν για ορθόλογες πρωτεΐνες που εμπλέκονται είτε στη βιοσύνθεση των μαστιγίων, είτε στον χημειοτακτισμό σε διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas*, ενώ οι υπόλοιπες 44 κωδικοποιούν για ορθόλογες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες, είναι πιθανοί ρυθμιστές, πιθανές λιποπρωτεΐνες, πιθανές heat-shock πρωτεΐνες. Στη μελέτη αυτή ταυτοποιήθηκαν 2 νέα γονίδια το προϊόν των οποίων έχει ενεργότητα γλυκοζυλοτρανσφεράσης των μαστιγίων (PF01_1508 και PF01_1508), (Mastroaio, et al., 2012). Ορθόλογα προϊόντα με αυτά των γονιδίων PF01_1508 και PF01_1508, έχουν βρεθεί στην *P. syringae* και στην *P. aeruginosa* και επηρεάζουν τη μολυσματικότητα, την κινητικότητα και τον σχηματισμό βιοφίλμ στην *P. syringae* (Tagushi, 2008; 2006; Takeuchi, 2003) και την μολυσματικότητα στην *P. aeruginosa* (Arora, et al., 2005). Η *P. syringae* διαθέτει δύο μαστιγιακές γλυκοζυλοτρανσφεράσες, *FgTA1* και *FgTA2*, και η έλλειψη οποιουδήποτε από τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις γλυκοζυλο-τρανσφεράσες αυτές επηρεάζει την ομαδική κινητικότητα του στελέχους αυτού (Tagushi, 2006).



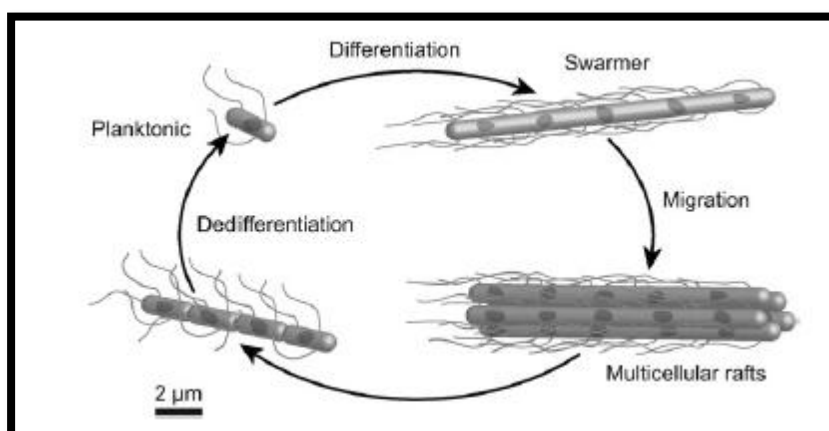
Εικόνα 11: το μεταλλαγμένο στέλεχος της *P.aeruginosa* PA14 $\Delta sadC$ παρουσιάζει hyperswarming φαινότυπο σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Το πλασμίδιο pMQ72 είναι πλασμίδιο μάρτυρας, ενώ το πλασμίδιο psadC, φέρει πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου sadC, και τα μετασηματισμένα στελέχη με το πλασμίδιο αυτό δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας (Merritt, et al., 2007)

Η μεταγραφική ρύθμιση της βιογέννησης των μαστιγίων στην *P.aeruginosa*, χωρίζεται σε ένα σύστημα τεσσάρων επιπέδων (Dasgupta, 2003) που συμπεριλαμβάνει πολλούς μεταγραφικούς ρυθμιστές και σ παράγοντες που απαιτούνται για τη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με τα μαστίγια: *FleQ* (Arora, et al., 1997; Dasgupta, 2003), *FleSR* (Dasgupta, 2003; Ritchings, et al., 1995), *FliA*(σ^{28}) (Dasgupta, et al., 2002), σ^{54} (Starnbach, et al., 1992) και σ^{70} (Dasgupta, et al., 2002; Totten, et al., 1990). Δεν είναι γνωστό αν το γονίδιο *fleQ* είναι υπό τον έλεγχο περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ή αν η

μεταγραφή του προωθείται από άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, είναι γνωστό ότι ο παράγοντας σ^{70} είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή του *fleQ* γονιδίου (Dasgupta, et al., 2002) και ότι οι *FleR*, *FliA* και *FleQ* δεν επιδρούν στη μεταγραφή του *fleQ* γονιδίου (Dasgupta, 2003). Αρκετές πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφή του γονιδίου *fleQ*, είτε δεσμευόμενες στο DNA ανωφερικά του γονιδίου {*AlgT* (Garret, et al., 1999; Tart, et al., 2006; 2005) και *Vfr* (Dasgupta, et al., 2002)} είτε αλληλεπιδρώντας άμεσα με τον μεταγραφικό ρυθμιστή *FleQ* {*FleN* (Dasgupta, et al., 2000)}. Η πρωτεΐνη *Vfr* είναι ομόλογη της πρωτεΐνης υποδοχέα του κυκλικού AMP και εκτός από τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των μαστιγίων φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην ρύθμιση της έκφρασης μολυσματικών παραγόντων (Mastroaolo, et al., 2012). Ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο παραγόντων *SadC/B*, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τόσο την ομαδική κινητικότητα όσο και τον σχηματισμό βιοφίλμ (Caiazza, et al., 2004; 2005; Merritt, et al., 2007). Μεταλλαγή στο γονίδιο *sadC*, αυξάνει την ομαδική κινητικότητα και μειώνει τον σχηματισμό βιοφίλμ (Merritt, et al., 2007). Στο στέλεχος της *P.fluorescens* F113, μεταλλαγές στα γονίδια *sadB*, *gacS* ή *wspR*, οδηγεί σε αυξημένη ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα, σχεδόν όμοια με εκείνη του στελέχους αγρίου τύπου F113. Σε διπλά και τριπλά μεταλλάγματα εμφανίζεται πιο ισχυρός φαινότυπος, ενώ διαφορές ως προς την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ δεν έχουν μελετηθεί. Εκτός από τις επιπτώσεις στην κινητικότητα της *P.fluorescens* F113, οι πρωτεΐνες *SadB* και *GacS* καταστέλλουν έμμεσα την έκφραση του γονιδίου *fleQ* (Navazo, 2009). Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι και η πρωτεΐνη *GacA*, εμπλέκεται στην ομαδική κινητικότητα της *P.fluorescens* Pf-5 ασκώντας θετικό ρυθμιστικό έλεγχο στο γονίδιο *fleQ* (Hasan, 2010). Μεταλλαγές που επηρεάζουν την ρύθμιση των μαστιγίων, τη βιογέννησή τους ή τροποποιούν τις διαδικασίες αυτές στο γένος *Pseudomonas*, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την ικανότητα των οργανισμών να κινούνται στο περιβάλλον τους (Marshall, 2001), τον χημειοτακτισμό (Robleto, et al., 2003) και τον σχηματισμό βιοφίλμ (Casaz, 2001; Tagushi, 2006). Οι βασικές πτυχές σχετικά με τις μαστιγιακές συσκευές και την κινητικότητα είναι σε μεγάλο βαθμό κατανοητές για ένα μεγάλο εύρος βακτηρίων, αλλά νέα γονίδια αποκαλύπτουν και άλλες πτυχές της κινητικότητας σε διαφορετικά είδη.

Τα γονίδια *fliT* και *fleP* στην *P.fluorescens* F113 και στην *P.aeruginosa* PAO1 αντίστοιχα, εδράζονται στον ίδιο γενετικό τόπο, αλλά το κάθε ένα από αυτό φαίνεται να έχει διαφορετική λειτουργία στα είδη αυτά (Cardevila, et al., 2004). Τόσο η πρωτεΐνη *FliT* όσο και η *FleP* είναι απαραίτητες για την κινητικότητα, αλλά το μετάλλαγμα της PAO1 *fleP* εμφανίζει αποκολλημένα μαστίγια (Dasgupta, 2003), ενώ το μετάλλαγμα της F113 *fliT*, φέρει μαστίγια μορφολογικά παρόμοια με αυτά του στελέχους αγρίου τύπου (Cardevila, et al., 2004). Το γονίδιο *fleP* βρίσκεται υπό τον έλεγχο της *FleQ* στην *P.aeruginosa* PAO1 (Dasgupta, 2003) και το ορθόλογό του γονίδιο *fliT* στην *P.aeruginosa* Pfo-1 βρίσκεται υπό τον έλεγχο της *AdnA*. Παρ'όλα αυτά, οι Redondo-Nieto et al. απέδειξαν ότι το γονίδιο *fliT* και ένα ακόμα γονίδιο, το *flaG*, μεταγράφονται ανεξάρτητα από τους παράγοντες *FleA* και *FleQ* στην *P.fluorescens* (Redondo-Nieto, 2008). Έτσι, είναι προφανές ότι οι διαφορές στα στελέχη της *P.fluorescens* δεν περιορίζονται μόνο στη γονιδιακή ρύθμιση αλλά ενυπάρχουν και στο γονιδιακό τους περιεχόμενο (Silby, 2009). Είναι προφανές ότι υπάρχουν ακόμα λεπτομέρειες προς διερεύνηση σχετικά με τον έλεγχο της κινητικότητας των μαστιγίων στο επίπεδο των εμπλεκόμενων γονιδίων και της ρύθμισής του. Το παράδειγμα του γονιδίου *fliT* υπογραμμίζει το γεγονός ότι διαφορετικά στελέχη του ίδιου γένους ή ακόμα και του ίδιου είδους μπορεί να εμφανίζουν αποκλίσεις από το γενικό πρόγραμμα ρύθμισης και να χρησιμοποιούν ειδικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Mastroaio, et al., 2012).

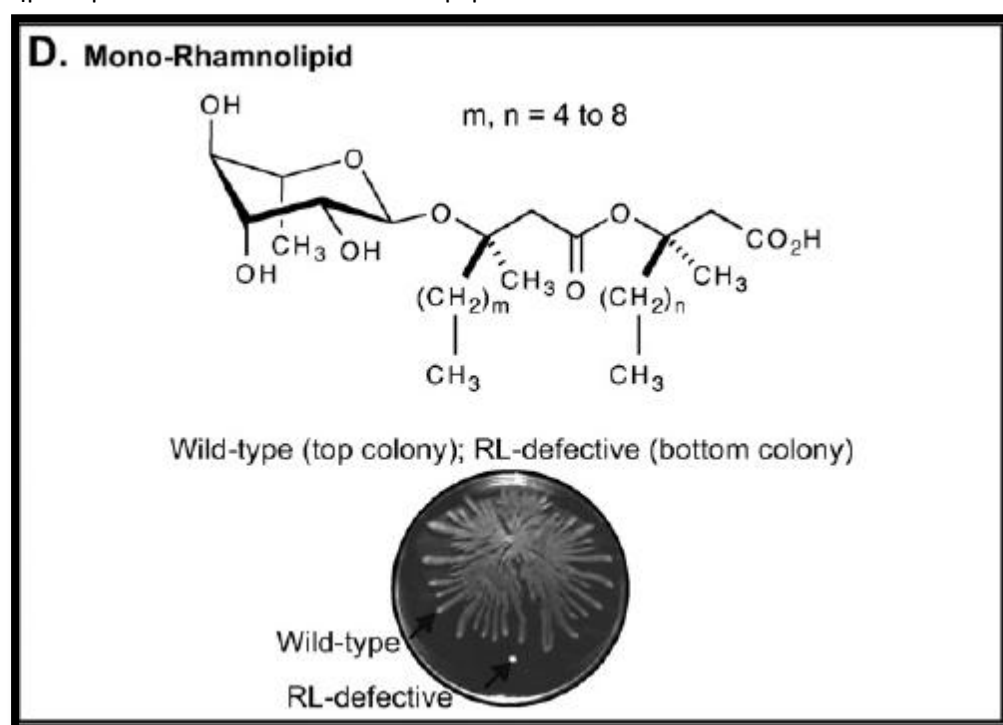
Τα μαστίγια, εμπλέκονται επίσης και στο σχηματισμό σχεδίων κυττάρων (rafts). Τα βακτήρια, κατά την κολυμβητική κίνηση, φαίνεται να κινούνται ως μεμονωμένα κύτταρα, ενώ κατά την ομαδική κίνηση κινούνται δίπλα-δίπλα σε ομάδες κυττάρων σε ένα σχηματισμό που αναφέρεται ως σχεδία (rafts) (Alberti, et al., 1990; Copeland, et al., 2010; Eberl, et al., 1999; Girgis, et al., 2007; Jones, et al., 2004; Kearns, et al., 2003; Morrisson, et al., 1966; O'Rear, et al., 1992; Rashid, et al., 2000; Young, et al., 1999). Η διαδικασία του σχηματισμού της σχεδίας είναι δυναμική: τα κύτταρα που απαρτίζουν τη σχεδία κινούνται ως μια ομάδα, ενώ τα κύτταρα που αποκόπτονται από την ομάδα γρήγορα χάνουν την κινητικότητά τους. Μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποκάλυψαν ότι κατά την ομαδική κινητικότητα ο *P.mirabilis* σχηματίζει εκτεταμένες σχεδίες, όπου τα μαστίγια των κυττάρων της ομάδας μπλέκονται μεταξύ τους. Ο λόγος για τον οποίο είναι απαραίτητος ο σχηματισμός σχεδιών, κατά την ομαδική κινητικότητα ορισμένων βακτηριακών στελεχών παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος (Kearns, 2010).



Εικόνα 12: απεικόνιση του «κύκλου ζωής» των κινητών βακτηριακών κυττάρων κατά τη διάρκεια ομαδικής κινητικότητας πάνω σε επιφάνειες (Copeland, et al., 2009)

1.10.2 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, που έχουν μεγάλη τασιενεργή δράση. Η ικανότητά τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση είναι αποτέλεσμα των επιμέρους ιδιοτήτων των δομικών τους μονάδων. Το υδρόφοβο τμήμα αυτών των μορίων είναι συνήθως ένα λιπαρό οξύ, ενώ το υδρόφιλο τμήμα του μορίου αποτελείται από ένα ολιγοπεπτιδίο ή άπο μόνο- ή δισακχαρίτες. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες συχνά εμφανίζονται ως ένα διαυγές υδατικό στρώμα, το οποίο προηγείται του αναπτυσσόμενου άκρου της swarming αποικίας (Alberti, et al., 1990; Julkowska, et al., 2004; Kearns, et al., 2003; Rashid, et al., 2000; Senesi, et al., 2002). Κάποια βακτήρια που δεν βιοσυνθέτουν επιφανειοδραστικές ουσίες, μπορούν να επιδείξουν τον φαινότυπο της ομαδικής κινητικότητας σε τρυβλία με ειδικό άγαρ με εγγενώς χαμηλά επίπεδα επιφανειακής τάσης, πιθανότατα λόγω της παρουσίας κάποιας επιφανειοδραστικής ένωσης στο ίδιο το άγαρ (Harsey, et al., 1994; Kiron, et al., 2002; Matsuyama, et al., 1995; Togushi, et al., 2000; Zhang, et al., 2010). Η *Pseudomonas aeruginosa* παράγει ραμνολιπίδια, ένα μίγμα διραμνολιπιδίων και μονο-ραμνολιπιδίων, και 3-(3-υδροξυαλκανοικό οξύ)(HAA), το οποίο είναι και το πρόδρομο μόριο των ραμνολιπιδίων λιπιδίων χωρίς τη ραμνόζη (Deziel, et al., 2003). Τα ραμνολιπίδια(RLs) είναι αμφίφιλα γλυκολιπίδια που αποτελούνται από L-ραμνόζη και 3-(3-υδροξυαλκανοικό οξύ). Στην υδρόφοβη επιδερμίδα, των φύλων των δυτικών οργανισμών, οι επιφανειοδραστικές ενώσεις εκτός από την κινητικότητα, συνεισφέρουν και στη διαλυτοποίηση και στη διάχυση υποστρωμάτων κατάλληλων για την ανάπτυξη (Lindow, et al., 2003). Για να διαπιστωθεί ο ρόλος των λιποπεπτιδίων στην κινητικότητα της *Pseudomonas*, δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη που δεν είχαν την ικανότητα βιοσύνθεσης λιποπεπτιδίων και ελέγχθηκε η ικανότητα κινητικότητας σε επιφάνεια ημιστερεού άγαρ *in vitro*.

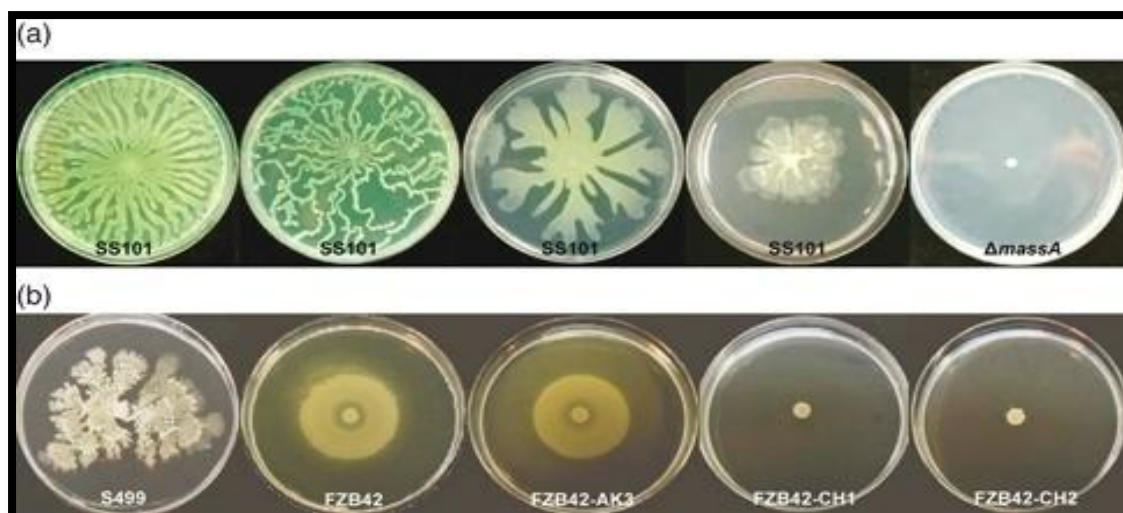


Εικόνα 13: η δομή των μόνο-ραμνολιπιδίων. Η εικόνα δείχνει την ομαδική κινητικότητα ενός στελέχους αγρίου τύπου της *P.aeruginosa* και ενός μεταλλαγμένου στελέχους *rhlA*, που δεν έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης ραμνολιπιδίων (Kohler, et al., 2000).

Πίνακας 5: η συμμετοχή των λιποπεπτιδίων και άλλων βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων στην κινητικότητα σε διάφορα είδη της *Pseudomonas*.

Είδος	Βιοεπιφανειοδραστική ένωση	Κινητικότητα σε μεταλλαγμένο στέλεχος ελαττωματικό ως προς την παραγωγή της.	Αναφορές
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Μασσετολίδη Α	Όχι	(De Bruijn, et al., 2008)
	Βισκοσίνη	Όχι	(De Bruijn, et al., 2007)
	Ορφαμίδη	Μειωμένη	(Gross, et al., 2007)
<i>Pseudomonas putida</i>	Πουτισολβίνη	Μειωμένη	(Kuiper, et al., 2004)
<i>Pseudomonas</i> MIS38	στελεχος Αρθροφακτίνη	Όχι	(Roongsawang, et al., 2003)
<i>Pseudomonas</i> DSS73	στελεχος Αμφισίνη	Όχι	(Andersen, et al., 2003)
<i>Pseudomonas</i> pv. tomato	syringae Συριγκοφακτίνη	Όχι	(Betri, et al., 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ραμνολιπίδια	όχι	(Deziel, et al., 2003)

Έχει δειχθεί ότι για διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη της *Pseudomonas* με μειωμένη ικανότητα κινητικότητας λόγω ελαττωμάτων στη βιοσύνθεση των λιποπεπτιδίων, η κινητικότητα στις επιφάνειες επανέρχεται με την προσθήκη εξωγενών λιποπεπτιδίων στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Andersen, et al., 2003; De Bruijn, et al., 2007), ενώ παράλληλα η προσθήκη δομικά παρόμοιων ή όχι βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων που παράγονται από άλλα βακτηριακά στελέχη ή είδη μπορεί να οδηγήσει στο ίδιο αποτέλεσμα (Andersen, et al., 2003).



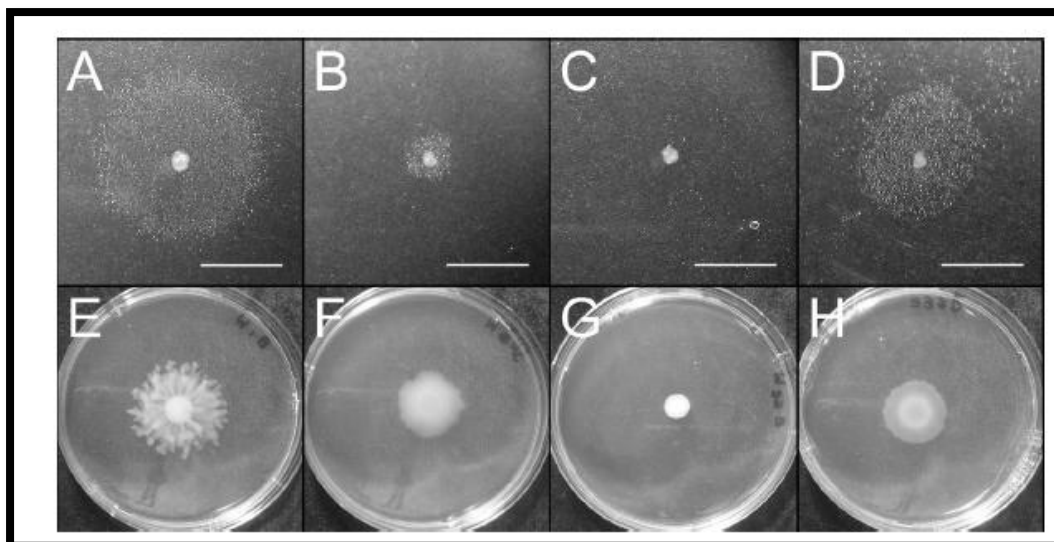
Εικόνα 14: Ο ρόλος των λιποπεπτιδίων στην ομαδική κινητικότητα στελεχών *Pseudomonas* και *Bacillus*, σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 0,6%. (a) Τα τέσσερα πρώτα τρυβλία έχουν εμβολιαστεί με το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* SS101, ενώ το πέμπτο έχει εμβολιαστεί με μεταλλαγμένο στέλεχος ελαττωματικό ως προς την παραγωγή λιποπεπτιδίων. Το μεταλλαγμένο στέλεχος, παρουσιάζει τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης με τα στελέχη αγρίου τύπου, αλλά δεν έχει ικανότητα κίνησης. (b) φαινότυποι ομαδικής κινητικότητας στα στελέχη του *Bacillus* S499 και FZB42. Η σουρφακτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην κινητικότητα του στελέχους *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, γεγονός που γίνεται εύκολα αντιληπτό με την παρατήρηση των φαινοτύπων ομαδικής κινητικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών AK3(*surf⁺/feng⁺/itu⁺*), CH1(*surf⁺/feng⁺/itu⁺*), και CH2(*surf⁺/feng⁺/itu⁺*) (Raaijmakers, et al., 2010).

Η παραγωγή των επιφανειοδραστικών ουσιών βρίσκεται συνήθως υπό τον έλεγχο του συστήματος αίσθησης μεγέθους πληθυσμού. Σε πολλά είδη του γένους *Pseudomonas*, το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (Quorum Sensing) χρησιμοποιεί ως διακυτταρικά μόρια επικοινωνίας της N-ακυλ λακτόνες της ομοσερίνης (N-AHLs) που λωδικοποιούνται από γονίδια τύπου *luxI*. Όταν η συγκέντρωση αυτών των μοριών φτάσει σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, δεσμεύονται στην συγγενή ρυθμιστική πρωτεΐνη *LuxR*, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Venturi, 2006; Williams, et al., 2009). Οι μεταβολίτες που ρυθμίζονται μέσω του συστήματος QS, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο τέλος της εκθετικής φάσης ή στη φάση στασιμότητας των στελεχών που τους παράγουν. Στη βιοσύνθεση της πουτισολβίνης, που δρα και ως επιφανειοδραστικό μόριο στο στέλεχος *P.putida* PCL1445, φάνηκε ότι εμπλέκται το σύστημα QS μέσω των N-AHLs (Dubern, et al., 2006). Οι μεταγραφικοί ρυθμιστικοί παράγοντες τύπου *LuxR*, εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της συριγκομυκίνης, της συριγκοπεπτίνης, των συριγκοφακτινών, των πουτισολβινών, της βισκοσίνης και των μασσετολιδών (Lu, et al., 2002) (Wang, et al., 2006; Betri, et al., 2007; Dubern, et al., 2008; De Bruijn, et al., 2009a). Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το σύστημα QS εξελίχθηκε έτσι ώστε να ρυθμίζει την παραγωγή των επιφανειοδραστικών ενώσεων, εξασφαλίζοντας ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις παράγονται μόνο όταν υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός βακτηρίων, έτσι ώστε οι βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις να παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα στον βακτηριακό πληθυσμό (Kearns, 2010).

Ένα άλλο σύστημα που εμπολέκεται στη βιοσύνθεση κάποιων επιφανειοδραστικών ουσιών είναι το ρυθμιστικό σύστημα δύο παραγόντων *GacA/GacS*. Αν και το συγκεκριμένο ρυθμιστικό σύστημα είναι αντικείμενο αρκετών ερευνών (Heeb, et al., 2001; De Souza, et al., 2003a; Haas, et al., 2005), λίγα είναι γνωστά για τα σιγάλα που οδηγούν στην ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των λιποπεπτιδίων.

Σχετικά πρόσφατη μελέτη, έδειξε ότι η παραγωγή της συριγγοπεπτινής ενεργοποιείται από ειδικά φαινολικά β-γλυκοσίδια και ειδικά σάκχαρα που είναι κοινά στους φυτικούς ιστούς, και ότι η κινάση *GacS* και οι μεταγραφικοί ρυθμιστές *SalA* και *SyrF*, μεσολαβούν στη μετάδοση των μοριακών μηνυμάτων στα βιοσυνθετικό σύμπλεγμα γονιδίων *syr-syp* (Wang, et al., 2006). Στο γένος *Pseudomonas* η βιοσύνθεση της αμφισίνης, της πουτισολβίνης, της συριγγοκυκίνης, των μασσετολιδών και της βισκοσίνης ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα *GacA/GacS* με τέτοιο τρόπο ώστε στελέχη στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το σύστημα αυτό, χάνουν την ικανότητα βιοσύνθεσης των συγκεκριμένων κυκλικών λιποπεπτιδίων. Ο μηχανισμός με τον οποίο το σύστημα *GacA/GacS* ελέγχει τη μεταγραφή των NRPS γονιδίων είναι έμμεσος, και υποστηρίζεται ότι σε διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, ελέγχει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση των NRPS (Raaijmakers, et al., 2006).

Πιο πρόσφατα, μελετώντας της παραγωγή του βιοεπιφανειοδραστικού λιποπεπτιδίου συριγγοφακτίνης (*syringafactin*), από την *Pseudomonas syringae* *pv syringae* *B728a*, παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παράγει και ένα δεύτερο επιφανειοδραστικό μόριο, το οποίο ανιχνεύεται στα τρυβλία (Burch, et al., 2010). Μεταλλαγμένα στελέχη, στα οποία το σύμπλεγμα των γονιδίων (*syfA* και *syfB*) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της συριγγοφακτίνης διαταράσσεται, εξακολουθούν να παράγουν την δεύτερη επιφανειοδραστική ουσία, η οποία παράγεται σε ποσότητα ικανή για την προώθηση της ομαδικής κινητικότητας στην επιφάνεια ημιστερεού άγαρ. Με στόχο να ταυτοποιηθεί η δεύτερη επιφανειοδραστική ουσία, μελετήθηκε μια βιβλιοθήκη Tn5 μεταλλαγμάτων που δημιουργήθηκε σε στέλεχη $\Delta syfA$, και βρέθηκε ότι 4 μεταλλάγματα δεν παράγουν καθόλου επιφανειοδραστικές ουσίες. Τα 3 από τα μεταλλάγματα αυτά έφεραν ενθέση στα ρυθμιστικά γονίδια: *gacS*, *ompR* και *fleQ*. Ο παράγοντας *GacS* ρυθμίζει την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών και των εξωκυττάρων ενζύμων (Heeb, et al., 2001), ένας παράγοντας ομόλογος του *OmpR* έχει υποθεθεί ότι είναι μεμβρανικός υποδοχέας που σχετίζεται με την απόκριση στο στρες στην *P.aeruginosa* (Lee, 2009) και ο παράγοντας *FleQ* είναι ο αρχικός ρυθμιστής στη βιοσύνθεση των μαστιγίων (Dasgupta, 2003). Το τέταρτο γονίδιο, *Psy_3129*, κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία πιθανότατα έχει λειτουργία ακυλοτρανσφεράσης και έχει κατά 48,5% ομολογία με την *rhIA* και 49% ομολογία με την *phaG* της *P.aeruginosa* *PAO1*, και φαίνεται ότι εμπλέκεται άμεσα στην βιοσύνθεση της επιφανειοδραστικής ουσίας (Burch, et al., 2011). Το γονίδιο *RhIA* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του πρόδρομου μορίου για τη βιοσύνθεση των ραμνολιπιδίων στην *P.aeruginosa* (Deziel, et al., 2003), ενώ το γονίδιο *PhaG* εμπλέκεται στη σύνθεση του πολυυδρόξυαλκανοϊκού οξέος (PHA), που είναι ένα μόριο που χρησιμεύει για την αποθήκευση της ενέργειας (Rehm, et al., 1998).



Εικόνα 15: (A και E) Στελέχη αγρίου τύπου της *Pseudomonas syringae* B728a, (B και F) Δ syfA μετάλλαγμα, (C και G) διπλό μετάλλαγμα Δ syfA *Psyr*_3129, (D και H), διπλό μετάλλαγμα Δ syfA *Psyr*_3129, που φέρει το πλασμίδιο pRHLA2, που εκφράζει το *Psyr*_3129 γονίδιο. Στην πρώτη σειρά των τρυβλίων ανιχνεύεται η παραγωγή επιφανειοδραστικής ουσίας στην επιφάνεια τρυβλίων στερεοποιημένων με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%, ενώ στην δεύτερη σειρά παρατηρείται η ομαδική κινητικότητα των στελεχών σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 0,4% (Burch, et al., 2011).

Ένα μη αναμενόμενο εύρημα της ανάλυσης των μεταλλαγμάτων που επιδείκνυαν είτε αυξημένη είτε μειωμένη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουδιών ήταν ότι αρκετά από αυτά έφεραν και μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες-μέλη του βιοσυνθετικού μονοπατιού των μαστιγίων.

Από την μελέτη των Bruch et al. (2011), αποδείχθηκε ότι όσο μικρότερη είναι η τάξη του γονιδίου του οποίου διαταράσσεται η λειτουργία, τόσο μικρότερο είναι και το «στεφάνι» που σχηματίζεται στα τρυβλία λόγω της παραγωγής της επιφανειοδραστικής ουσίας. Μια ένθεση στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον κυρίαρχο ρυθμιστή *FleQ*, οδηγεί σε ολοκληρωτική ανικανότητα παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας.

Επιπλέον, ενθέσεις στα γονίδια *fgt1* και *fgt2* που εμπλέκονται στην γλυκοζυλίωση των μαστιγίων στην *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 6605, που είναι σημαντική τόσο για τη λειτουργία όσο και για τη σταθερότητα των μαστιγίων, οδήγησαν σε μεγαλύτερα «στεφάνια» λόγω παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών στα τρυβλία (Tagushi, 2006). Αυτά τα αποτελέσματα, οδήγησαν τους ερευνητές (Burch, et al., 2011) να υποθέσουν ότι η συναρμολόγηση του βασικού σωματίου του μαστιγίου είναι ένας σημαντικός ενεργοποιητής για την παραγωγή HAA και ότι από τη στιγμή που το βασικό σωματίο συναρμολογείται και ενεργοποιείται η σύνθεση φλαγγελίνης, οι μεταλλαγές που παρεμποδίζουν τη συναρμολόγηση του μαστιγίου ή τη λειτουργικότητά του έχουν ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση της σύνθεσης HAA. Μια πιθανή εξήγηση για το γεγονός ότι η *P. syringae* ρυθμίζει συνεργατικά την έκφραση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και την βιοσύνθεση των μαστιγίων μπορεί να είναι ότι το HAA χρησιμοποιείται ως «λιπαντικό» για τα μαστίγια. Με βάση την υπόθεση αυτή, σε συνθήκες όπου υπάρχει αυξημένη πιθανότητα θραύσης των μαστιγίων υπάρχει αυξημένη παραγωγή τόσο φλαγγελίνης όσο και HAA. Η παραγωγή HAA μπορεί να βοηθά στη «λίπανση» κολλωδών επιφανειών ή/και των μαστιγίων με στόχο να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα θραύσης. Εναλλακτικά, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα μαστίγια μπορούν να

λειτουργήσουν ως αισθητήρες της επιφάνειας, μεταβιβάζοντας πληροφορίες σχετικά με τη θέση μέσω της αναστολής της περιστροφής των μαστιγίων (Belas, et al., 2005) ή πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες υγρασίας μέσω της μεταφοράς έξω από το βακτηριακό κύτταρο, του παράγοντα *FlgM* (Wang, et al., 2005). Αν η σύνθεση της φλαγγελίνης, είναι ενδεικτική από μόνη της των εξωκυττάρων συνθηκών κάτω από τις οποίες η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών θα ήταν ευεργετική για τον βακτηριακό πληθυσμό, η συντονισμένη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να είναι μια αποτελεσματική απόκριση.

Με βάση τη συνδυαστική ρύθμιση της παραγωγής HAA με τα γονίδια της τάξης IV της βιοσύνθεσης των μαστιγίων, οι ερευνητές είχαν αρχικά υποθέσει, ότι ο *FliA*, ο παράγοντας που ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων της τάξης IV, μπορεί να είναι απευθείας υπεύθυνος για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *rhIA*. Όμως, η διαταραχή του γονιδίου *fliA*, δεν καταργεί την παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας και η μεταγραφή του γονιδίου *rhIA* δεν ρυθμίζεται θετικά στο μετάλλαγμα $\Delta syfAflIC$, γεγονός το οποίο επιδεικνύει μια πιθανόν αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα *FliA*. Είναι, πιθανό το γονίδιο *rhIA* ρυθμίζεται άμεσα από τον παράγοντα *FleQ*, καθώς διαταραχές στο μονοπάτι της βιογένεσης των μαστιγίων ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφή του γονιδίου *fleQ* αλλά και τα γονίδια που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του παράγοντα *FleQ* (Dasgupta, 2003), αλλά αυτό μένει να αποδειχθεί. Μένει επίσης να διερευνηθεί επίσης το πώς ακριβώς οι μεταλλαγές που εμπλέκονται στα τελευταία στάδια της συναρμολόγησης των μαστιγίων επηρεάζουν την παραγωγή των επιφανειοδραστικών ουσιών. Η γλυκοζυλίωση των μαστιγίων φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με αυτή τη ρυθμιστική διαδικασία. Η γλυκοζυλίωση παίζει ρόλο στη σταθερότητα και στη λίπανση των μαστιγίων της *P.syringae* *pn.tabaci*, όπου τα μη γλυκοζυλιωμένα μαστίγια σχηματίζουν δύσκαμπτες δέσμες (Tagushi, 2008). Μέσω της γλυκοζυλίωσης, είναι πιθανόν να «καλύπτονται» κολλώδη αμινοξέα που είναι παρόντα στα μαστίγια αποτρέποντάς έτσι τη δέσμευσή τους σε υποστρώματα όπως η σελουλόζη, προστατεύοντας έτσι τα μαστίγια από την πιθανότητα θράυσης. Έτσι λοιπόν, αν η γλυκοζυλίωση κάνει να τα μαστίγια πιο εύκαμπτα και πιο ανθεκτικά στη θραύση, τα μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία τα μαστίγια δεν γλυκοζυλιώνονται φέρουν πιο ευαίσθητα μαστίγια και απαιτούν αυξημένη σύνθεση φλαγγελίνης και λιπαντικών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

1.11 Φαινότυποι που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα.

1.11.1 Η περίοδος υστέρησης (swarming lag).

Η περίοδος υστέρησης (μη κινητική συμπεριφορά) προηγείται της έναρξης της ομαδικής κινητικότητας όταν τα βακτήρια μεταφέρονται από ένα υγρό μέσο σε μια στερεή επιφάνεια (Belas, et al., 2005; Hoeniger, 1964; Kearns, et al., 2003; Morrisson, et al., 1966). Η περίοδος υστέρησης είναι σταθερή κάτω από ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών, αλλά μπορεί να μειωθεί με την αύξηση της πυκνότητας του εμβολίου ή να καταργηθεί τελείως με τη χρήση συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων (Belas, et al., 1986; Chen, et al., 2009; Kearns, et al., 2003; 2005; Rauprich, et al., 1996). Το φαινόμενο της περιόδου υστέρησης είναι σε μικρό βαθμό κατανοητό, αλλά υποδεικνύει ότι τα κύτταρα που παρουσιάζουν κινητικότητα μέσω κολυμβητικής κίνησης πρέπει να αλλάξουν συμπεριφορά έτσι ώστε να μετατραπούν σε κύτταρα που παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα. Φαίνεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον

τρεις προϋποθέσεις για την αποφυγή της περιόδου υστέρησης στον *Bacillus subtilis*. Η πρώτη προϋπόθεση αφορά στην υψηλή πυκνότητα των κυττάρων που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας σουρφακτίνη. Η σουρφακτίνη, δεν καθορίζει την ελάχιστη διάρκεια της περιόδου υστέρησης διότι η περίοδος υστέρησης δεν μειώνεται όταν τα κύτταρα εμβολιάζονται σε άγαρ που επιτρέπει την ομαδική κινητικότητα στο οποίο έχει προστεθεί η επιφανειοδραστική ουσία (Kearns, et al., 2003). Η δεύτερη προϋπόθεση φαίνεται να είναι η αύξηση του αριθμού των μαστιγίων, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η περίοδος υστέρησης ελαχιστοποιείται σε κύτταρα στα οποία τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των μαστιγίων ρυθμίζονται θετικά (Kearns, et al., 2005). Η Τρίτη προϋπόθεση είναι σε μικρότερο βαθμό κατανοητή και έχει εξαχθεί από το γεγονός ότι η περίοδος υστέρησης καταργείται όταν κύτταρα που επιδεικνύουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας στην επιφάνεια ενός τρυβλίου εμβολιάζονται εκ νέου σε τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό υλικό κατάλληλο για την ομαδική κινητικότητα. Η περίοδος υστέρησης που εξαρτάται από την πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων εξακολουθεί να εμφανίζεται όταν επιλέγονται κύτταρα με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, υποβάλλονται σε διαδοχικές αραιώσεις και εμβολιάζονται στη συνέχεια σε τρυβλίο παρουσία επιφανειοδραστικής ουσίας. Έτσι, η τρίτη προϋπόθεση μπορεί να αντιπροσωπεύει μια κρίσιμη κυτταρική πυκνότητα η οποία είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του πυρήνα των πολυκύτταρων σχεδίων που συνεπάγονται την παραγωγή των κρίσιμων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση αυτής της συμπεριφοράς (Kearns, 2010).

1.11.2 Η επιμήκυνση των κυττάρων.

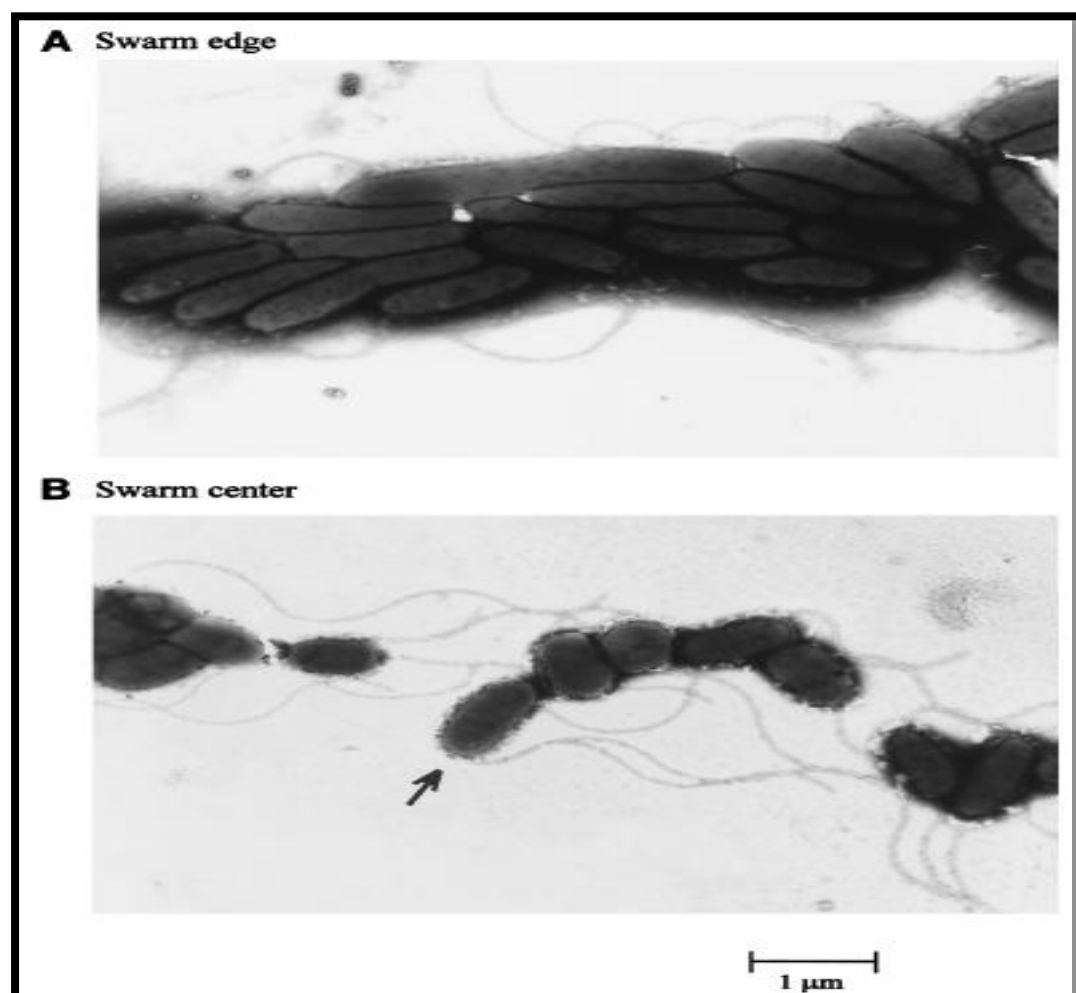
Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα κύτταρα κατά την ομαδική κινητικότητα καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση (σχηματισμός νηματοειδών κυττάρων) γεγονός που οδηγεί στην επιμήκυνση του κυττάρου, η οποία αποτελεί και έναν δείκτη της ομαδικής κινητικότητας. Η συσχέτιση μεταξύ των νηματοειδών κυττάρων και της ομαδικής κινητικότητας έχει προέλθει από παρατηρήσεις στον *P.mirabilis*, τα κύτταρα του οποίου έχουν ραβδοειδές σχήμα όταν αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια ενώ σχηματίζουν μακριά νημάτια με πολλαπλά πυρηνοειδή όταν αναπτύσσονται σε στερεές επιφάνειες (Hoeninger, 1965; 1964). Ωστόσο, η επιμήκυνση των κυττάρων δεν παρατηρείται κατά την ομαδική κίνηση σε όλα τα είδη των βακτηρίων και δεν είναι μέχρι σήμερα σαφές αν τα επιμήκη κύτταρα απαιτούνται για την εξάπλωση της αποικίας κατά την ομαδική κινητικότητα ή αν απλώς συσσωρεύονται στο αναπτυσσόμενο άκρο των αποικιών με φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας (Kearns, 2010). Λίγες μελέτες, πέρα από τις αρχικές παρατηρήσεις στον *Proteus*, έχουν πράγματι επιβεβαιώσει ότι τα επιμήκη κύτταρα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας είναι στην πραγματικότητα νηματοειδή. Ο όρος «νηματοειδείς» περιγράφει ένα ελάττωμα στην διαδικασία των κυτταρικών διαιρέσεων που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς επακόλουθο διαχωρισμό. Τα επιμήκη κύτταρα μπορούν επίσης να προκύψουν και από την αποτυχία διαχωρισμού μετά την επιτυχημένη κυτταρική διαίρεση με αποτέλεσμα τα κύτταρα να συνδέονται και να σχηματίζουν μεγάλες αλυσίδες. Οι αλυσίδες των κυττάρων και τα νημάτια είναι δύσκολο να διακριθούν εκτός αν παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού και έχει προηγηθεί στο παρασκεύασμα χρώση της μεμβράνης, και με αυτό τον τρόπο γίνεται εύκολος ο

διαχωρισμός των νηματοειδών κυττάρων- που δεν φέρουν διαφράγματα-, από τις αλυσίδες υττάρων που παρατηρούνται διαφράγματα μεταξύ των κυττάρων (Kearns, 2010).

1.11.3 Δημιουργία μοτίβων των αποικιών.

Κατά την ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά μέσα , σχηματίζονται αποικίες με ποικιλία σχημάτων αλλά η σημασία που κάθε ενός ιδιαίτερου μοτίβου παραμένει ασαφής. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις που συνηγορούν στο ότι όλα τα βακτήρια με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας μπορούν να σχηματίσουν αποικίες με ένα μεγάλο εύρος μοτίβων που εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Caiazza, et al., 2005; Harsey, 2003; Hiramatsu, et al., 2005; Shimada, et al., 2004).

Σε πολλές περιπτώσεις η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την ομοιόμορφη κατανομή της αποικίας ως ένα μονό στρώμα κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου(featureless). Το μονό στρώμα αυτό των κυττάρων είναι διαφανές αλλά μπορεί να παρατηρηθεί όταν τα προσπίπτων φως αντανακλάται άμεσα στην επιφάνεια του άγαρ. Η πυκνότητα των κυττάρων στο μονό αυτό στρώμα είναι υψηλή και σχεδόν ομοιόμορφη σε

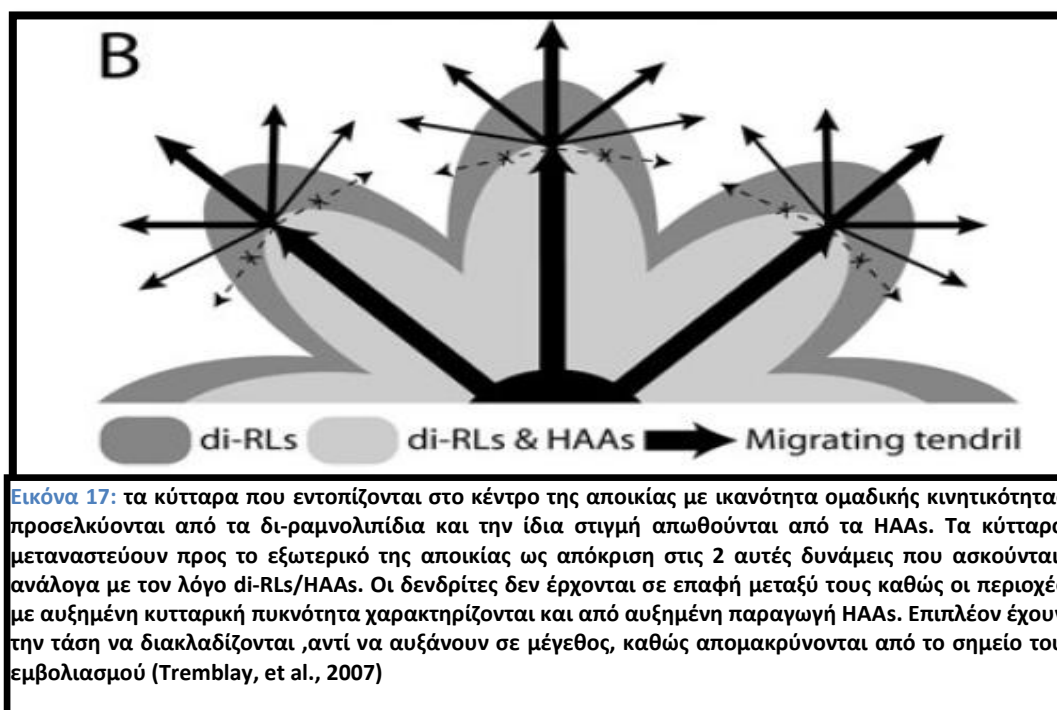


Εικόνα 16: παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κυττάρων της *Pseudomonas aeruginosa* PT5 από το την άκρη αποικίας και από το κέντρο αποικίας που παρουσιάζει φαινόμενο ομαδικής κινητικότητας.(A)Επιμήκη κύτταρα μεγέθους 3-4μm, εντοπίστηκαν στην περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας.(B)Μικρότερου μεγέθους κύτταρα(περίπου 2μm) παρατηρούνται στο κέντρο της αναπτυσσόμενης αποικίας. Ένα κύτταρο που φέρει 2 πολικά μαστίγια σημειώνεται με βέλος. Μερικά επιμήκη κύτταρα με 2 πολικά μαστίγια παρατηρήθηκαν και στο άκρο της αναπτυσσόμενης αποικίας.(μεγέθυνση x8.500) (Kohler, et al., 2000).

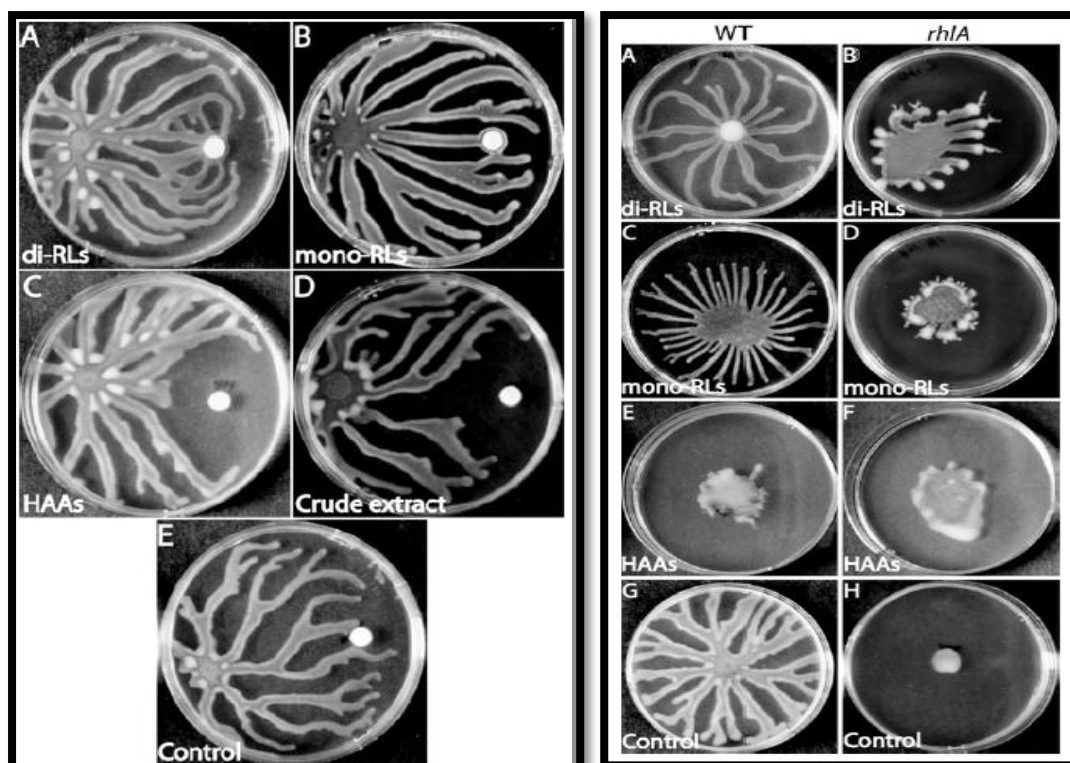
ολόκληρη την αποικία ενώ αυξάνεται ελαφρά στο άκρο της αναπτυσσόμενης αποικίας (Darnton, et al., 2010). Όταν το μονόστρωμα προσεγγίζει τα όρια του τρυβλίου, η αποικία έχει απροσδιόριστο σχήμα καθώς τα κύτταρα καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου (Eberl, et al., 1999; Kearns, et al., 2003).

Το πιο διαδεδομένο μοτίβο που παρατηρείται σε αποικίες βακτηριών που κινούνται ομαδικά είναι το «μάτι του ταύρου» (bull's eye) και το μοτίβο αυτό παρατηρείται συχνά σε στελέχη του *P.mirabilis*. Το μοτίβο αυτό προκύπτει από τη συντονισμένη κινητικότητα των κυττάρων από το σημείο του αρχικού εμβολιασμού τους και την ξαφνική αναστολή της κίνησης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ομόκεντρων δακτυλίων (Hoeniger, 1964; Matsuyama, et al., 2000; Rauprich, et al., 1996).

Ένα άλλο μοτίβο που σχηματίζεται από αποικίες βακτηριών που επιδεικνύουν ομαδική κινητικότητα είναι οι δενδρίτες. Ο σχηματισμός δενδριτών στην *P.aeruginosa* εξαρτάται από την έκκριση πολλαπλών επιφανειοδραστικών ουσιών (Caiazza, et al., 2005; Deziel, et al., 2003; Tremblay, et al., 2007). Τα παράγωγα των ραμνολιπιδίων συμβάλλουν στην διαφοροποίηση της δομής της αποικίας καθώς η πρόδρομη ένωση HAA δρα ως απωθητικό ενώ τα διραμνολιπίδια δρουν ως προσελκυστικά μόρια (Tremblay, et al., 2007).



Εικόνα 17: τα κύτταρα που εντοπίζονται στο κέντρο της αποικίας με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας προσελκύνονται από τα δι-ραμνολιπίδια και την ίδια στιγμή απωθούνται από τα HAAs. Τα κύτταρα μεταναστεύουν προς το εξωτερικό της αποικίας ως απόκριση στις 2 αυτές δυνάμεις που ασκούνται, ανάλογα με τον λόγο di-RLs/HAAs. Οι δενδρίτες δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους καθώς οι περιοχές με αυξημένη κυτταρική πυκνότητα χαρακτηρίζονται και από αυξημένη παραγωγή HAAs. Επιπλέον έχουν την τάση να διακλαδίζονται, αντί να αυξάνουν σε μέγεθος, καθώς απομακρύνονται από το σημείο του εμβολιασμού (Tremblay, et al., 2007)



Εικόνα 18 : (ΔΕΞΙΑ). Οι δενδρίτες έλκονται από τα διραμνολιπίδια και απωθούνται από τα HAAs. Η *Pseudomonas aeruginosa* εμβολιάστηκε σε swarming τρυβλίο στο οποίο είχε τοποθετηθεί δίσκος εμποτισμένος με: (Α)διραμνολιπίδια, (Β)μονοραμνολιπίδια, (C) HAAs, (D)οργανικό εκχύλισμα από το υπερκείμενο καλλιέργειας PA14 και (Ε)μεθανόλη(ως μάρτυρας)(ΑΡΙΣΤΕΡΑ)Η προσθήκη διραμνολιπιδίων προωθεί την ομαδική κινητικότητα ενώ η προσθήκη HAAs την αναστέλλει. Κύτταρα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα κύτταρα rhlA εμβολιάστηκαν σε swarming τρυβλίο στο οποίο μια σταγόνα (Α και Β)διραμνολιπιδίων (C και D)μονοραμνολιπιδίων ((Ε και F) HAAs και (Γκαι Η) μεθανόλη(ως μάρτυρας) εναποτέθηκε και ξηράνθηκε. (Tremblay, et al., 2007).

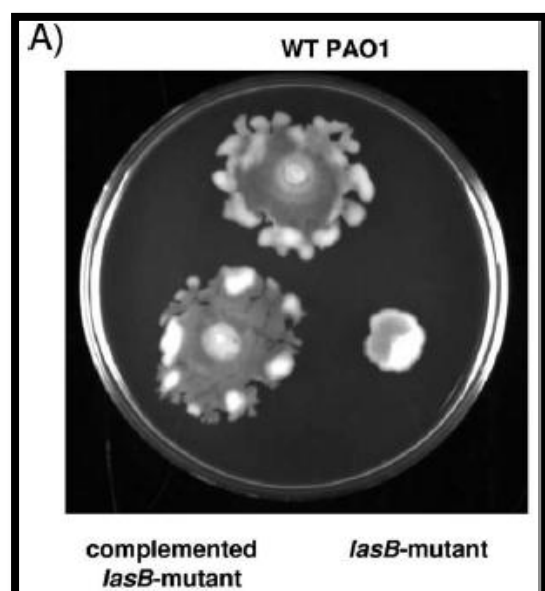
Μερικά βακτήρια σχηματίζουν σπειροειδείς στροβίλους (vortices) καθώς εξαπλώνονται στην επιφάνεια του τρυβλίου (Henrichsen, 1972; Ingham, et al., 2008; O'Rear, et al., 1992; Rudner, et al., 1998). Οι στροβίλοι αυτοί είναι μεγάλες, εντοπισμένες ομάδες κυττάρων που ταξιδεύουν ακολουθώντας μια κυκλική διαδρομή και έχουν αναφερθεί και ως «περιπλανώμενες αποικίες» (Henrichsen, 1972). Στην περίπτωση των στροβίλων του *Raenibacillus vortex*, η ομαδική κινητικότητα σε συνδυασμό με την φυσικές καμπύλες που φέρουν μορφολογικά τα κύτταρα αυτά μπορεί να προκαλούν τον σχηματισμό του στροβίλου (Ingham, et al., 2008).

Τα κύτταρα που δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα αδυνατούν να εξαπλωθούν σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου και αναπτύσσονται ως μια αποικία που περιορίζεται στο κέντρο του τρυβλίου. Με παρατεταμένη επώαση, η διάμετρος της αποικίας των στελεχών που δεν παρουσιάζουν ομαδική κινητικότητα μπορεί να αυξηθεί λόγω της sliding κινητικότητας. Σε μερικές περιπτώσεις, ενώ το θρεπτικό εμβολιάζεται με πληθυσμό βακτηρίων που δεν παρουσιάζουν κινητικότητα, ένα μικρό μέρος των κυττάρων μπορεί να φέρει μεταλλάξεις που αποκαθιστούν την ικανότητα κινητικότητας. Τα κύτταρα αυτά διαχωρίζονται από την αποικία και αναπτύσσονται στην επιφάνεια του άγαρ ως ασύμμετρες αποικίες (asymmetric flares) (Kearns, et al., 2005).

1.11.4 Η ομαδική κινητικότητα των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή μολυσματικότητα και την υψηλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Με βάση μια πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι η ομαδική κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* αντανακλά σε μια σύνθετη προσαρμογή η οποία επηρεάζεται από έναν μεγάλο αριθμό συνεργαζόμενων γονιδίων (Overhage, et al., 2007). Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας μη βιβλιοθήκη μεταλλαγμάτων Tn5-lux (Lewenza, et al., 2005) απομόνωσαν 36 μεταλλάγματα που δεν είχαν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας που έφεραν ενθέσεις τρανσποζονίου σε ρυθμιστικά, μεταβολικά, χημειοτακτικά, σχετιζόμενα με το σύστημα QS και σχετιζόμενα με το τύπου III εκκριτικό σύστημα γονίδια (Lewenza, et al., 2005). Με στόχο την κατανόηση της φύσης αυτής της περίπλοκης προσαρμογής που συνοδεύει την ομαδική κινητικότητα, διερευνήθηκε η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας στην έκφραση των γονιδίων με τη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών σε βακτήρια που βρίσκονται στο αναπτυσσόμενο άκρο της αποικίας που εμφανίζει ομαδική κινητικότητα σε σύγκριση με βακτήρια που αναπτύσσονται στο ίδιο θρεπτικό μέσο σε συνθήκες κολυμβητικής κινητικότητας (Overhage, et al., 2008). Οι μεγαλύτερες αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων παρατηρήθηκαν σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ των άλλων και ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με την μολυσματικότητα, ενώ επίσης παρατηρήθηκε ότι τα ενεργητικά ομαδικά κινούμενα κύτταρα επιδεικνύουν μια προσαρμοσμένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Με την ανάλυση ενός μεγάλου υποσυνόλου γονιδίων που υπόκεινται σε θετική ρύθμιση, αποδείχθηκε ότι 2 γονίδια που σχετίζονται με την μολυσματικότητα, τα *lasB* και *rvdQ* είναι απαραίτητα για την ομαδική κινητικότητα, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η ομαδική κινητικότητα στην *Pseudomonas aeruginosa* είναι μια περίπλοκη προσαρμοστική διαδικασία, ως απόκριση στο κολλώδες περιβάλλον ανάπτυξης, η οποία οδηγεί σε μια ουσιαστική αλλαγή στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων της μολυσματικότητας και της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Overhage, et al., 2008). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση 417 γονιδίων (διαφορά στα επίπεδα της έκφρασης μεγαλύτερη από 2 φορές), εκ των οποίων στα 309 γονίδια η έκφραση ρυθμίζεται θετικά ενώ στα υπόλοιπα 108 γονίδια η έκφραση ρυθμίζεται αρνητικά. Κάτω από συνθήκες ομαδικής κινητικότητας, παρατηρήθηκε διαφορική έκφραση γονιδίων που ανήκουν σε 21 διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, αποκαλύπτοντας έτσι τις σημαντικές αλλαγές που συνοδεύουν την ανάπτυξη σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας σε σχέση με την ανάπτυξη υπό συνθήκες κολυμβητικής κινητικότητας. Ένα αποτέλεσμα με μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι παρατηρήθηκε θετική ρύθμιση (μεταξύ 2 και 13 φορές αύξηση στα επίπεδα της ρύθμισης) ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση και την έκκριση μολυσματικών παραγόντων. . Ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια είναι και τα γονίδια που κωδικοποιούν για το εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS) και για τους εκκριτικούς παράγοντες που σχετίζονται με το σύστημα αυτό *exoS*, *exoT* και *exoD*. Σε θετική ρύθμιση υπόκεινται και τα γονίδια *aprA* που κωδικοποιεί για την εξωκυτταρική αλκαλική πρωτεάση, *lasB* που κωδικοποιεί για την εξωκυτταρική ελαστάση και *pIV* που κωδικοποιεί για την παραγωγή της πρωτεάσης IV, το γονίδιο *rhlB* που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση των ραμνολιπιδίων, τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή των σιδηροφόρων πυοχελίνη και πυοβερντίνη και γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φεναζινών. Αν και έχει αποδειχθεί ότι η ομαδική κινητικότητα στην *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

εξαρτάται τόσο από τα μαστίγια όσα και από τα ινίδια τύπου IV (Kohler, et al., 2000; Overhage, et al., 2007), τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και τη λειτουργία των μαστιγίων και των ινιδίων τύπου IV δεν υπόκεινται σε θετική ρύθμιση σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας, ενώ αντίθετα τα γονίδια *fimU*, *pilW*, *pilX*, *pilY1* και *pilY2*, που αποτελούν μια ομάδα γονιδίων που σχετίζονται με τη συναρμολόγηση και τη βιοσύνθεση των ινιδίων τύπου IV ρυθμίζονται αρνητικά και παρουσιάζουν επίπεδα έκφρασης 3-8 φορές χαμηλότερα. Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι πάνω από 70 γονίδια που σχετίζονται με διάφορες πτυχές του βακτηριακού μεταβολισμού, συμπεριλαμβανομένων συμπαραγόντων βιοσύνθεσης πηγών άνθρακα και κεντρικών μεσολαβητών στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων επιδεικνύουν εντυπωσιακή διαφορά όσον αφορά στο προφίλ της έκφρασής τους σε σύγκριση με την έκφραση των γονιδίων αυτών σε συνθήκες κολυμβητικής κινητικότητας. Για παράδειγμα, αρκετά γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την πρόσληψη της γλυκόζης ρυθμίζονται αρνητικά, ενώ γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στην αναγωγή των νιτρωδών ιόντων ρυθμίζονται θετικά σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη



Εικόνα 19: ομαδική κινητικότητα σε στέλεχος αγρίου τύπου *P.aeruginosa* PAO1, σε μεταλλαγμένο στέλεχος *lasB* και του μεταλλαγμένου στελέχους το οποίο εκφράζει χρωμοσωμικά το γονίδιο *lasB* (Overhage, et al., 2008)

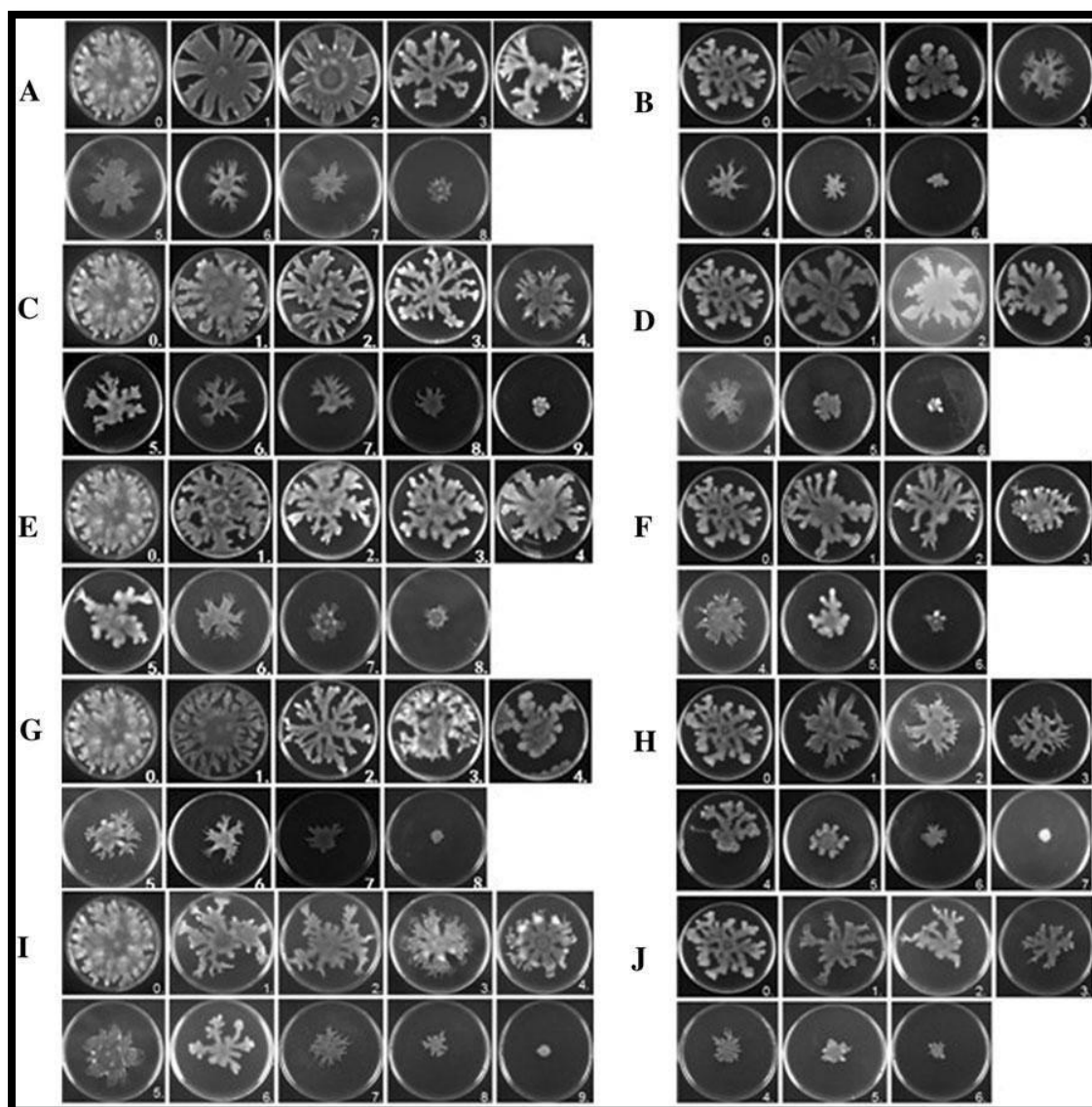
ρύθμιση της μεταγραφής, ρυθμίζονται διαφορετικά σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας, υποδεικνύοντας ότι έναν περίπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο εμπλέκεται στην ομαδική κινητικότητα. Στα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνονται αρκετά γονίδια που φαίνεται να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της μολυσματικότητας όπως είναι 2 ρυθμιστικά γονίδια του συστήματος QS *lasR* και *rhIR* των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται 2 και 6 φορές αντίστοιχα. Το γονίδιο *lasB* που είναι ένα γονίδιο που σχετίζεται με τη μολυσματικότητα φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαδική κινητικότητα. Σε τέσσερα ανεξάρτητα μεταλλάγματα που έχουν προκύψει από ένθεση τρανσποζονίου, έδειξαν φανερά επηρεασμένο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε σχέση με τα στελέχη

αγρίου τύπου. Επιπλέον και τα τέσσερα μεταλλάγματα *lasB* έδειξαν βλάβες ως προς τον σχηματισμό βιοφίλμ, ενώ ο φαινότυπος της ομαδικής κινητικότητας μπορεί να αποκατασταθεί μέσω της έκφρασης του χρωμοσωμικά ενσωματωμένου γονιδίου *lasB*⁺.

Το προϊόν του γονιδίου *pvdQ*, επιπρόσθετα της συμμετοχής του στην βιοσύνθεση της πυοβερντίνης (Lamont, et al., 2003), η *PvdQ* επιδεικνύει και ενεργότητα ακυλάσης των λακτονών της ομοσερίνης και επίσης αποικοδομεί το μόριο μήνυμα-σινιάλο του συστήματος QS 3-oxododecanoyl-HSL μεταξύ των άλλων λακτονών της ομοσερίνης μακράς αλυσίδας (Huang, et al., 2003). Η έκφραση του γονιδίου *pvdQ* ρυθμίζεται θετικά σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας και τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται μέχρι και 3 φορές. Μεταλλαγμένο στέλεχος της *Pseudomonas aeruginosa* PA14 στο γονίδιο *pvdQ* έδειξε

κατά 75% μειωμένη ικανότητα ομαδικής κινητικότητας σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου, ενώ επιδεικνύει φυσιολογική κολυμβητική και twitching κινητικότητα και φυσιολογικό σχηματισμό βιοφίλμ.

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα της *Salmonella enteric serovar Typhimurium* επιδεικνύουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά (Kim, et al., 2003). Κύτταρα της *Pseudomonas aeruginosa* που αναπτύχθηκαν σε άγαρ κατάλληλο για ομαδική κινητικότητα που συμπληρώθηκε με 0,5% καζαμινοξέα έδειξαν από 4 έως 16 φορές αυξημένη ανθεκτικότητα ως προς τα αντιβιοτικά πολυμυξίνη Β, gentamicin και ciprofloxacin σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό συγκέντρωσης άγαρ 0,3%. (Overhage, et al., 2008). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αυξημένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά δεν είναι κατανοητοί σε μεγάλο βαθμό. Η τροποποιημένη έκφραση της ATP-εξαρτώμενης πρωτεΐσης Lon, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ciprofloxacin (Brazas, et al., 2007) ενώ η μειωμένη έκφραση συγκεκριμένων στοιχείων της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και κάποιων συγκεκριμένων πορινών, η αυξημένη έκφραση κάποιων αντλιών εκροής (Aendekerk, et al., 2005) και η διαφορική έκφραση κάποιων γονιδίων που σχετίζονται με τους λιποπολυσακχαρίτες μπορεί να επηρεάζουν την ανθεκτικότητα. Οι Wang et al (2011) κατέληξαν στο ότι το γονίδιο *pvdQ* μπορεί να μεταβάλλει τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης στην *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ενδεχομένως μέσω της θετικής ρύθμισης του οπερονίου που σχετίζεται με την παραγωγή λιποπολυσακχαριτών και μέσω της θετικής ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των πορινών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο σίδηρος εμπλέκεται στην αλλαγή της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων. Ο σίδηρος είναι ένα θρεπτικό στοιχείο με ρόλο-κλειδί για την *P.aeruginosa* η οποία παράγει σιδηροφόρα και έχει την ικανότητα να απορροφά τον σίδηρο μέσω της έκφρασης στην εξωτερική μεμβράνη των *TonB*-εξαρτώμενων υποδοχέων. (Cornellis, 2010). Το γονίδιο *PvdQ* μπορεί να τροποποιεί την έκφραση των *TonB*-εξαρτώμενων υποδοχέων μεταβάλλοντας έτσι τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η απώλεια της εξωτερικής μεμβράνης, πολλαπλά συστήματα εκροής, η παραγωγή διάφορων ενζύμων και οι στοχευμένες μεταλλάξεις παίζουν ρόλο στην ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά στην *P.aeruginosa* (Hirsch, et al., 2010). Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη συμπεριλαμβανομένων των *OprF, OprG, OprD, OprP, OprC* και *OmpF*, και η ανθεκτικότητα της *P.aeruginosa* οφείλεται στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *OprF* και *OprD*. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος της *P.aeruginosa* PAO1pMEpvdQ επηρεάζεται η έκφραση των γονιδίων *oprF* και *oprD* με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και κατ' επέκταση και η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Wang, et al., 2011).

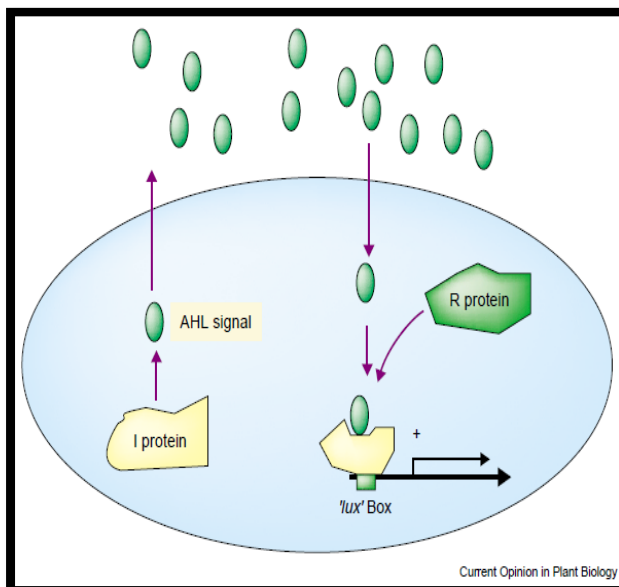


Εικόνα 20: Κύτταρα με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας της *P.aeruginosa* PAO1 και του μεταλλαγμένου στελέχους PAO1pMEpvdQ που υπερεκφράζει το γονίδιο *pvdQ* παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Κύτταρα της PAO1 και του μεταλλαγμένου στελέχους PAO1pMEpvdQ εμβολιάστηκαν σε τρυβλιά με άγαρ που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), meropenem (MER), polymyxin B (PB) και gentamicin (GEN). Η ανάπτυξη των αποικιών καταγράφηκε μετρώντας τη διάμετρο της αποικίας 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό στους 37°C. (a)CAZ PAO1pMEpvdQ, (b)CAZ PAO1,(c)CIP PAO1pMEpvdQ,(d) CIP PAO1,(e) MER PAO1pMEpvdQ,(f)MER PAO1,(g)PB PAO1pMEpvdQ, (h)PB PAO1, (i) GEN PAO1pMEpvdQ και (j) GEN PAO1 (Wang, et al., 2011).

1.12 Ομαδική κινητικότητα και σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού.

Οι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι σε θέση να συντονίζουν την έκφραση ορισμένων χαρακτηριστικών τους μέσω ενός συστήματος που εξαρτάται από την πυκνότητα των κυττάρων, ένα σύστημα που είναι γνωστό ως «σύστημα αίσθησης πυκνότητας πληθυσμού» (quorum sensing). (Loh, et al., 2002; Von Bodman, et al., 2003). τα βακτήρια που χρησιμοποιούν το σύστημα QS μπορούν να αξιολογήσουν την τοπική πυκνότητα του πληθυσμού ανιχνεύοντας διαχεόμενα μόρια-σινιάλα, των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται αυξανόμενης της τοπικής πυκνότητας του πληθυσμού, με αποτέλεσμα την συντονισμένη γονιδιακή έκφραση. Τα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια

χρησιμοποιούν ως «διακυτταρικά μόρια επικοινωνίας» της λακτόνης της ομοσερίνης (acyl-homoserine lactones-AHLs). Σε πολλά παθογόνα βακτήρια, τα αυξημένα επίπεδα των AHLs οδηγούν στην έκφραση μολυσματικών παραγόντων και δευτερογενών μεταβολιτών που διευκολύνουν τον επιτυχημένο αποικισμό του ξενιστή (Quinones, et al., 2005). Οι δομές των μορίων αυτών είναι πολύ συντηρημένες και αποτελούνται από ένα δακτύλιο λακτόνης ομοσερίνης ενωμένο με μια ακυλιωμένη πλευρική αλυσίδα. Η αμφιπαθητικότητα των μορίων AHLs οφείλεται στην υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και στον υδρόφιλο δακτύλιο λακτόνης και το χαρακτηριστικό αυτό πιθανόν επιτρέπει στα μόρια αυτά να διασχίζουν την φωσφολιπιδιακή διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και να βρίσκονται εντός και εκτός κυττάρου. Τα μόρια AHLs ποικίλουν ανάλογα με το μήκος των N-άκυλο-αλυσίδων (4-14 άνθρακες) και οι αλυσίδες είναι είτε κορεσμένες είτε ακόρεστες, ενώ επιπλέον η N-άκυλο-αλυσίδα περιέχει είτε μια υδρόξυ- είτε μια οξο-ομάδα στο τρίτο άτομο άνθρακα. Το μήκος της πλευρικής αλυσίδας και η χημική τροποποίηση στο τρίτο άτομο άνθρακα παρέχει την εξειδίκευση των μορίων σινιάλων. Τα περισσότερα AHLs πιστεύεται ότι διαχέονται κατά μήκος του κυτταρικού τοιχώματος με εξαίρεση τα AHLs με μακριές αλυσίδες (το C₁₂-AHL



Εικόνα 21: απλουστευμένο σχήμα που απεικονίζει τα χαρακτηριστικά του βασικού μοντέλου QS μέσω πρωτεϊνών I και R. Τα βακτηριακά κύτταρα περιέχουν μια πρωτεΐνη I που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση ελεύθερα διαχεόμενων σινιάλων (πράσινες σφαίρες). Σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα το σινιάλο συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη R και η αλληλεπίδραση αυτή επάγει μια αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης R, η οποία μεταβάλλει τη συγγενειά της για τις ειδικές αλληλουχίες DNA, γνωστές ως «lux boxes», που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων που ελέγχονται μέσω των AHLs (Loh, et al., 2002)

που παράγεται από την *P.aeruginosa*) που χρησιμοποιούν μια αντλία εκροής για τη μεταφορά. Το βασικό μοντέλο γονιδιακής ρύθμισης μέσω μορίων AHL περιλαμβάνει ένα μεταγραφικό ρυθμιστή (μια πρωτεΐνη R) και μια συνθάση για τις AHL (πρωτεΐνη I). Η πρωτεΐνη R μπορεί να αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες στους υποκινητές γονιδίων και να επάγει τη γονιδιακή έκφραση μόνο όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μόριο-σινιάλο AHL. Η συνθάση του AHL εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα όταν η κυτταρική πυκνότητα είναι χαμηλή με αποτέλεσμα η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της AHL να μην επαρκεί για να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη R. Καθώς ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνει, τα μόρια AHLs συσσωρεύονται, μέχρι η επαρκής συγκέντρωση των μορίων AHLs να εξασφαλίσει ότι μερικά από αυτά θα

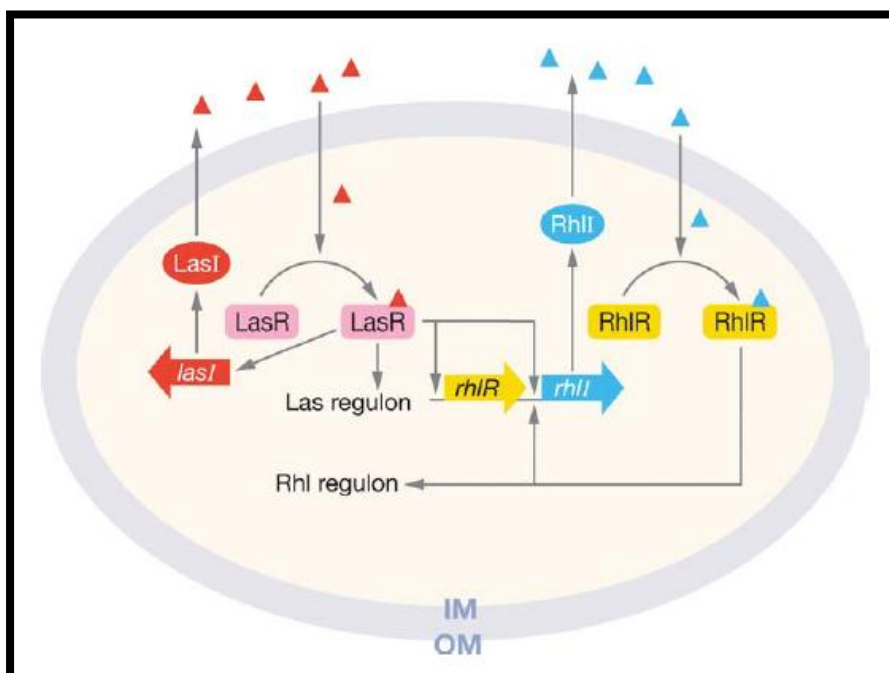
δεσμευτούν στην πρωτεΐνη R με τελικό αποτέλεσμα τη δέσμευση του συμπλόκου στις ειδικές αλληλουχίες-υποκινητών των γονιδίων στόχων. Υπάρχουν δυο κατηγορίες μεταγραφικών ρυθμιστών (πρωτεΐνες R) : η μια απαιτεί ένα σινιάλο AHL για να δεσμευτεί στο DNA, ενώ η δεύτερη δεσμεύεται στο DNA μόνο απουσία του σινιάλου. Οι πρωτεΐνες I είναι υπεύθυνες για την σύνθεση των AHLs. Έχουν βρεθεί πολλές κατηγορίες συνθασών των AHLs και η πρώτη (τύπου LuxI) χρησιμοποιεί τους κυτταρικούς μεταβολίτες όπως είναι η S-

αδένοσυλμεθειονίνη (S-adenosyl-methionine-SAM) και ειδικές κυτταρικές ακυλιωμένες πρωτεΐνες φορείς (acylated acyl carrier proteins-ACPs) για τον σχηματισμό AHLs και η δεύτερη κατηγορία (LuxLM) χρησιμοποιεί SAM με ακυλιωμένα ACPs ή ακυλο-συνένζυμο ως υπόστρωμα.

Στην *P.aeruginosa* η μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα και με την ικανότητα αποκισμού ελέγχονται από 2 συστήματα QS που εξαρτώνται από λακτόνες της ομοσερίνης που ονομάζονται *LasI/R* και *RhlI/R* (Smith, et al., 2003). Στο σύστημα *LasI/R* , το γονίδιο *lasI* ρυθμίζει τη σύνθεση της N-(3-οξο-δωδεκανούλ)-λακτόνης της ομοσερίνης, η οποία δεσμεύεται και ενεργοποιεί τον συγγενή ρυθμιστή *LasR* με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου. Στο σύστημα *RhlI/R* , το γονίδιο *rhlI* ρυθμίζει τη σύνθεση της N-(βουτανούλ)-λακτόνης της ομοσερίνης, η οποία αλληλεπιδρά με τον συγγενή ρυθμιστή *RhIR* επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που εμπλέκονται στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών όπως είναι τα ραμνολιπίδια που είναι απαραίτητα για την ομαδική κινητικότητα. Στον άγριο τύπο της *P.aeruginosa* και τα δύο αυτά συστήματα είναι λειτουργικά , τα μεταλλάγματα *rhl* δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας ενώ τα μεταλλάγματα *las* έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας σε μικρότερο βαθμό βέβαια συγκρινόμενα με τα στελέχη αγρίου τύπου (Venturi, et al., 2010).

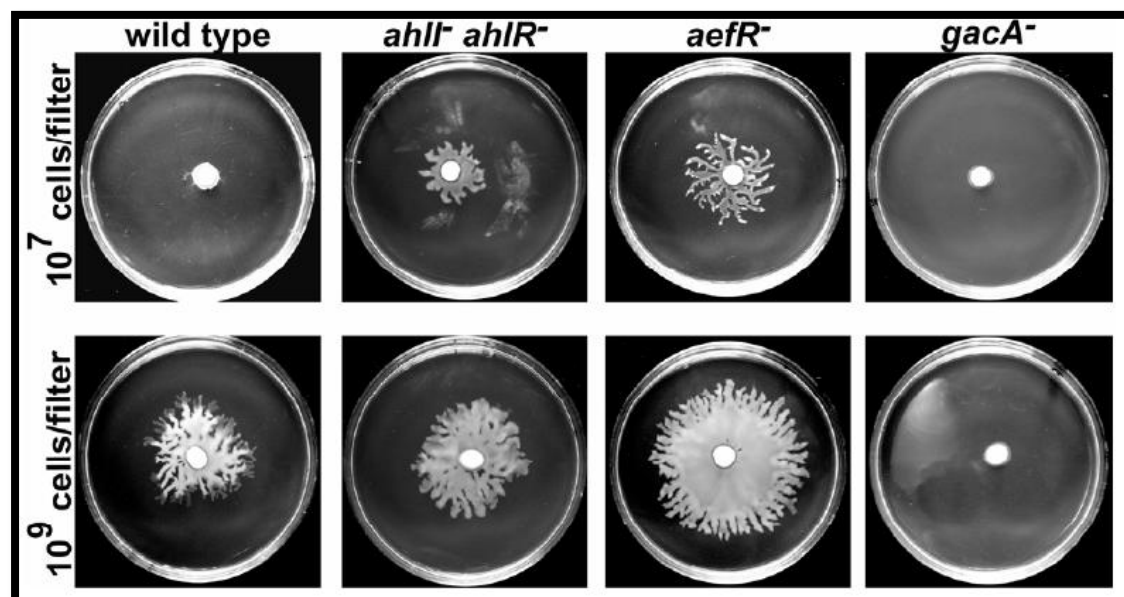
Η *Pseudomonas syringae* χρησιμοποιεί ως μόριο σινιάλο του QS συστήματος την 3-(οξο-εξανούλ)-λακτόνη της ομοσερίνης και απαιτεί την έκφραση του γονιδίου της συνθάσης της AHL(*ahII*)και του ρυθμιστικού γονιδίου της AHL(*ahIR*) (Quinones, et al., 2004). Παρουσία πρόδρομων κυτταρικών ενώσεων, η *AhII* καταλύει την παραγωγή 3-οξο-C₆HSL. Η *AhIR* σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το AHL-μόριο σινιάλο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *ahII* μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρομης ενεργοποίησης που οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων μορίων AHLs καθώς αυξάνεται η πυκνότητα των

κυττάρων. Το σύστημα *AhII/AhIR* υπόκεινται σε ρύθμιση από άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Quinones, et al., 2004).



Εικόνα 22: απεικόνιση του συστήματος QS στην *Pseudomonas aeruginosa*. Ο αυτοεπαγωγέας *LasI* σημειώνεται με κόκκινα τρίγωνα και ο αυτοεπαγωγέας *rhlI* σημειώνεται με μπλέ τρίγωνα . OM: εξωτερική μεμβράνη, IM:εσωτερική μεμβράνη (Waters, et al., 2005).

Με βάση προηγούμενες έρευνες βρέθηκε ότι ο παράγοντας *AefR* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του συστήματος QS στην *P.syringae* (Quinones, et al., 2004). Ο παράγοντας *AefR* είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή του γονιδίου *ahII*, και κατά συνέπεια είναι απαραίτητος για τα μέγιστα επίπεδα παράγωγης AHLs. Ένας άλλος ρυθμιστής, ο *GacA*, έχει παρόμοια αποτελέσματα στη διαδικασία της αυτοεπαγωγής και πιστεύεται ότι τόσο ο *AefR* όσο και ο *GacA* δρουν ως ενεργοποιητές του *AhII/AhIR* συστήματος QS μέσω ανεξάρτητων μονοπατιών (Quinones, et al., 2004). Αν και σχετικά πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διαταραχή του γονιδίου *ahII* οδηγεί στην τροποποίηση της μορφολογίας των αποικιών της *P.syringae* σε στερεό άγαρ (Kinscherf, et al., 1999), δεν αναφέρθηκε ότι το σύστημα QS έχει επίδραση στην παραγωγή μολυσματικών παραγόντων όπως είναι οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες και η φυτοτοξίνη συριγκομυκίνη. Επιπλέον, ένα *ahII* μετάλλαγμα, αναφέρθηκε ότι διατηρεί την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και της μολυσματικότητας σε φύλλα φασολιού, χαρακτηριστικά τα οποία ρυθμίζονται θετικά μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολοβείται από μόρια AHLs σε άλλα βακτήρια. Οι Quinones et al. (2005) έδειξαν τα μεταλλαγμένα στελέχη της *P.syringae* B728a *aefR* και *ahII/ahIR* παρουσιάζουν πιο έντομο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε σύγκριση με τα στελέχη αγρίου τύπου.



Εικόνα 23: Η ομαδική κινητικότητα ενισχύεται μεταλλαγμένα στελέχη της *P.syringae* που είναι ελαττωματικά ως προς την παραγωγή AHLs (Quinones, et al., 2005)

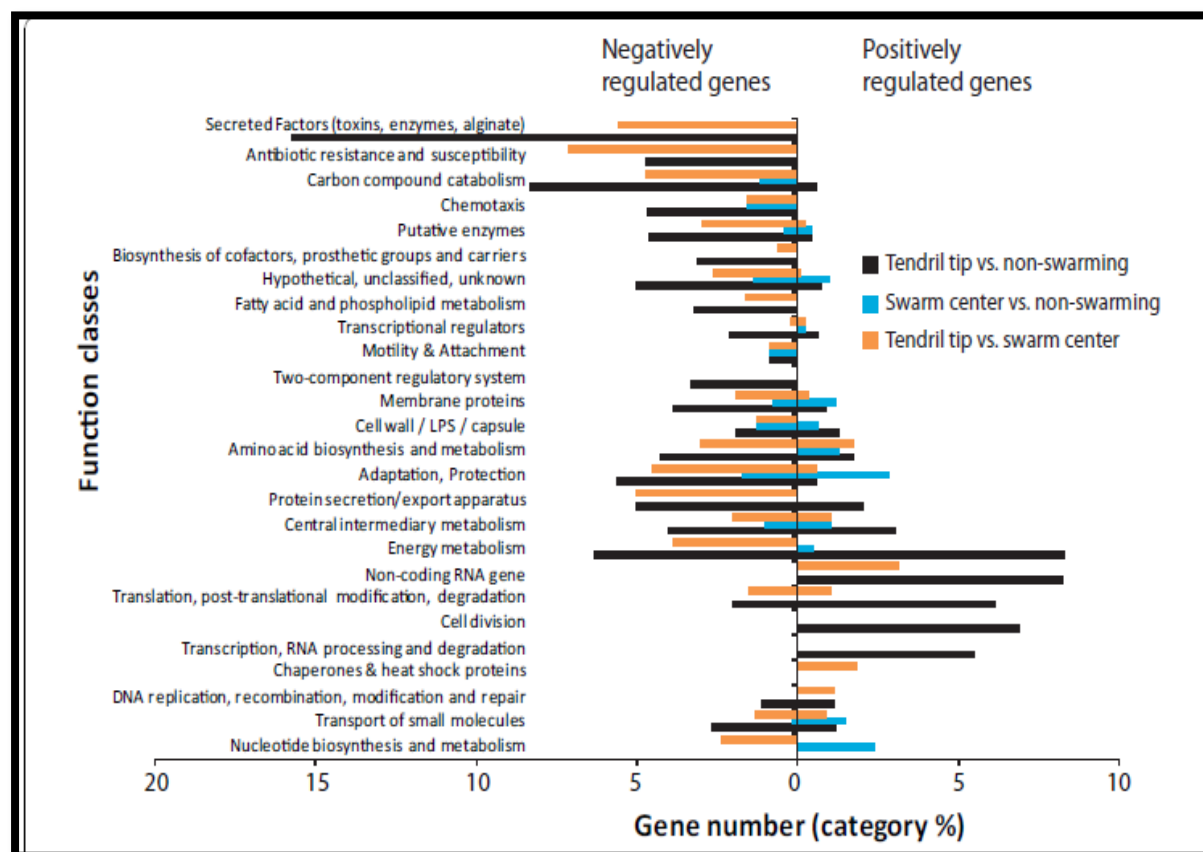
1.13 Γονίδια που επάγονται ή/και καταστέλλονται κατά την ομαδική κινητικότητα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι Overhage et al. (2008) παρουσίασαν μια μελέτη που έγινε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, στην οποία ένας πληθυσμός κυττάρων της *P.aeruginosa* με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, που συλλέχθηκε από το άκρο της αναπτυσσόμενης αποικίας συγκρίθηκε ως προς τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με έναν βακτηριακό πληθυσμό που αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα κύτταρα που βρίσκονταν στο άκρο της ομαδικά κινούμενης αποικίας παρουσιάζουν θετική ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στη μολυσματικότητα (γονίδια εκκριτικού συστήματος τύπου III, εξωκυτταρικές πρωτεάσες και

μεταφορείς σιδήρου) συγκρινόμενα με τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο.

Εκτός από την *P.aeruginosa*, άλλα βακτήρια στα οποία έχει μελετηθεί το επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων τους κατά τη διάρκεια της ομαδικής κινητικότητας είναι η *Salmonella typhimurium* (Wang, et al., 2006a), στο *Sinorhizobium meliloti* (Nogales, et al., 2010), στον *Proteus mirabilis* (Pearson, et al., 2010) και στην *P.fluorescens Pf0-1* (Mastroaolo, et al., 2012). Με βάση τα πειράματα των Wang et al. (2006a) επισημάνθηκε διαφορετική έκφραση γονιδίων που είναι ειδικά για την ομαδική κινητικότητα στην *Salmonella* και οι ερευνητές επισήμαναν επίσης ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το εκκριτικό σύστημα τύπου III, με τη σύνθεση λιποπολυσακχαριτών και με το μεταβολισμό του σιδήρου είναι ειδική ως προς την επιφάνεια και δεν σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας. Πολύ πρόσφατα, οι Nogales et al. (2010) μελετώντας το μεταγράφημα του *S.meliloti* κατέληξαν στο ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των σιδηροφόρων υπόκεινται σε θετική ρύθμιση κατά την ομαδική κινητικότητα. Οι Tremblay και Diezel (2010) με στόχο να κατανοήσουν την πολυπλοκότητα της ομαδικής κινητικότητας και της διαφορετικής ρύθμισης των γονιδίων στη *P.aeruginosa* μελέτησαν με τη χρήση μικροσυστοιχιών το προφίλ έκφρασης των γονιδίων βακτηριών που βρίσκονταν στο άκρο των δενδριτών και βακτηριών που βρίσκονταν στο κέντρο της αποικίας, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες βακτήρια που αναπτύσσονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά ότι τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με στόχο να παρεμποδιστεί η ομαδική κινητικότητα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τρία ανεξάρτητα πειράματα για κάθε μια από τις 3 διαφορετικές συνθήκες (κέντρο αποικίας, άκρο δενδριτών, κύτταρα από αποικία χωρίς ικανότητα ομαδικής κινητικότητας) αποκάλυψε ένα σύνολο 378 διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων και η διαφορετική έκφραση αποκαλύφθηκε συγκρίνοντας κάθε μια από τις διαφορετικές συνθήκες με τις υπόλοιπες. Η κατά ζεύγη σύγκριση των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων έδειξε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων παρατηρείται όταν συγκρίνεται το προφίλ της έκφρασης μεταξύ κυττάρων από το άκρο των δενδριτών με κύτταρα από αποικία χωρίς ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, ακολούθως όταν συγκρίνεται το προφίλ έκφρασης των γονιδίων από κύτταρα που βρίσκονται στο άκρο των δενδριτών με κύτταρα από το κέντρο της αποικίας με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και τέλος όταν συγκρίνεται το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων από κύτταρα στο κέντρο της αποικίας με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας με κύτταρα από αποικία που δεν έχει ικανότητα ομαδικής κινητικότητας. Η πιο εντυπωσιακή πτυχή των αποτελεσμάτων που προέκυψε με βάση τα πειράματα των Tremblay και Diezel είναι το γεγονός ότι μια σημαντική πλειοψηφία των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά, υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση στους πληθυσμούς που βρίσκονται στο άκρο των αναπτυσσόμενων δενδριτών σε σχέση με τους πληθυσμούς των κυττάρων που δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και με τους πληθυσμούς που βρίσκονται στο κέντρο της αποικίας και επιπλέον υπάρχουν λιγότερα γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά όταν συγκρίνονται πληθυσμοί κυττάρων από το κέντρο της αποικίας με ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και πληθυσμοί κυττάρων που δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας. Τα αποτελέσματα αυτά, προτείνουν ότι τα κύτταρα των που βρίσκονται στο κέντρο των αποικιών που κινούνται ομαδικά μοιάζουν πιο πολύ ως προς το μεταβολικό τους προφίλ με τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε non-swarming συνθήκες παρά με αυτά που εντοπίζονται

στην άκρη των δενδριτών. Με βάση την έρευνα των Winsor et al. (2009) αποδείχθηκε ότι πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενους παράγοντες (τοξίνες, ένζυμα, άλατα αλγινικών οξέων) και για στοιχεία που εμπλέκονται στον καταβολισμό των πηγών του άνθρακα υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση στο άκρο των δενδριτών, ενώ από την άλλη πλευρά τα γονίδια που εμπλέκονται στη μεταγραφή, στη μετα-μεταγραφική τροποποίηση, γονίδια που κωδικοποιούν για RNA και γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση υπόκεινται σε θετική ρύθμιση στο άκρο των δενδριτών.



Εικόνα 24: Η διαφορετική έκφραση λειτουργικών ομάδων γονιδίων στο γένος *Pseudomonas* (Winsor, et al., 2009)

Μεταξύ των γονιδίων που υπόκεινται σε θετική ρύθμιση στο άκρο των δενδριτών συμπεριλαμβάνεται και ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που ανήκουν στη «λειτουργική ομάδα» του μεταβολισμού της ενέργειας. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων συμπεριλαμβάνουν πολλά κυτοχρώματα και υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης που εμπλέκονται στην παραγωγή ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε θετική ρύθμιση υπόκειται και το σύμπλεγμα των γονιδίων *atrIBEFHAGFC* που κωδικοποιεί για την παραγωγή της ATP συνθάσης στην *P.aeruginosa* (Tremblay, et al., 2010). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα γρήγορα ομαδικά κινούμενα κύτταρα που βρίσκονται στα άκρα των δενδριτών έχουν μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχουν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας και σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο αποικιών που κινούνται ομαδικά. Σε θετική ρύθμιση υπόκεινται και πολλές ριβοσωμικές πρωτεΐνες σε κύτταρα που βρίσκονται στο άκρο των αναπτυσσομένων δενδριτών., οι οποίες βοηθούν στη συγκρότηση και στην αύξηση της σταθερότητας του rRNA χωρίς να απαιτούν ATP για τη δράση τους (Semrad, et al., 2004). Η σύνθεση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και του rRNA υπόκεινται σε αυστηρή συνεργατική

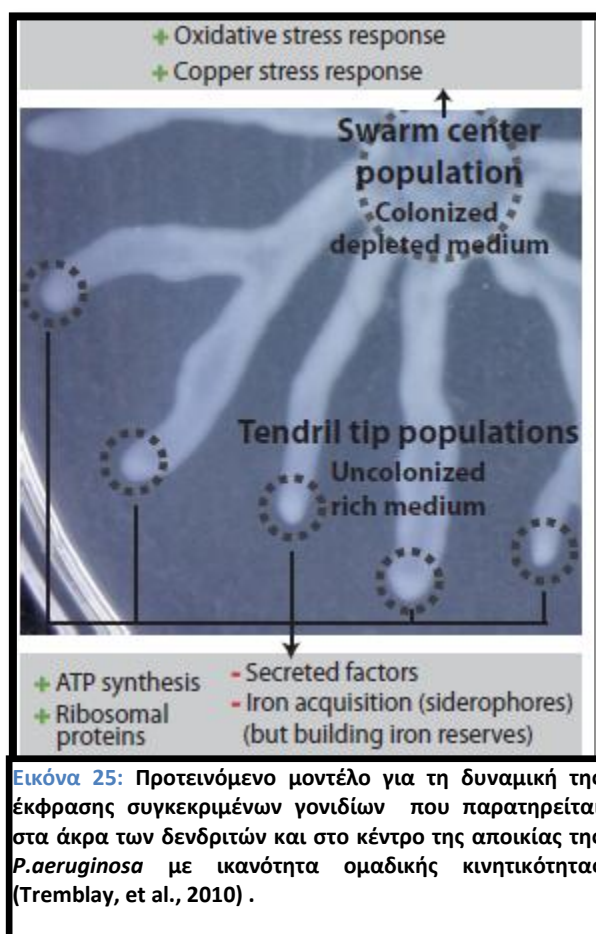
ρύθμιση και η παραγωγή τους δεν υπερβαίνει ποτέ ένα συγκεκριμένο όριο (Snyder, et al., 1997). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη θετική ρύθμιση πολλών tRNA γονιδίων στα κύτταρα στην άκρη των αναπτυσσόμενων δενδριτών, αποδεικνύει ότι τα κύτταρα αυτά επιδεικνύουν αυξημένη πρωτεινοσύνθεση.

Μια άλλη ομάδα γονιδίων που υπερεκφράζονται στην άκρη των αναπτυσσόμενων δενδριτών εμπλέκονται στη μεταφορά μικρών μορίων. Μεταξύ των γονιδίων αυτών είναι και το γονίδιο *bfrB* το οποίο κωδικοποιεί για μια βακτηριοφεριτίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ελεγχόμενη αποθήκευση (Andrews, et al., 2003) και απελευθέρωση του σιδήρου και λειτουργεί ως ρυθμιστής σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης ή έλλειψης σιδήρου (Chasteen, 1998). Επαγωγή της έκφρασης σε πληθυσμούς κυττάρων που βρίσκονται στο άκρο των αποικιών που κινούνται ομαδικά παρατηρείται και για τους συμμεταφορείς της προλίνης και του γλουταμινικού. Στα βακτήρια το γλουταμινικό λειτουργεί ως δότης της αμινομάδας για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων και μπορεί επίσης να λειτουργήσει και ως πηγή άνθρακα και αζώτου σε συνθήκες έλλειψης αζώτου. Σε πολλά βακτήρια, η προλίνη δρα προστατευτικά απέναντι στην οσμωτική πίεση όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε συνθήκες οσμωτικού στρες (Wood, 1988).

Μεταξύ των γονιδίων που υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση σε πληθυσμούς κυττάρων που βρίσκονται στο άκρο των αναπτυσσόμενων δενδριτών οπερόνιο *coxBAC-coll* το οποίο κωδικοποιεί για την α_3 οξειδάση του κυτοχρώματος c (Kawakami, et al., 2009). Η έκφραση του οπερονίου αυτού ρυθμίζεται θετικά στη στατική φάση ανάπτυξης και ειδικά σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών: η έλλειψη πηγών άνθρακα, αζώτου και σιδήρου επάγουν τη μεταγραφή του *cox* επαγωγέα (Kawakami, et al., 2009). Ο παράγοντας σ *RpoS* είναι θετικός ρυθμιστής του οπερονίου *cox* (Schuster, et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με το μοντέλο που προτείνει ότι τα βακτήρια που βρίσκονται στο άκρο μια αποικίας που κινείται ομαδικά είναι πολύ ενεργά και αναπτύσσονται σε συνθήκες «υπερπληρότητας» θρεπτικών. Το οπερόνιο *raq(raqDABCE)* πυρρολοκινολίνο κινόνη (pyrroloquinoline quinone-PQQ) ρυθμίζεται επίσης αρνητικά στην άκρη των αναπτυσσόμενων δενδριτών. Η PQQ είναι ένα από τα παράγωγα των κινονών που λειτουργεί ως ουσιώδης συμπάραγοντας για μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται κινόπρωτεΐνες (quinoproteins) (Rucker, et al., 2009; Matsushita, et al., 2002). Ο λόγος για τον οποίο το οπερόνιο αυτό υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση βρίσκεται ακόμα σε θεωρητικό επίπεδο αν και πιθανά οφείλεται στο ότι ο υψηλός βαθμός αναπνοής και ο υψηλός βαθμός κατανάλωσης ενέργειας στο άκρο των δενδριτών μπορεί να αντανακλά σε ένα βαθμό σε μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου καθώς και σε αλλαγές στο μονοπάτι της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης. Μια άλλη ομάδα γονιδίων που υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση είναι τα γονίδια που σχετίζονται με χημειοτακτικές λειτουργίες ενώ παράλληλα πολλά γονίδια που σχετίζονται με μολυσματικούς και συγκεκριμένα με εκκριτικούς παράγοντες υπόκεινται επίσης σε αρνητική ρύθμιση (Tremblay, et al., 2010) σε κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο της αποικίας που κινείται ομαδικά. Προηγούμενες μελέτες, είχαν επισημάνει ότι τα κύτταρα της *P.aeruginosa* σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας αυξάνουν την έκφραση πολλών μολυσματικών παραγόντων σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας (Lyczak, et al., 2000).

Τέλος, γονίδια που κωδικοποιούν για τις καταλάσες επάγονται σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας. Η *P.aeruginosa* κωδικοποιεί για τρεις διαφορετικές καταλάσες: η *KatA* είναι

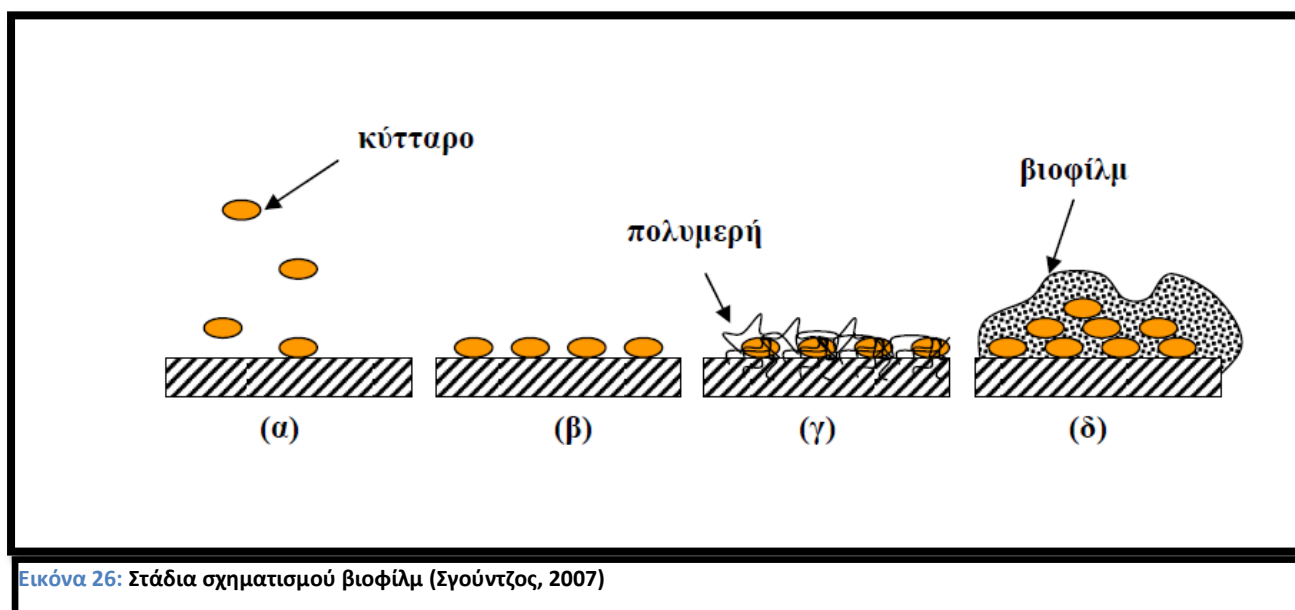
η κυρίαρχη καταλάση και εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης (Hassett, et al., 2000), η *KatB* μετά από επαγωγή από υπεροξείδιο (Ochsner, et al., 2000) ενώ η *KatE* επάγεται από υψηλές θερμοκρασίες (Mossialos, et al., 2006). Τα γονίδια *KatA* και *KatB* επάγονται στο κέντρο της αποικίας που κινείται ομαδικά σε σχέση με τις non-swarming συνθήκες, ενώ αντίθετα το γονίδιο *KatE* ρυθμίζεται αρνητικά στο άκρο των αναπτυσσόμενων δενδριτών (Tremblay, et al., 2010). Τα γονίδια *KatA* και *KatB* επάγονται από την έκθεση σε H_2O_2 (Salunkhe, et al., 2005), γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη αυτού του είδους στρες στο κέντρο της αποικίας που κινείται ομαδικά. Πολλά γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση σε συνθήκες έλλειψης χαλκού υπόκεινται σε θετική ρύθμιση στο κέντρο της ομαδικά κινούμενης αποικίας (Teizel, et al., 2006). Καθώς ο χαλκός είναι ένα σημαντικό στοιχείο του μεταβολισμού, ο Cu^{2+} συσσωρεύεται στη μήτρα των βιοφίλμ και είναι τοξικός σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Harrisson, et al., 2005), γεγονός που μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την απόκριση απέναντι στο στρες που δημιουργείται από το χαλκό στο κέντρο της αποικίας που κινείται ομαδικά. Επίσης, τόσο η περμεάση του γλουκονικού όσο και ο μεταφορέας της γλυκόζης ABC που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *gltKGF* (Adewoye, et al., 2000) υπόκεινται σε θετική ρύθμιση στο κέντρο της ομαδικά κινούμενης αποικίας. , γεγονός που πιθανά οφείλεται στο ότι τα κύτταρα στο κέντρο της αποικίας αναπτύσσονται σε ένα περιβάλλον με μικρή διαθεσιμότητα γλυκόζης και τα συστήματα αυτά είναι απαραίτητα για την πιο αποτελεσματική απόκτηση πηγών άνθρακα.



1.14 Ομαδική κινητικότητα και βιοφίλμ.

Τα βιοφίλμ αποτελούνται από μια κοινωνία μικροβιακών κυττάρων που είναι προσαρτημένα σε μια στερεή επιφάνεια και συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω ενός ινώδους δικτύου εξκυτταρικών πολυμερικών ενώσεων. Κατά τη διάρκεια των δυο τελευταίων δεκαετιών τα βιοφίλμ έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλά δομημένα συστήματα τα οποία βρίσκονται σε οποιαδήποτε διεπιφάνεια αρκεί αυτή να εκτίθεται για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα στο νερό. Τα βιοφίλμ βρίσκονται σχεδόν παντού, όπως στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, στις πέτρες και τα βράχια σε θάλασσες και ποτάμια, σε δεξαμενές αποθήκευσης νερού, στο δίκτυο των σωλήνων ύδρευσης, σε ιατρικά εργαλεία, σε δοχεία επεξεργασίας τροφίμων και φυσικά στο υπέδαφος. Ο αρχικός σχηματισμός του βιοφίλμ μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τα 4 παρακάτω στάδια σύμφωνα με τους Gantzer et al.(1989):

- Μεταφορά των κυττάρων στην ελεύθερη στερεή επιφάνεια
- Αρχική προσρόφηση των κυττάρων στο στερεό υπόστρωμα με τη βοήθεια φυσικοχημικών δυνάμεων,
- Προσκόλληση των κυττάρων στη στερεή επιφάνεια με ταυτόχρονη παραγωγή πολυμερών που συγκρατούν τα κύτταρα στο υπόστρωμα και
- Πολλαπλασιασμός των κυττάρων και σχηματισμός του βιοφίλμ.



Εικόνα 26: Στάδια σχηματισμού βιοφίλμ (Σγούντζος, 2007)

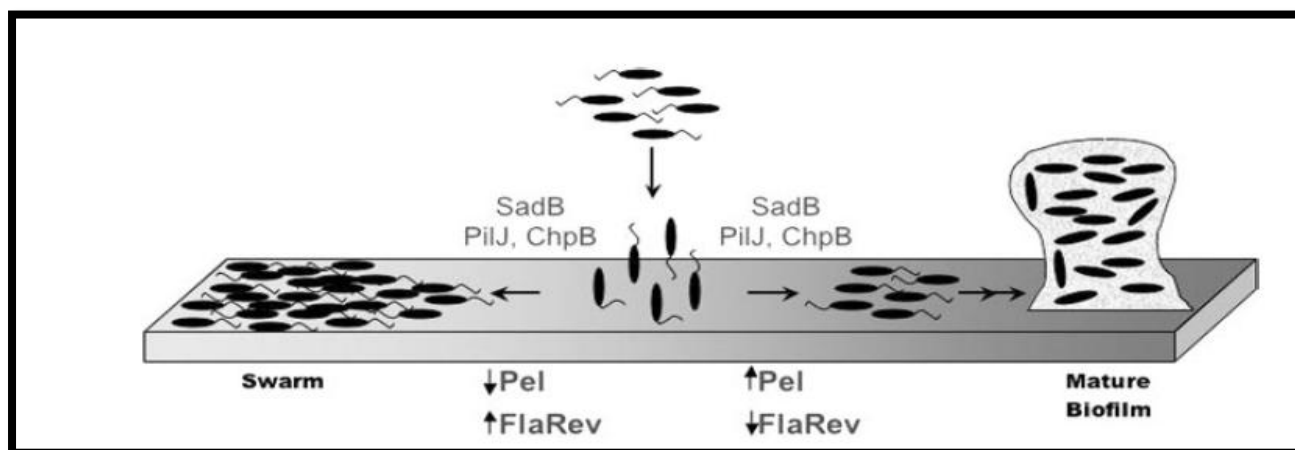
Η *P.aeruginosa* αποτελεί έναν οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης των βιοφίλμ στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εν τούτοις λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στις αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια που χαρακτηρίζουν τα αρχικά στάδια του σχηματισμού του βιοφίλμ. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις (Tremoulet, et al., 2002; Fux, et al., 2003; Davies, 1998; Pankhurst, et al., 1998) και γενετικές αναλύσεις (Doyle, 2006) αποκάλυψαν δύο διαδοχικά γεγονότα που οδηγούν σε σταθερές αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια. Αρχικά ένας βακτηριακός κυτταρικός πόλος έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως «αντιστρεπτή προσκόλληση», η οποία είναι μια ασταθής αλληλεπίδραση, καθώς τα «αντιστρεπτά προσκολλημένα» βακτήρια μπορούν να επιστρέψουν στην πλαγκτονική μορφή διαβίωσης

εύκολα και γρήγορα. Το δεύτερο γεγονός, είναι μια μετάβαση από την πολική σχέση σε μια σχέση που διαμεσολαβείται από τον μακρύ άξονα του κυτταρικού σώματος, που αναφέρεται ως «μη αντιστρεπτή προσκόλληση». Στην *P.aeruginosa*, η μόνη μεταλλαγή που μπλοκάρει την μετάβαση από την «αντιστρεπτή» στην «μη αντιστρεπτή» προσκόλληση είναι αυτή στο γονίδιο *sadB* (Doyle, 2006).

Ένα ακόμη στοιχείο κλειδί στο σχηματισμό του βιοφίλμ στην *P.aeruginosa* είναι η παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας. Στις ψευδομονάδες η μήτρα αποτελείται από εξωπολυσακχαρίτες (EPS), DNA και πρωτεΐνες (deBeer, et al., 1994). Μελέτες έχουν προσδιορίσει τους γενετικούς τόπους *pel* και *psl* ως δυο σέτ γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή των πολυσακχαριτών της μήτρας και είναι απαραίτητα για την ωρίμανση του βιοφίλμ στην *P.aeruginosa* σε αβιοτικές επιφάνειες, ενώ παράλληλα μόνο ο γενετικός τόπος *pel* έχει προσδιοριστεί στην *P.aeruginosa* στέλεχος P14 (Friedman, et al., 2004; 2004b; Jackson, et al., 2004; Matsukawa, et al., 2004). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο γενετικός τόπος *pel* παίζει ρόλο και στα αρχικά στάδια σχηματισμού του βιοφίλμ. Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος στο γονίδιο *pel* της *P.aeruginosa* στέλεχος PAK επιδεικνύει σοβαρά ελαττώματα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης καθώς στερείται ινιδίων τύπου IV (Vasseur, et al., 2005), ενώ το στέλεχος PAO1 με μετάλλαξη στο γονιδιακό τόπο *psl* είναι μπλοκαρισμένο ως προς το σχηματισμό βιοφίλμ (Ma, et al., 2006). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι όταν η *P.aeruginosa* έρχεται σε επαφή με μια επιφάνεια είναι πιθανό να ρυθμίζει συνεργατικά τις συμπεριφορές που σχετίζονται με την επιφάνεια, συμπεριλαμβανομένων του σχηματισμού βιοφίλμ και της ομαδικής κινητικότητας. Το γεγονός ότι η *SadB* πρωτεΐνη φαίνεται να απαιτείται τόσο για το σχηματισμό βιοφίλμ όσο και για την ομαδική κινητικότητα (Caiazza, et al., 2005) υποδηλώνει ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στη συνδυαστική ρύθμιση αυτών των δυο συμπεριφορών. Ως εκ τούτου, το γονίδιο *sadB* θεωρείται ως ένας γενετικός σύνδεσμος μεταξύ αυτών των δυο συμπεριφορών που σχετίζονται με τις επιφάνειες. Οι Caiazza et al (Caiazza, et al., 2004) έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης *SadB* αυξάνονται σε συνθήκες που προωθούν το σχηματισμό βιοφίλμ, προτείνοντας ότι μπορεί να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και της έκτασης του σχηματισμού του βιοφίλμ. Παράλληλα τα μεταλλάγματα *sadB* επιδεικνύουν έναν hyperswarming σε σύγκριση με τα στελέχη αγρίου τύπου και ο φαινότυπος αυτός οδηγεί σε μία κατά περίπου δύο φορές μεγαλύτερη κάλυψη της επιφάνειας από τα μεταλλάγματα αυτά. Αντίθετα, η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού οδηγεί σε καταστολή της ομαδικής κινητικότητας σε θρεπτικό μέσο με συγκέντρωση άγαρ 0,55% αλλά όχι σε θρεπτικό μέσο με άγαρ συγκέντρωσης 0,5%, προτείνοντας ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης *SadB* στην καταστολή της ομαδικής κινητικότητας εξαρτάται από το ιξώδες του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (Caiazza, et al., 2007). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του σχηματισμού βιοφίλμ και της ομαδικής κινητικότητας, η οποία προκύπτει και μεσολαβείται, τουλάχιστον σε ένα βαθμό, από την πρωτεΐνη *SadB*. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν τα μεταλλάγματα *sadB* της *P.aeruginosa* PA14 ως προς φαινοτύπους που σχετίζονται με την κινητικότητα και συγκεκριμένα με την ταχύτητα της κολυμβητικής κίνησης και με το ρυθμό αντιστροφής των μαστιγίων. Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι το γονίδιο *sadB* εμπλέκεται στην αντιστροφή των μαστιγίων μόνο σε συνθήκες υψηλού ιξώδους, συνθήκες που ομοιάζουν με τις συνθήκες που παρατηρούνται κατά το σχηματισμό βιοφίλμ και κατά την ομαδική κινητικότητα. Μελετώντας μια ένθεση Tn5 στο γονίδιο *pliG*, του χημειοτακτικού

συμπλέγματος γονιδίων IV (*cheIV*) της *P.aeruginosa*, αποκαλύφθηκε ότι η ένθεση αυτή οδηγεί σε φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας παρόμοιο με τον φαινότυπο που παρατηρείται σε στελέχη με μεταλλαγή στο γονίδιο *sadB* (hyperswarming φαινότυπος). Με στόχο να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του συμπλέγματος γονιδίων *cheIV* στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην ομαδική κινητικότητα, κατασκευάστηκαν στελέχη με έλλειψη δυο γονιδίων του συμπλέγματος αυτού: του γονιδίου *pilJ*, που κωδικοποιεί μια μέθυλο-προσλαμβάνουσα χημειοτακτική πρωτεΐνη (MCP) και του γονιδίου *chpB* που κωδικοποιεί για μια διμεθυλάση της MCP. Το μετάλλαγμα $\Delta pilJ$ είναι ελαττωματικό ως προς το σχηματισμό βιοφίλμ και επιδεικνύει hyperswarming φαινότυπο και είναι ελαττωματικό ως προς την twitching κινητικότητα και παρουσιάζουν αύξηση στον ρυθμό αντιστροφής των μαστιγίων σε συνθήκες υψηλού ιξώδους. Επιπλέον, η υπερέκφραση της *SadB* στο $\Delta pilJ$ δεν διεγείρει ούτε το σχηματισμό βιοφίλμ ούτε καταστέλλει την ομαδική κινητικότητα. Αντίθετα, το μετάλλαγμα $\Delta chpB$ δεν έχει ικανότητα ομαδικής κινητικότητας αλλά σχηματίζει πιο εύρωστα βιοφίλμ σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *chpB* έχουν επιπτώσεις και στην παραγωγή, της κωδικοποιούμενης από το γονίδιο *pel*, μήτρας, γεγονός που γίνεται εύκολα αντιληπτό καθώς τα μεταλλάγματα αυτά παράγουν αυξημένες ποσότητες *Pel* πολυσακχαριτών, ενώ αντίθετα τα μεταλλάγματα *sadB* παράγουν μειωμένη ποσότητα μήτρας.

Συμπερασματικά, ο *SadB* –εξαρτώμενος έλεγχος των μαστιγιακών αναστροφών κατά την πολική, αντιστρεπτή προσκόλληση στην επιφάνεια μπορεί να μειώνει την περιστροφή γύρω από τον πόλο του κυττάρου και έτσι αυξάνεται ο χρόνος αλληλεπίδρασης μεταξύ του βακτηρίου και του υποστρώματος, ενισχύοντας και προωθώντας τον σχηματισμό βιοφίλμ, ενώ αντίθετα ο αυξημένος ρυθμός των μαστιγιακών αντιστροφών ευνοεί την ομαδική κινητικότητα. Επίσης, ο λειτουργικός γενετικός τόπος *pel* συμβάλλει στα αρχικά στάδια σχηματισμού του βιοφίλμ και μετάλλαξη στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο προωθεί την ομαδική κινητικότητα και αυτή η αντίστροφη σχέση μεταξύ της παραγωγής των πολυσακχαριτών και της κινητικότητας έχει δειχθεί και σε άλλες μελέτες βασισμένες στην *P.aeruginosa* (Deziel, et al., 2001; Kirisits, et al., 2005; Shrout, et al., 2006).



Εικόνα 27: μοντέλο για τον αντίστροφο έλεγχο του σχηματισμού βιοφίλμ και της ομαδικής κινητικότητας. Τα πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα (στο πάνω μέρος της εικόνας), αρχικά αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια μέσω αντιστρεπτής πολικής προσκόλλησης, αν και το ποιο άκρο του κυττάρου αλληλεπιδρά με την αβιοτική επιφάνεια δεν είναι σαφές. Ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη *SadB* και στοιχεία του χημειοτακτικού συμπλέγματος *CheIV* (*PilJ* και *ChpB*) ελέγχει το αν θα ξεκινήσει ο σχηματισμός βιοφίλμ ή αν τα βακτήρια θα κινηθούν μέσω ομαδικής κινητικότητας. Ο σχηματισμός βιοφίλμ, σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής των *Pel*-πολυσακχαριτών και με τη μείωση στο ποσοστό των μαστιγιακών αναστροφών (*FlaRev*). Η ομαδική κινητικότητα σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή πολυσακχαριτών και αυξημένο ποσοστό μαστιγιακών αναστροφών. (Caiazza, et al., 2007)

1.15 Σκοπός μελέτης.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εστιάζει στην διερεύνηση και στην αξιολόγηση της ομαδικής κινητικότητας δυο στελεχών του γένους *Pseudomonas spp.*, του στελέχους P21 και P14 καθώς στη σχέση της ομαδικής κινητικότητας και της ανταγωνιστικής δράσης των συγκεκριμένων στελεχών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βακτηριακά στελέχη-Βιολογικό υλικό.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα φυτών τομάτας, 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 των τοματόφυτων, με ηλιοαπολύμανση ή με εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου κατά περίπτωση. Το βρωμιούχο μεθύλιο είναι ένα απολυμαντικό ευρέος φάσματος και από τις 18/3/2009 σε όλα τα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης έπαψε η χορήγηση ή η ανανέωση αδειών κυκλοφορίας στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, στη σύνθεση των οποίων περιέχεται το βρωμιούχο μεθύλιο. Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου –που κατεξοχήν χρησιμοποιείται στην απολύμανση των εδαφών στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες- αποδείχθηκε ότι είναι επιβλαβής για τον άνθρωπο, το περιβάλλον και για την υγεία των ζώων.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν απομονωθεί από θερμοκηπιακό έδαφος που έχει υποστεί επέμβαση βρωμιούχου μεθυλίου 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 στέρεες καλλιέργειες διατηρούνται στους 4 °C για διάστημα μερικών εβδομάδων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν επίσης στελέχη ως μοντέλα για τη διαπίστωση τυχόν ανταγωνιστικής δράσης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sp.*, *Fusarium sp.* και *Botrytis sp.* από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 6: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

α/α	Στέλεχος	Είδος φυτού	Επέμβαση εδάφους
1	P14	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο
2	P21	<i>Solanum lycopersicum</i>	Βρωμιούχο μεθύλιο

2.2 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών.

2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)- 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 *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 στο 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 2ⁿ 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.

2.2.2 Ενίσχυση του τμήματος DNA.

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 στη συνέχεια.


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).

Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (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 ¹¹	5 μl
6. DMSO	2μl
7. <i>Taq</i> DNA πολυμεράση (1unit/μl)	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 CAAGTCGTAAAAGGTAGCCGT

2.2.3 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, 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. 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, 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 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) και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης
- ❖ Τέλος στα άκρα της πηκτής εφαρμόζεται κατάλληλη τάση, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm⁻¹.

2.2.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης.

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *QIAquick Gel Extraction Kit* της *QIAGEN*[™].

- Το τμήμα της πηκτής αγαρόζης το οποίο φέρει την επιθυμητή ζώνη DNA, απομονώνεται με τη χρήση νυστεριού. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα τύπου errendorf, 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 φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται για 1 min.
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου errendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30 μl ddH₂O ή διαλύματος EB.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 1 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.5 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 φασματοφωτομέτρου 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 (H₂O ή TE).
- ❖ Ποσότητα δείγματος 1μl φωτομετρείται και λαμβάνονται οι λόγοι OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀, βάσει των οποίων εκτιμάται η καθαρότητα των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.
- ❖ Όταν ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 OD₂₆₀/OD₂₃₀. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, έχει δηλαδή τιμές υψηλότερες του OD₂₆₀/OD₂₈₀. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων.

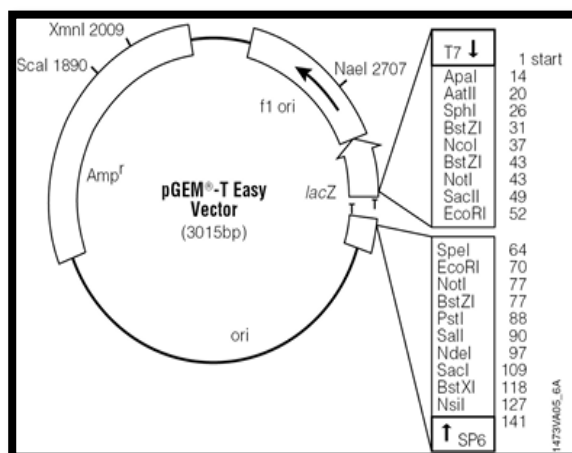
2.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.

2.2.6.1 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-πεπτιδίο 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 (ισοπροπουλοθειογαλακτοζίδιο). 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.



Εικόνα 28: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy (Promega).

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

2.2.6.2 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 28). 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 αραιώση 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 ⁸	1 μl
4. Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
5. ddH ₂ O	6 μl

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

2.2.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*.

2.2.7.1 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, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

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

- ❖ 10 ml LB¹ θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος XL-blue) και επώάζονται, 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. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, εωσότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.₆₀₀=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 MgCl₂, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- ❖ Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂ 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 CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).

Τα κύτταρα αφού διαμοιραστούν σε σωλήνες τύπου errendorf φυλάσσονται στους -80 °C.

2.2.7.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο.

- ❖ Σε σωλήνα τύπου errendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl, δεκτικά για μετασχηματισμό 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 μετασχηματισμό 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 και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 h.
- ❖ Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T easy), ώστε να επιτευχθεί η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- ❖ Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10μl διαλύματος IPTG 100mM και 50μl διαλύματος 2% (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 τους 37°C για 18 h.

2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*.

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

- ❖ 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό-αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί 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 errendorf 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 φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη *QIAprep*.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση 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 μl 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 errendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεμένου στη στήλη DNA, με την προσθήκη 30 μl διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH= 8,5) ή ddH₂O και αφήνεται σε ηρεμία για 1 min.
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- ❖ Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.9 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 μl-100 μl.

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. Τέλος προστίθεται ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.
- ❖ Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC (όπου /: ορισμός σημείου πέψεως 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 ₂ O ή TE ²)	έως 10μl
2. Ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl)	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
4. RNase A ⁴ (1 mg/ml)	0,5 μl
5. ddH ₂ 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 αгарόζης.

2.2.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing).

Πλασμιδικό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN™*, 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.

2.2.11 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.

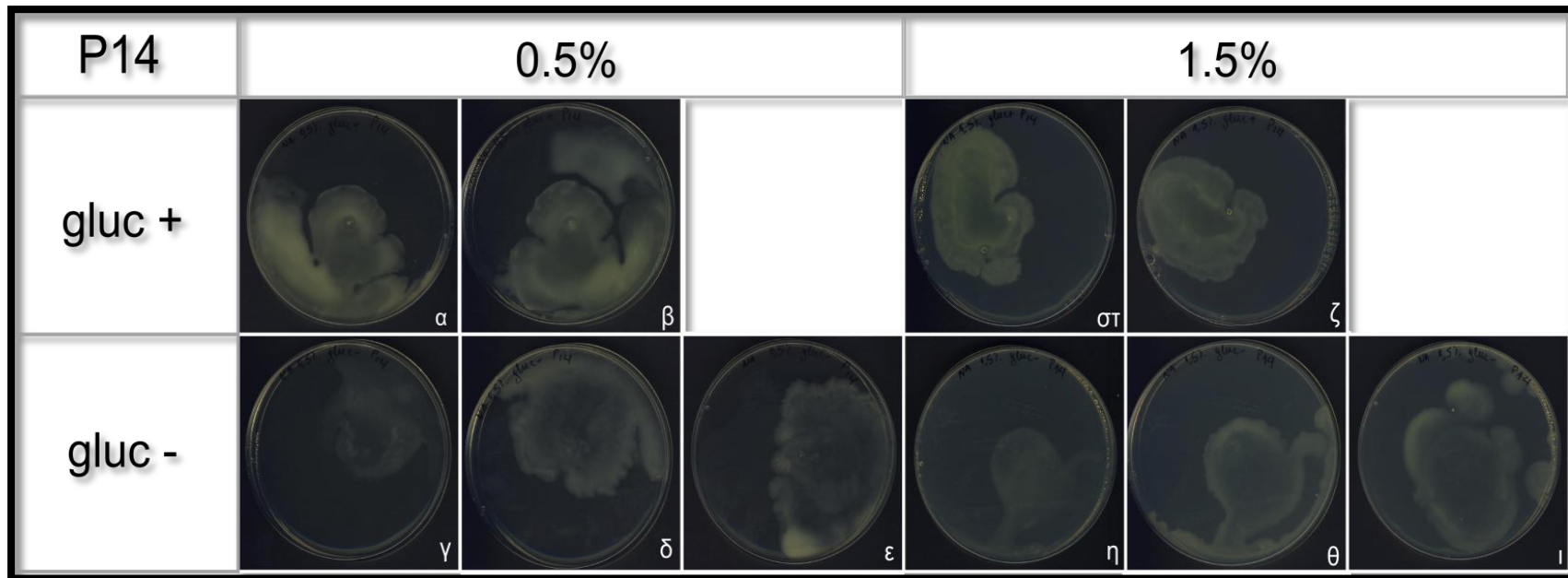
Η εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2011).

Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987), 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 Αποτελέσματα

3.1 Διερεύνηση της ομαδικής κινητικότητας του στελέχους P14

Το βακτηριακό στέλεχος P14 εξετάστηκε ως προς την ομαδική του κινητικότητα

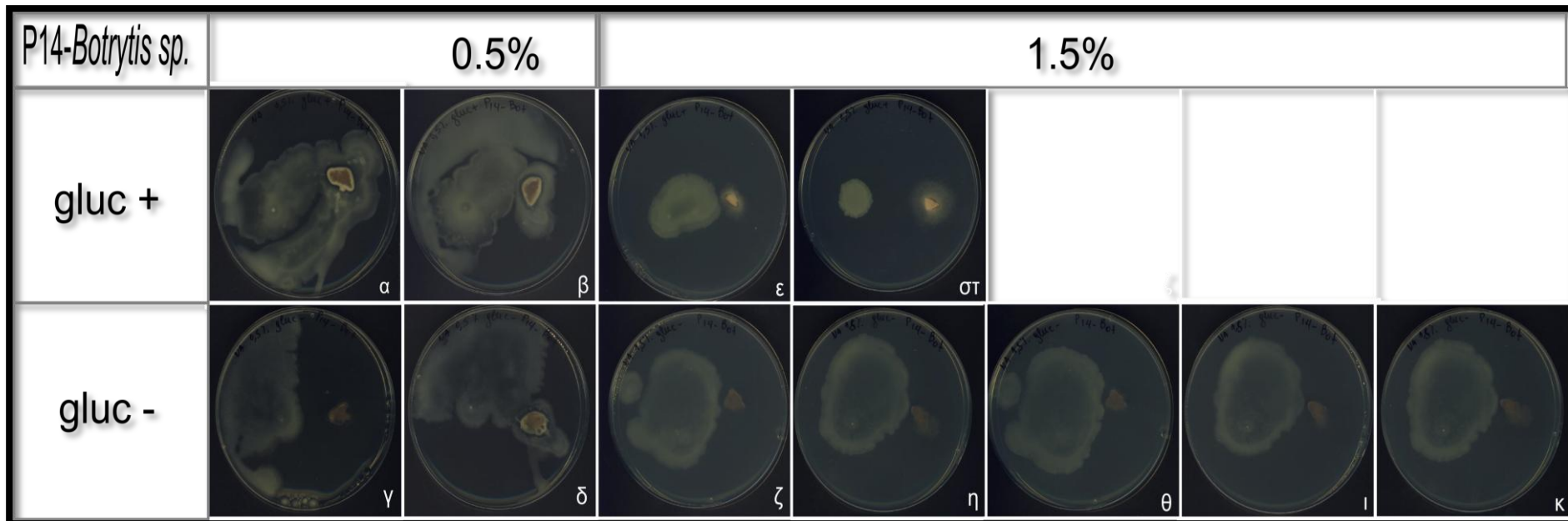


Εικόνα 28: Ομαδική κινητικότητα του στελέχους P14 στην επιφάνεια τρυβλίου που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό (α και β) και χωρίς την προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό (γ, δ και ε). Κινητικότητα του στελέχους P14 στην επιφάνεια τρυβλίου που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%, με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό (στ και ζ) και χωρίς προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό (η, θ και ι). Η παρατήρηση και η φωτογράφιση πραγματοποιήθηκαν ≈20 ώρες μετά την επώαση.

σε επιφάνεια τρυβλίου που είχε στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% αλλά και ως προς την κινητικότητά του σε τρυβλία που είχαν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%.

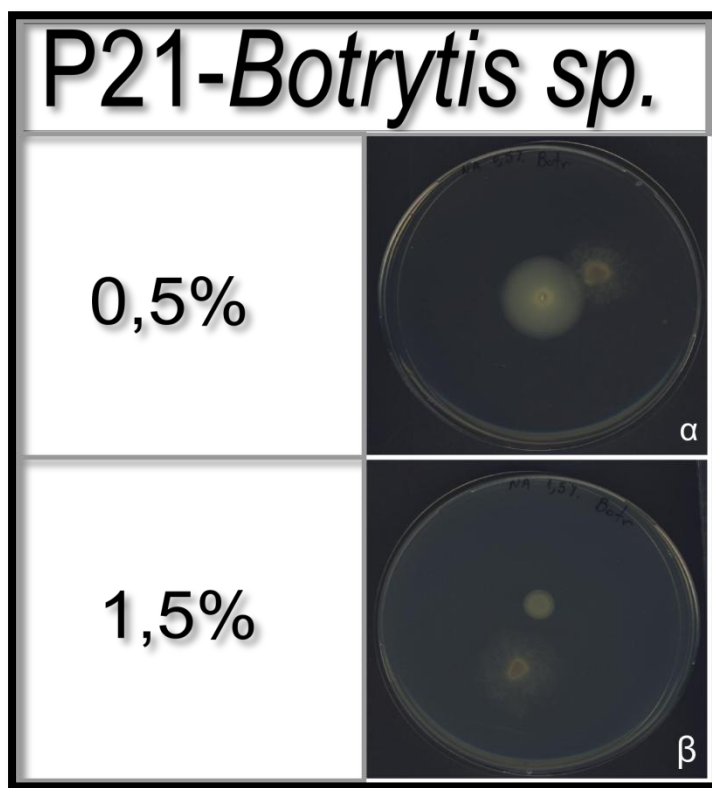
Στην εικόνα 28 παρατηρούμε ότι το στέλεχος της *Pseudomonas spp. P14* έντονη ικανότητα εξάπλωσης στην επιφάνεια των τρυβλίων που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 0,5%(συνθήκες ομαδικής κινητικότητας) ανεξάρτητα από το αν στο θρεπτικό υλικό έχει προστεθεί γλυκόζη. Η ικανότητα εξάπλωσης του συγκεκριμένου στελέχους και σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με συγκέντρωση άγαρ 1,5% είναι αρκετά έντονη ανεξάρτητα και πάλι από την προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Στα τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% μπορούμε να παρατηρήσουμε ελαφρώς μειωμένη κινητικότητα σε σχέση με τα τρυβλία που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα.

3.2 Διερεύνηση της ανταγωνιστικής δράσης των στελεχών P14 και P21 έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων.



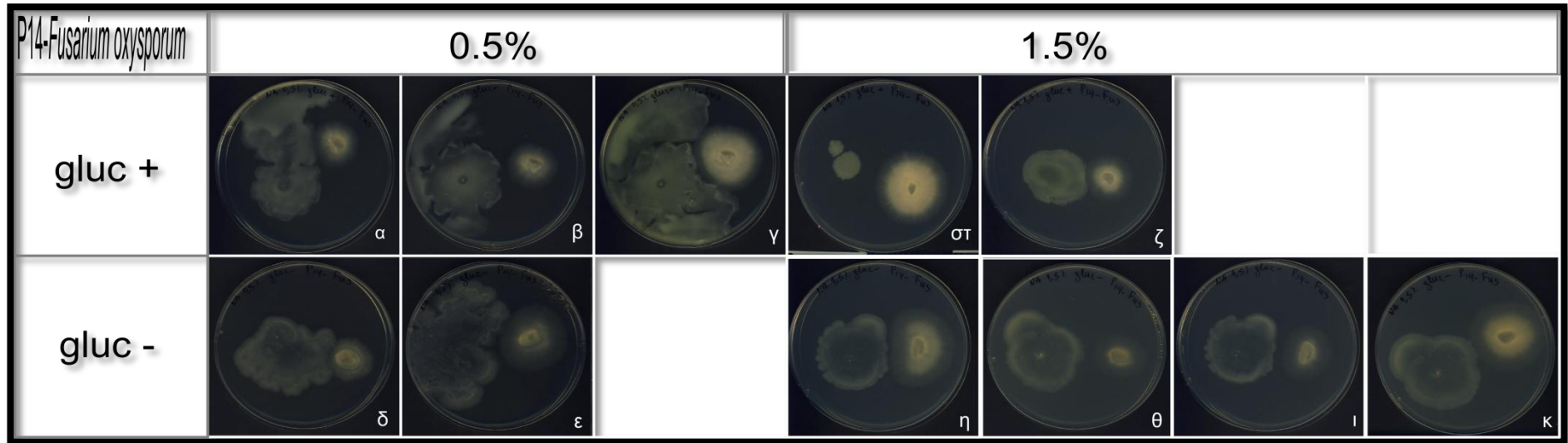
Εικόνα 29: Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis spp.* (α-δ). Το στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis spp.* και όταν αναπτύσσεται σε τρυβλίο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (ε-κ). Ο εμβολιασμός του στελέχους P14 και του μύκητα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα.

Στην εικόνα 29 παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας αναχαιτίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis spp.*. Πιο συγκεκριμένα στις εικόνες 29^α, 29^β και 29^δ το στέλεχος P14 έρχεται σε επαφή με τον μύκητα και τον «περικυκλώνει» περιορίζοντας έτσι την ανάπτυξή του. Στις εικόνες 28^ε και 28^ζ παρατηρούμε ικανοποιητική ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους, σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%, και το βακτηριακό στέλεχος φαίνεται ότι παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα χωρίς να τον «περικυκλώνει». Το γεγονός αυτό πιθανόν, οφείλεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα κίνησης και εξάπλωσης του συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους είναι μεγαλύτερη σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% σε σύγκριση με τρυβλία που ως στερεοποιητικός παράγοντας έχει χρησιμοποιηθεί άγαρ συγκέντρωσης 1,5%.



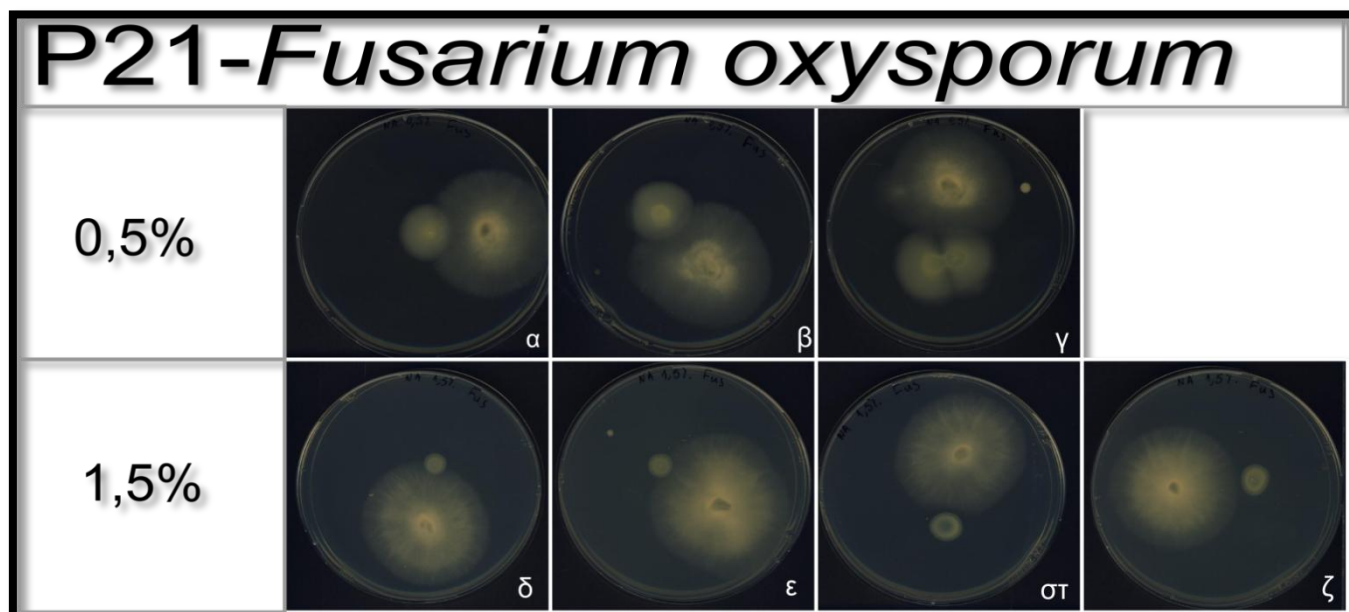
Εικόνα 30: (α) Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis spp.* (β) Συνκαλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους P21 και του μύκητα σε θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%. Ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους και του μύκητα έγινε ταυτόχρονα.

Στην εικόνα 30^α παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis spp.* σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας, και ότι το βακτηριακό στέλεχος έρχεται σε επαφή με τις υφές του μύκητα. Στην εικόνα 30^β παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P21 δεν εξαπλώνεται σε μεγάλο βαθμό σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό μέσο το οποίο έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% με αποτέλεσμα να μην προσεγγίζει τις αναπτυσσόμενες υφές του μύκητα και να μην παρατηρείται παρεμπόδιση της ανάπτυξής του (τουλάχιστον 20 ώρες μετά τον εμβολιασμό).



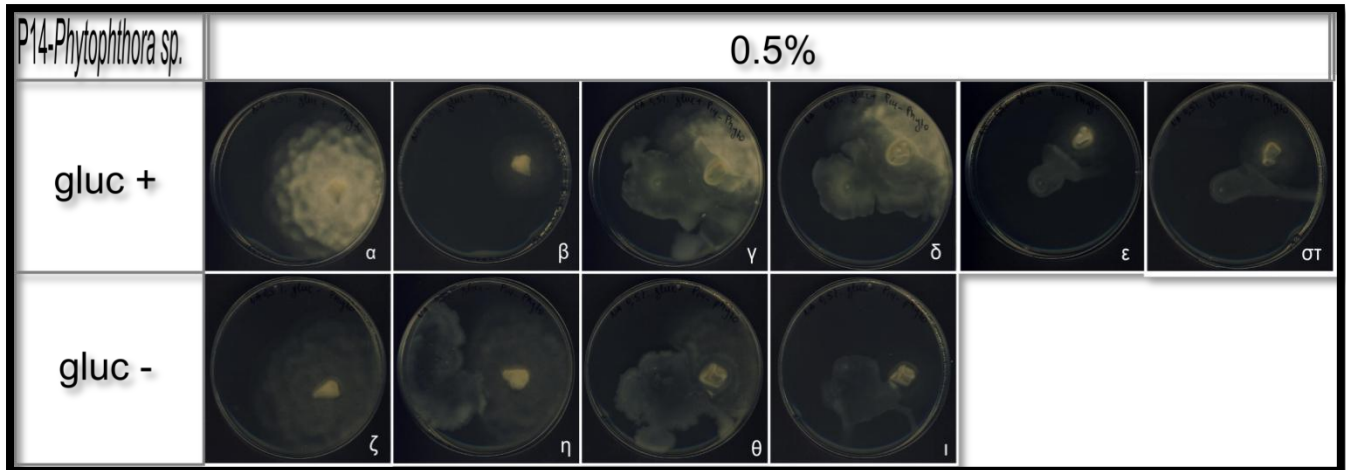
Εικόνα 31: Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* (α-ε). Το στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* και όταν αναπτύσσεται σε τρυβλίο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (ζ-κ). Ο εμβολιασμός του στελέχους P14 και του μύκητα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα.

Στις εικόνες 31^{α-ε} παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P14, σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας αναστέλλει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum*. Στις εικόνες 31^{ζ-η} και 31^{θ-κ} παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* και στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%, αν και η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους είναι σημαντικά μικρότερη, κάτω από αυτές τις συνθήκες.



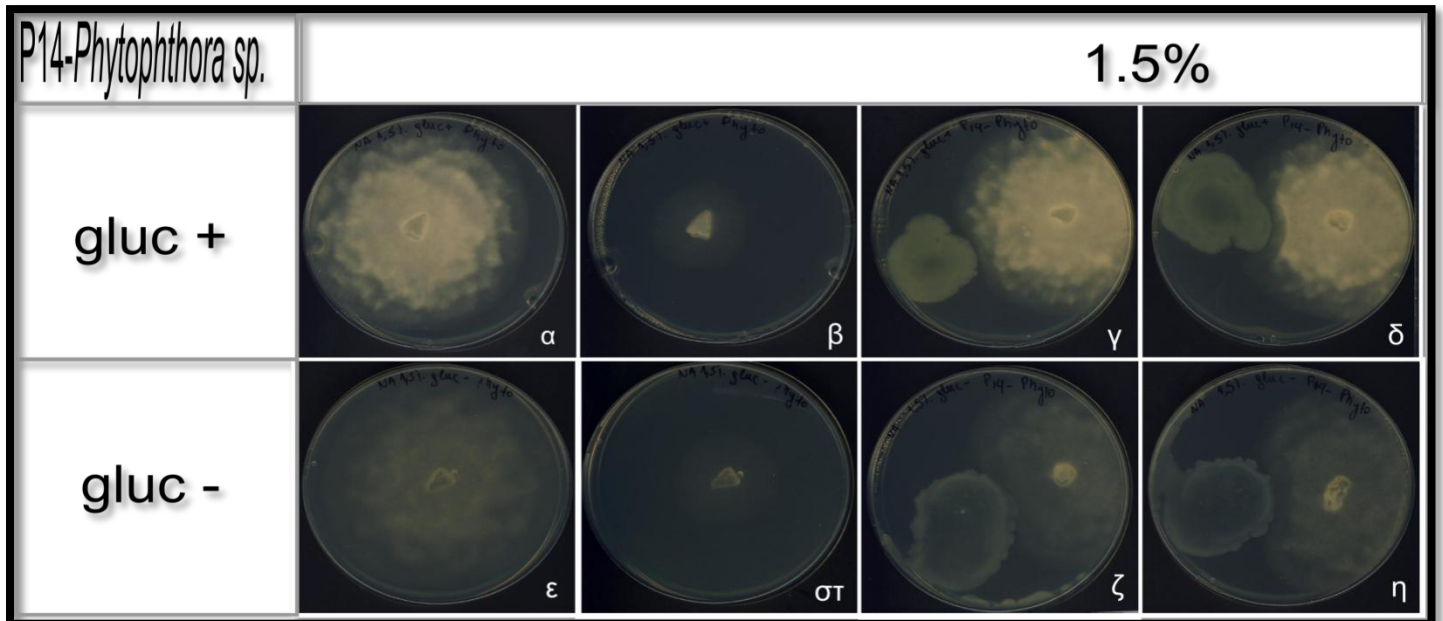
Εικόνα 32: Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* (α-γ). Το στέλεχος P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* και όταν αναπτύσσεται σε τρυβλίο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (δ-ζ). Ο εμβολιασμός του στελέχους P21 και του μύκητα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα.

Στις εικόνες 32^{α-γ} παρατηρούμε ότι κατά την ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 η ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* αναστέλλεται και μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ομαδικά κινούμενη βακτηριακή αποικία έρχεται σε επαφή με τις αναπτυσσόμενες υφές του μύκητα. Στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (Εικόνες 32^{δ-ζ}) παρατηρούμε σαφώς μικρότερη εξάπλωση του βακτηριακού στελέχους, το οποίο παρ'όλα αυτά φαίνεται να παρεμποδίζει και πάλι αποτελεσματικά την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.



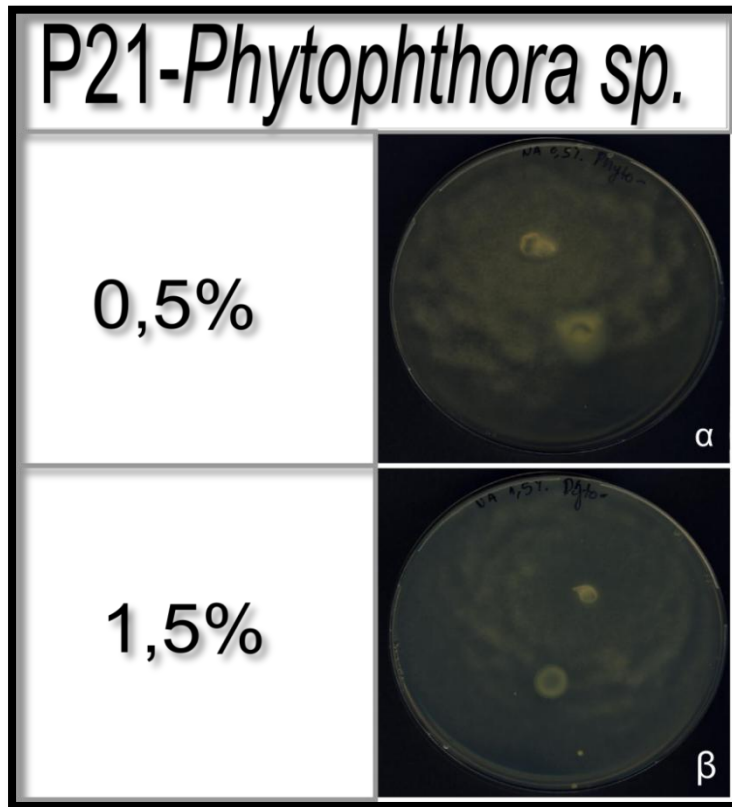
Εικόνα 33: (α, β και ζ) Η ανάπτυξη του μύκητα 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του στα τρυβλία. (γ,δ και η,θ) Το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* όταν ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους και του μύκητα έχουν γίνει ταυτόχρονα σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας αλλά και όταν (ε,στ και ι) ο εμβολιασμός του μύκητα προηγείται κατά 24 ώρες του εμβολιασμού του βακτηριακού στελέχους.

Στις εικόνες 33^{γ-δ} και 33^{η-θ} όπου ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους P14 και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* έγινε ταυτόχρονα παρατηρούμε ότι σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει πολύ αποτελεσματικά την ανάπτυξη του συγκεκριμένου φυτοπαθογόνου μύκητα, και η βακτηριακή αποικία έρχεται σε επαφή με τον αναπτυσσόμενο μύκητα. Στις περιπτώσεις όπου ο εμβολιασμός του μύκητα προηγείται κατά 24 ώρες του εμβολιασμού του βακτηριακού στελέχους P14 (Εικόνες 33^{ε-στ} και 33^ι) παρατηρούμε και πάλι ότι το βακτηριακό στέλεχος καταφέρνει να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα και έτσι μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* ανεξάρτητα από το στάδιο της ανάπτυξής του.



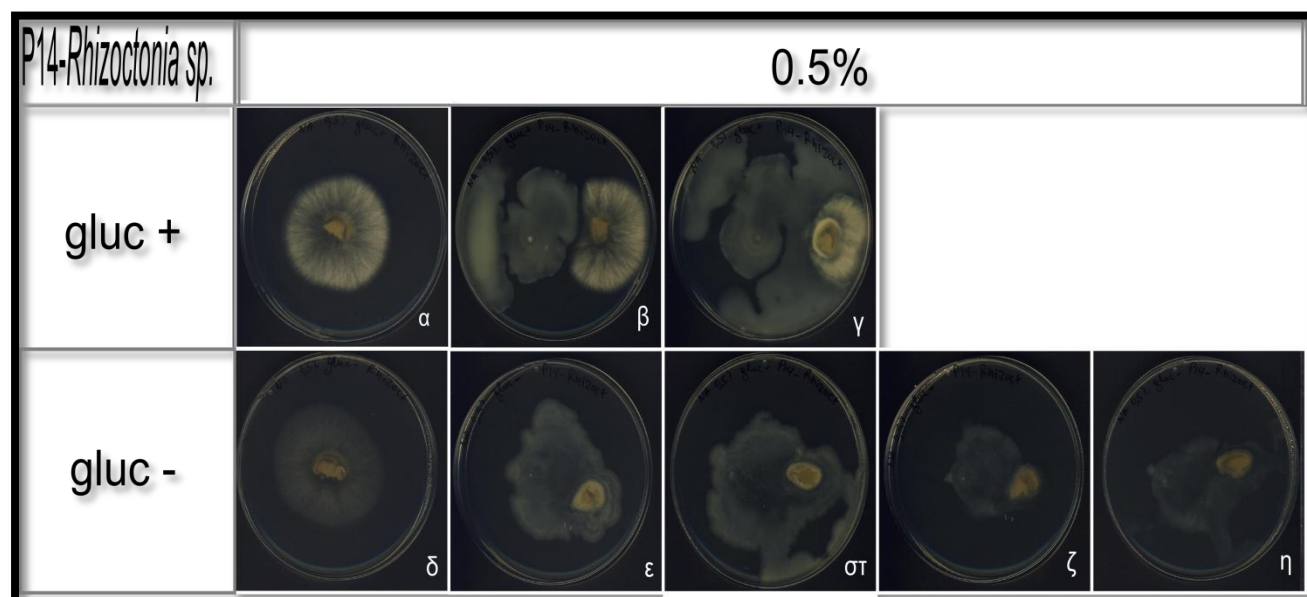
Εικόνα 33: (α, β και ε,στ) Η ανάπτυξη του μύκητα 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του στα τρυβλία. (γ,δ και ζ,η) Το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* όταν ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους και του μύκητα έχουν γίνει ταυτόχρονα σε θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%.

Στις εικόνες 34^{γ-δ} και 34^{ζ-η} παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 εξαπλώνεται σε μεγάλο βαθμό και στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% και ότι και κάτω από αυτές τις συνθήκες παρεμποδίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.*



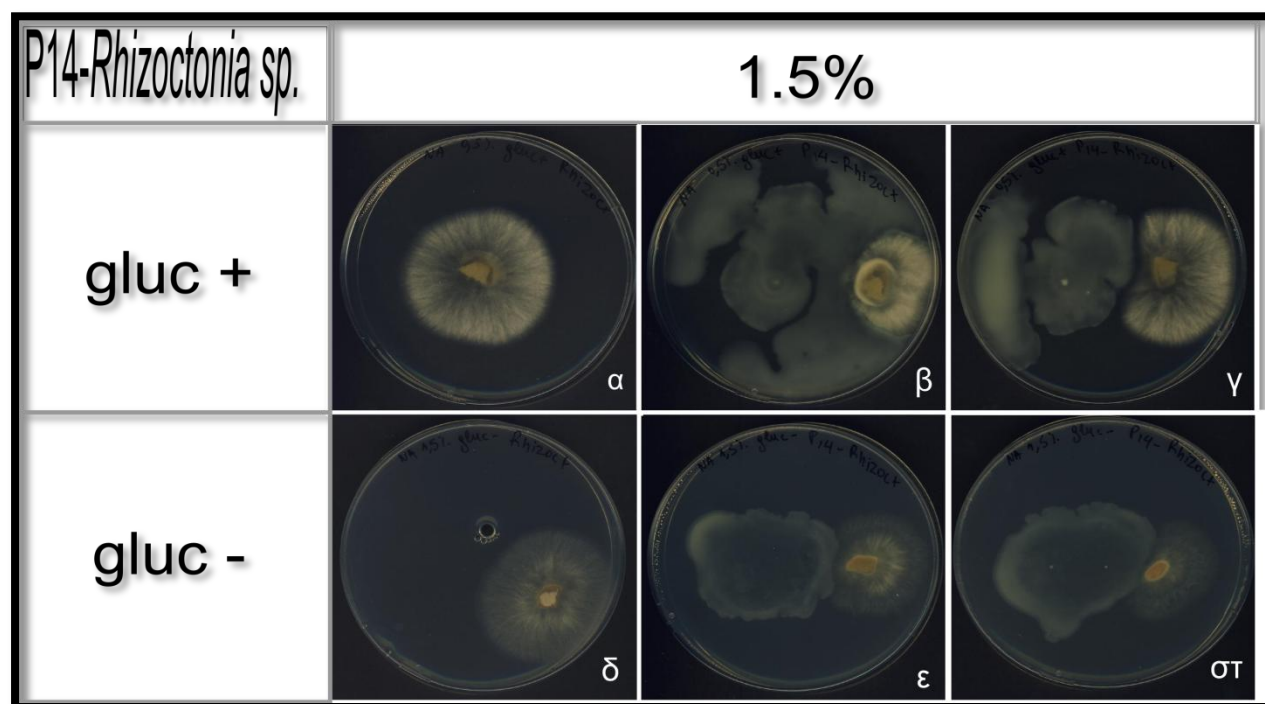
Εικόνα 35: Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* (α). Το στέλεχος P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* και όταν αναπτύσσεται σε τρυβλίο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (δ-ζ). Ο εμβολιασμός του στελέχους P21 και του μύκητα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα.

Στην εικόνα 35^α παρατηρούμε ότι κατά την ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 η ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora spp.* αναστέλλεται και μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ομαδικά κινούμενη βακτηριακή αποικία έρχεται σε επαφή με τις αναπτυσσόμενες υφές του μύκητα. Στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (Εικόν 35^β) παρατηρούμε μικρότερη εξάπλωση του βακτηριακού στελέχους, το οποίο μπορεί να περιοίσει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.



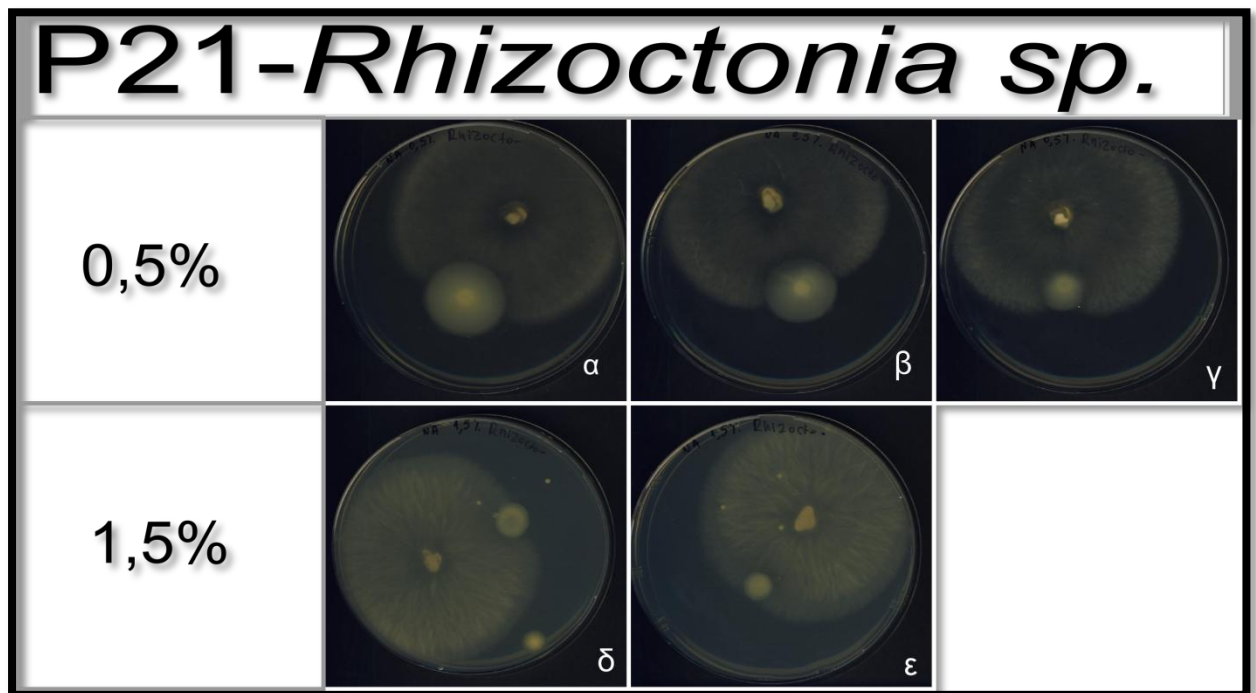
Εικόνα 36: (α και δ) Η ανάπτυξη του μύκητα 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του στα τρυβλία. (β,γ και ε,στ) Το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* όταν ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους και του μύκητα έχουν γίνει ταυτόχρονα σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας αλλά και όταν (ζ και η) ο εμβολιασμός του μύκητα προηγείται κατά 24 ώρες του εμβολιασμού του βακτηριακού στελέχους.

Στις εικόνες 36^{β-γ} και 36^{ε-στ} όπου ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους P14 και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* έγινε ταυτόχρονα παρατηρούμε ότι σε συνθήκες ομαδικής κινητικότητας το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει πολύ αποτελεσματικά την ανάπτυξη του συγκεκριμένου φυτοπαθογόνου μύκητα, και η βακτηριακή αποικία έρχεται σε επαφή με τον αναπτυσσόμενο μύκητα. Ειδικά στις εικόνες 36^γ και 36^{ε-στ} παρατηρούμε ότι η βακτηριακή αποικία έχει «περικυκλώσει» τον αναπτυσσόμενο μύκητα. Στις περιπτώσεις όπου ο εμβολιασμός του μύκητα προηγείται κατά 24 ώρες του εμβολιασμού του βακτηριακού στελέχους P14 (Εικόνες 33^{ζ-η}) παρατηρούμε και πάλι ότι το βακτηριακό στέλεχος καταφέρνει να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα και έτσι μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* ανεξάρτητα από το στάδιο της ανάπτυξής του.



Εικόνα 37: (α και δ) Η ανάπτυξη του μύκητα 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του στα τρυβλία. (β,γ και ε,στ) Το βακτηριακό στέλεχος P14 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* όταν ο εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους και του μύκητα έχουν γίνει ταυτόχρονα σε θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%.

Στις εικόνες 37^{β-γ} και 37^{ε-στ} παρατηρούμε ότι το βακτηριακό στέλεχος P14 εξαπλώνεται σε μεγάλο βαθμό και στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% και ότι και κάτω από αυτές τις συνθήκες παρεμποδίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.*



Εικόνα 38: Η ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.*(α-γ). Το στέλεχος P21 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* και όταν αναπτύσσεται σε τρυβλίο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (δ-ε). Ο εμβολιασμός του στελέχους P21 και του μύκητα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα.

Στις εικόνες 38^{α-γ} παρατηρούμε ότι κατά την ομαδική κινητικότητα του στελέχους P21 η ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia spp.* αναστέλλεται και μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ομαδικά κινούμενη βακτηριακή αποικία φαίνεται να απωθεί(αναχαιτίζει) τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia spp.* χωρίς να έρχεται σε επαφή μαζί του . Στα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο που έχει στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5% (Εικόνες 32^{δ-ε}) παρατηρούμε σαφώς μικρότερη εξάπλωση του βακτηριακού στελέχους, το οποίο παρ'όλ'αυτά φαίνεται να παρεμποδίζει και πάλι αποτελεσματικά την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα

3.3 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών P14 και P21 τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα τοματοφύτων.

Επιλέχθηκαν δύο στελέχη από αυτά που παρουσίασαν αξιοσημείωτη συλλογική κίνηση σε *in vitro* πειράματα, τα P14 και P21, για τα οποία πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση του γονιδίου 16S rRNA και στη συνέχεια αλληλούχιση των υποκλώνων αυτών.

Στοιχισή των διαθέσιμων αλληλουχιών (Pair-wise alignment) του 16S rRNA των στελεχών P14 και P21 τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα έδειξε ότι οι αλληλουχίες 16S rRNA των στελεχών, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με το 16S rRNA των τυπικών στελεχών βάση του προγράμματος EzTaxon (Chun et al., 2007). Το στέλεχος P14 παρουσιάζει 99,597% ομολογία με το στέλεχος *Pseudomonas azotoformans* IAM1603, ενώ το στέλεχος P21 παρουσιάζει 99,393% ομολογία με το στέλεχος *Pseudomonas jessenii* CIP 105274. (πίνακας 7).

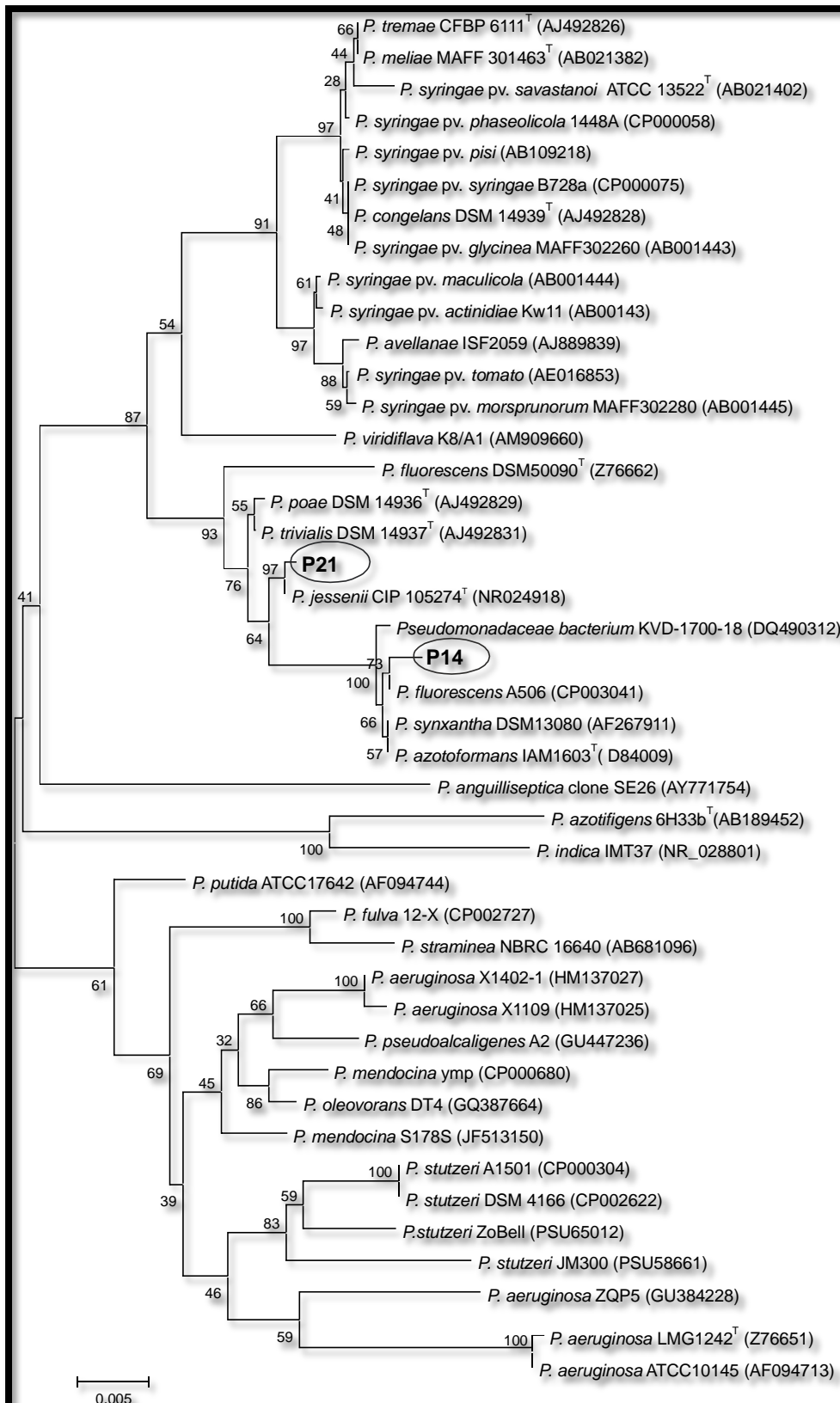
Πίνακας 7: Ομολογία του 16S rRNA γονιδίου των στελεχών P14 και P21 με τυπικά στελέχη.

Στέλεχος	16S rRNA identification	Ομολογία με το τυπικό στέλεχος %(Ez Taxon).
P14	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99,597
P21	<i>Pseudomonas jessenii</i>	99,393

Η φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA των υπό διερεύνηση στελεχών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Altschul et al., 1997) και megaBLAST (Zhang et al., 2000) του NCBI. Το στέλεχος P14 ομαδοποιείται κοντά στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens*, *P. roae* και *P. synxantha* και παρουσιάζει με αυτά ομολογία μεγαλύτερη του 99%. Αντίστοιχα, το στέλεχος P21 ομαδοποιείται κοντά στα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* και *P. jessenii* και παρουσιάζει με αυτά ομολογία μεγαλύτερη του 99%. (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Ομολογία του 16S rRNA γονιδίου των στελεχών P14 και P21 με τυπικά στελέχη.

Στέλεχος	16S rRNA identification	Ομολογία(%) NCBI (blastn)
P14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. roae</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	99
P21	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. jessenii</i>	99



Εικόνα 39: Φυλογενετικό δένδρο 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 Συζήτηση

Παρά την πληθώρα των δεδομένων για τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα στελέχη του γένους *Pseudomonas spp.* περιορίζουν την ανάπτυξη κάποιων φυτοπαθογόνων μυκήτων υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που περιορίζουν την ανάπτυξη της χρήσης ανταγωνιστικών βακτηρίων για την καταπολέμηση ασθενειών ευρέως στον τομέα της γεωργίας (Morrissey, et al., 2002; Walsh, et al., 2001). Ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών των φυτών είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο του οποίου η επιτυχία βασίζεται και εξαρτάται ταυτόχρονα από πολλούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί συμπεριλαμβάνουν την ικανότητα του μικροβιακού εμβολίου να επιβιώσει στη ριζόσφαιρα και να ανταγωνιστεί με τον ήδη υπάρχον μικροβιακό πληθυσμό καθώς και να προστατέψει τον φυτικό οργανισμό από τον παθογόνο οργανισμό τόσο την κατάλληλη στιγμή όσο και στο κατάλληλο σημείο όπου συμβαίνει η προσβολή. Ο δυναμικός αποικισμός της ριζόσφαιρας και η ικανότητα ανταγωνισμού των αυτόχθονων μικροβιακών πληθυσμών είναι δυο βασικά προαπαιτούμενα για την επιτυχημένη βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων από στελέχη του γένους *Pseudomonas spp.* (Chin-A-Woeng, et al., 2000). Η ερευνητική ομάδα του Dekkers σχετικά πρόσφατα έδειξε ότι η εισαγωγή πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί για ένζυμο ειδικό ως προς τη θέση του ανασυνδυασμού (*sss*) αυξάνει την ικανότητα αποικισμού της ριζόσφαιρας της τομάτας δυο στελεχών της *Pseudomonas spp.* (Dekkers, et al., 2000). Μέσω της τεχνολογίας της *in vivo* μελέτης της έκφρασης των γονιδίων (IVET, *In vivo* expression technology) που χρησιμοποιήθηκε από τον Rainey (Rainey, 1999) ταυτοποιήθηκαν 20 γονίδια με αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο στέλεχος *Pseudomonas fluorescens SBW25* 14 από τα οποία έδειξαν ομολογία με αλληλουχίες γονιδίων του γένους *Pseudomonas spp.* που σχετίζονται με την πρόσληψη θρεπτικών, με την απόκριση στο στρες και με το εκκριτικό σύστημα τύπου III. Διπλά μεταλλάγματα στα γονίδια *brcD* και *brcR* που είναι γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου III επηρεάζονται ως προς τον ανταγωνιστικό αποικισμό της ρίζας και έχει προταθεί ότι το εκκριτικό σύστημα τύπου III στην *Pseudomonas fluorescens SBW25* σπρώχνει τη «βελόνα» του μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του φυτού με στόχο την πρόσληψη των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών από τους χυμούς του φυτού. Το συμπέρασμα ότι το εκκριτικό σύστημα τύπου III παίζει ρόλο στον ανταγωνιστικό αποικισμό της ρίζας είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι η ικανότητα του στελέχους της *Pseudomonas fluorescens KD* να αναστέλλει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium spp.* στο αγγούρι και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium spp.* στην τομάτα, χάνεται όταν το γονίδιο *brcC* είναι μεταλλαγμένο (Rezzonoco, et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε κατ' αρχήν ο φαινότυπος της ομαδικής κινητικότητας δύο στελεχών του γένους *Pseudomonas sp.* τα οποία απομονώθηκαν από έδαφος θερμοκηπίου που είχε υποστεί επέμβαση με σκοπό την απολύμανσή του με εφαρμογή βρωμιούχου μεθυλίου. Τόσο το βακτηριακό στέλεχος P14 όσο και το βακτηριακό στέλεχος P21 παρουσιάζουν έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% (swarming plates). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το στέλεχος P14 φαίνεται ότι κινείται ομαδικά και σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%. Συγκρίνοντας τα δυο αυτά βακτηριακά στελέχη μεταξύ τους και ως προς την ικανότητα τους να κινούνται ομαδικά μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το στέλεχος P14 είναι πιο «επιθετικό» και επίσης

παρουσιάζει πιο έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας και σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ 1,5% σε σχέση με το στέλεχος P21. Ενδιαφέρον θα είχε να μελετηθεί ο φαινότυπος της ομαδικής κινητικότητας των στελεχών αυτών και πάνω σε επιφάνειες γεωργικής σημασίας, όπως είναι η επιφάνεια των φύλλων ή/και το χώμα.

Τα βακτηριακά στελέχη P14 και P21 ταυτοποιήθηκαν με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου και βρέθηκε ότι ανήκουν στα είδη *Pseudomonas azotoformans* και *Pseudomonas jessenii* αντίστοιχα.

Το αισθητήριο σύστημα δυο παραγόντων *ColR/ColS* φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στον ανταγωνιστικό αποικισμό της ρίζας της τομάτας από το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens SBW25* καθώς μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία επηρεάζεται το συγκεκριμένο σύστημα εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα αποικισμού της ρίζας, ενώ ταυτόχρονα είναι υπερευαίσθητα στο αντιβιοτικό πολυμυξίνη Β, που δεσμεύεται στους λιποπολυσακχαρίτες(LPS). Τα γονίδια *colR/cols* ρυθμίζουν την έκφραση του οπερονίου της μεθυλοτρανσφεράσης/*warpQ* που εδράζεται κατωφερικά του συστήματος των 2 παραγόντων. Το γονίδιο *warpQ* κωδικοποιεί για μια φωσφατάση των επτοζών και έχει υποτεθεί ότι τα προοόντα και των 2 γονιδίων τροποποιούν τους λιποπολυσακχαρίτες που αλληλεπιδρούν με τις πορίνες των εξωτερικών μεμβρανών των κυττάρων της ρίζας (Lugtenberg, et al., 1983). Η δομή των λιποπολυσακχαριτών και η πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης OprF είναι δυο σημαντικοί παράγοντες για τον ανταγωνιστικό αποικισμό της ρίζας (Lugtenberg, et al., 2004). Ένα ριζικό σύμπλοκο γλυκοπρωτεΐνης (agglutinin), φαίνεται ότι συμμετέχει στη βραχυπρόθεσμη προσκόλληση των ψευδομονάδων στη ριζόσφαιρα των φυτικών οργανισμών. (Glandorf, et al., 1994). Μέχρι στιγμής, δεν έχει ταυτοποιηθεί κανένα γενετικό χαρακτηριστικό των στελεχών βιολογικού ελέγχου στις ψευδομονάδες, το οποίο θα μπορούσε να υποδείξει έναν μηχανισμό που επιτρέπει στα βακτήρια να αναγνωρίζουν ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας του φυτού ή να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα σινιάλα των φυτών. Το γεγονός αυτό συνάδει με την παρατήρηση ότι πολλά στελέχη-παράγοντες βιολογικού ελέγχου αποικούν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών φυτικών ειδών, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τον καλά μελετημένο και συγκεκριμένο μοριακό διάλογο που λαμβάνει χώρα μεταξύ των συμβιωτικών ριζοβίων και των ψυχανθών. Παρ'όλα αυτά, διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas spp.* με ελαττωματική ικανότητα αποικισμού φαίνεται ότι είναι επηρεασμένα σε γονίδια με άγνωστες προς το παρών λειτουργίες (Lugtenberg, et al., 2004) και άρα η πιθανότητα ειδικών αλληλεπιδράσεων παραμένει πιθανή.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και βακτηρίων επιδεικνύουν ένα συγκεκριμένο βαθμό ειδικότητας ως προς τον ξενιστή, και ότι διαφορετικά φυτικά είδη μπορούν να «διαλέξουν» διαφορετικούς πληθυσμούς για να αποικίσουν τη ριζόσφαιρά τους και αυτή η επιλογή έγκειται εν μέρει στην ενεργοποίηση της έκφρασης βακτηριακών γονιδίων ως απόκριση στα εκκρινόμενα μόρια από τις ρίζες των φυτών (Mark, et al., 2006) Η ερευνητική ομάδα του De Weert έδειξε ότι μεταλλαγμένα στελέχη της *P. fluorescens WCS365* στο γονίδιο *cheA* που ελέγχει την χημειοτακτική κίνηση μέσω των μαστιγίων επιδεικνύουν τόσο μειωμένη κινητικότητα όσο και μειωμένα επίπεδα αποικισμού της ρίζας των φυτών της τομάτας (De Weert, et al., 2002). Η κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών μέσω των μαστιγίων και των ινιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στον αποικισμό της ρίζας και κατ'επέκταση και στην αποτελεσματική βιολογική καταπολέμηση. Μελέτη που έγινε στην *Pseudomonas fluorescens F113* έδειξε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος

παρουσιάζει μια φαινοτυπική ποικιλομορφία σχηματίζοντας τρεις διαφορετικής μορφής αποικίες που επειδεικνύουν και διαφορετική κινητικότητα. Η εξέταση των φαινοτυπικά διαφορετικών στελεχών έδειξε ότι το στέλεχος με την καλύτερη κινητικότητα επειδουκνεί και καλύτερο αποικισμό της ρίζας της τομάτας (Martinez-Granero, et al., 2006). Οι Andersen et al. (Andersen, et al., 2003), έδειξαν ότι ο συνδυασμός της ικανότητας ομαδικής κινητικότητας και η παραγωγή ενός κυκλικού λιποπεπτιδίου, της αμφισίνης, από το στέλεχος *DSS73* της *Pseudomonas sp.* παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum*. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μέχρι σήμερα τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που παρουσιάζουν βιολογική ανταγωνιστικότητα έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων ανήκουν στα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas aeruginosa* (McSpadden Gardener, 2007).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε επίσης και η σχέση του φαινοτύπου της ομαδικής κινητικότητας με την ανταγωνιστική δράση των συγκεκριμένων στελεχών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το στέλεχος P14 αναστέλλει και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sp.* και *Rhizoctonia sp.* αποτελεσματικά τόσο σε συνθήκη που ευνοούν την ομαδική κινητικότητα, δηλαδή σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% (swarming plates), όσο και σε τρυβλία που έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ συγκέντρωσης 1,5%. Το βακτηριακό στέλεχος P21 φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων πιο αποτελεσματικά σε τρυβλία με άγαρ συγκέντρωσης 0,5% (swarming plates). Η αναστολή της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων πιθανά οφείλεται στην έκκριση χημικών ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση από τα στελέχη αυτά ή στην παραγωγή εξαερώσιμων ενώσεων όπως είναι το υδροκυάνιο. (Haas, et al., 2005). Η διερεύνηση της ταυτότητας των αντιμικροβιακών παραγόντων ή άλλων μεταβολιτών που παρεμποδίζουν τη δράση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα, που πιθανά παράγουν και εκκρίνουν τα δύο αυτά βακτηριακά στελέχη θα μπορούσε να είναι αντικείμενο μελλοντικής ερευνητικής δουλειάς. Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η μελέτη του κατά πόσο τα δύο αυτά βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν και άλλους φαινοτύπους που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα όπως είναι η επιμήκυνση των κυττάρων και η αύξηση του αριθμού των μαστιγίων.

Η ικανότητα των ριζοβακτηρίων να χρησιμοποιούν τα οργανικά οξέα των εκκριμάτων της ρίζας ως πηγές άνθρακα σχετίζεται με την ανταγωνιστικότητά τους στη ριζόσφαιρα (Goddard, et al., 2001).

Πολλά από τα χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών που χρησιμοποιούνται ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (αποικισμός της ρίζας, κινητικότητα, παραγωγή αντιμυκητιακών μεταβολιτών, παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών) εξαρτώνται από την «παραλλαγή φάσης» (phase variation). Η παραλλαγή φάσης, συνίσταται στον «προγραμματισμό» ορισμένων γονιδίων τα οποία θα υποβληθούν εσκεμμένα σε μεταλλάξεις και μέσω αυτού του μηχανισμού παράγονται φαινότυποι που οδηγούν σε μεικτούς πληθυσμούς άρα κατά συνέπεια και σε μεγαλύτερη παραλλακτικότητα και ικανότητα επιβίωσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει προβλέψιμες και προκαθορισμένες αλλαγές στη δομή του βακτηριακού DNA που μεσολαβεί της έκφρασης των φαινοτύπων για την αντιστροφή μιας κατάστασης (περιβαλλοντικής πρόκλησης) και της δημιουργίας προσαρμοστικού πλεονεκτήματος στα διάφορα περιβάλλοντα. Το φαινόμενο της

«παραλλαγής της φάσης» είναι ένας από τους λόγους για τον οποίο ενώ πολλά βακτηριακά στελέχη επιδεικνύουν ευεργετικές ιδιότητες σε συνθήκες εργαστηριακής καλλιέργειας, ένας μικρότερος αριθμός είναι επιτυχημένα σε συνθήκες εργαστηριακών θερμοκηπίων και ένας ακόμα μικρότερος αριθμός είναι λειτουργικός σε πρακτικές συνθήκες όπως για παράδειγμα σε εμπορικά θερμοκήπια ή στο πεδίο. Επιπλέον, η ρύθμιση της σύνθεσης των δευτερογενών είναι αρκετά πολύπλοκη και δεν είναι πλήρως κατανοητή (Haas, et al., 2003; Duffy, et al., 1999). Για παράδειγμα, η θερμοκρασία ανάπτυξης, η αλατότητα, η συγκέντρωση ιόντων τρισθενούς σιδήρου, φωσφορικών, θειικών και ιόντων αμμωνίας επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη σύνθεση της φεναζίνης-1-καρβοξαμίδιο στην *Pseudomonas chlororarhis* στέλεχος *PCL1391* (Van Rij, et al., 2004). Ένας ακόμη λόγος είναι ότι τα αντιβιοτικά που παράγονται από τα βακτηριακά στελέχη μπορεί να αποικοδομηθούν, όπως για παράδειγμα η 2,4 –διακέτυλο-φλωρογλουκινόλη που παράγεται από το στέλεχος *P. fluorescens CHA0*, παράγει επίσης και ένα ένζυμο που αφαιρεί τον αιθυλεστέρα από την η 2,4 –διακέτυλο-φλωρογλουκινόλη, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα παράγωγο με μικρότερη δραστηριότητα (Bottiglieri, et al., 2006). Επιπρόσθετα, οι AHLs που είναι τα μόρια σιγνάλα, απαραίτητα για την παραγωγή αντιμυκητιακών μεταβολιτών και διάφορων έξω-ενζύμων, μπορεί να αποικοδομηθούν από ένζυμα ανταγωνιστικών βακτηρίων. Οι Van Rij et al. (Van Rij, et al., 2004) έδειξαν ότι ο μεταβολίτης φουσαρικό οξύ, που παράγεται από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium spp.*, αναστέλλει τη σύνθεση των φεναζινών στην *Pseudomonas chlororarhis* στέλεχος *PCL1391* και ως εκ τούτου καταργεί τη δραστηριότητα της ως παράγοντα βιολογικού ελέγχου. Τέλος, κάποια παθογόνα αμύνονται και γίνονται ανθεκτικά. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα εύρος πιθανών μηχανισμών, όπως ενζυματική απενεργοποίηση της αντιμυκητιακής τοξίνης μέσω χημικής τροποποίησης, καταστολή των γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση της τοξίνης, τροποποίηση του στόχου της αντιμυκητιακής τοξίνης και έκκριση της αντιμυκητιακής τοξίνης (Duffy, et al., 2003).

Βιβλιογραφία

- Acea, M.L. and Alexander, M.** (1988). Growth and survival of bacteria introduced into carbon amended soil. *Soil Biol Biochem.*,20: 703-709.
- Adewoye, L.O. and Worobec, E.A.** (2000). Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 4(13):323-330.
- Adhikari, T.B. [et al.]** (2001). Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can J Microbiol.*, 47:916-924.
- Aendekerck, S. [et al.]** (2005)The *MexGHI-OpmD* multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*,151:1113-1125.
- Agrios,N. G.** (1996) *Plant Pathology*. San Diego, CA, USA : Academic Press, 4th edition.
- Akiyoshi, D.E., Regier, D.A. and Gordon, M.P.** (1987). Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas spp.*.*J.Bacteriol.*,9(169):4242-4248.
- Alberti, L. and Harsey, R.M.** (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J.Bacteriol.*,172:4322-4328.
- Alexander, G., Rohr, R. and Bally,R.** (1999).A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl.Environ.Microbiol.*,65:4701-4704.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402
- Andersen,J.B., Koch, B. and Nielsen,T.H.** (2003).Surface motility in *Pseudomonas sp.DSS73* is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology*,149:37-46.
- Andrews,S.C., Robinson, A.K. and Rodriguez-Quinones, F.** (2003). Bacteria iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.*,27:215-237.
- Anjaiah,V.** (2004). Biological control mechanisms of fluorescent *Pseudomonas* species involved in control of root diseases of vegetable/fruits. In: Kluwer Academic Publishers(Ed.), Disease Management of Fruits and Vegetables.
- Anzai, Y. [et al.]** (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16S rRNA sequence. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*,50: 1563-1589.

- Arora, S.K. [et al.]** (1997). A transcriptional activator, *FleQ*, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.*, 179: 5574-5581.
- Arora, S.K. [et al.]** (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.*, 73: 4395-4398.
- Audenaert, K. [et al.]** (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 15: 1147-1156.
- Azon-Aguilar, C. and Barea, J. M.** (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potential. *Scienta Horticulturae*, 68: 1-24.
- Bahme, J.B. and Schroth, M.N.** (1987). Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*, 77: 1093-1100.
- Bais, H.P. [et al.]** (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci*, 9: 26-32.
- Bakker, P.A.H.M., Schippers, B. and Weisbeek, P.J.** (1998). Siderophore production by plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *J. Plant Nature*, 11: 925-933.
- Baltz, R.H.** (2009). Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol.*, 13: 144-151.
- Bangera, G. M. and Thomashow, S. L.** (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J. Bacteriol.*, 181: 3155-3163.
- Barley, D.E.** (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can. J. Microbiol.*, 26: 146-154.
- Bartel, B.** (1997). Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 48: 51.
- Bashan, Y. and Holguin, G.** (1997). Proposal for the division of plant-growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1225-1228.
- Becker, J. O. and Schwinn, F.** (1993). Control of soilborne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pesticide science*, 37: 355-363.
- Belas, R. and Suvanasthi, R.** (2005). The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves *FliL*, a flagellar basal body protein. *J. Bacteriol.*, 187: 6789-6803.
- Belas, R., Simon, M. and Silverman, M.** (1986). Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 167: 210-218.

- Bell, C.R., Dickie, G.A. and Chan, J.W.Y.F.** (1995). Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gal disease in planta. *Am J Enol Vit*, 46: 499-508.
- Berg, H.C. and Turner, L.** (1979). Movement of microorganisms in viscous environments. *Nature*, 278: 349-351.
- Betri, A.D. [et al.]** (2007). Identification of a biosynthetic gene cluster and six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae pv.tomato* strain DC3000. *J.Bacteriol.*, 189: 6312-6323.
- Bitter, W. [et al.]** The ferric-pseudobactin receptor *PupA* of *Pseudomonas putida WCS358*: homology to *TonB*-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol Microbiol.*, 5: 647-655.
- Blomberg, G. V. and Lugtenberg, B.J.J.** (2001). Molecular basis of plant growth promotion by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biotechnology*, 4: 343-350.
- Bottiglieri, M. and Keel, C.** (2006). Characterization of *PhlG*, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens CHA0*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 418-427.
- Bowen, G.D. and Rovira, A. D.** (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.*, 66: 1-102.
- Brand, J. [et al.]** (1991). Isolation and characterization of a superior potato root-solonizing *Pseudomonas* strain. In: Plant growth-promoting rhizobacteria: progress and prospects. *IOBC/WPRS*.
- Brazas, M.D. [et al.]** (2007). Role of *Lon*, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51: 4276-4283.
- Broadbent, P., Baker, K. F. and Waterworth, Y.** (1971). Bacteria and actinomycetes antagonistic to root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biology*, 24: 925-930.
- Brown, I.I. and Hase, C.C.** (2001). Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 183: 3784-3790.
- Burch, A. [et al.]** (2011). *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *Journal of Bacteriology*: 1287-1298.
- Burch, A.Y. [et al.]** (2010). Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 5363-5372.
- Burpee, L. L.** (1990). The influence of abiotic factors on biological control of soilborne pathogenic fungi. *Can. J. Plant Pathol.*, 12: 308-317.
- Buysens, S. [et al.]** (1996). Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol.*, 62: 865-871.

- Byng, G.S. [et al.]** (1983). The evolutionary pattern of aromatic amino acid biosynthesis and the emerging phylogeny of pseudomonad bacteria. *J.Mol.Evol.*, 19: 272-282.
- Caiazza, N. [et al.]** (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa PA14*. *Journal of Bacteriology*, 9(189): 3603-3612.
- Caiazza, N.C. and O'Toole, G.A.** (2004). *SadB* is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa PA14*. *J.Bacteriol.*, 186: 4476-4485.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M. and O'Toole, G.A.** (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, 187: 7351-7361.
- Camacho-Carvajal, M.M. [et al.]** (2002). Characterization of NADH dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens WCS365* and their role in competitive root colonization [Άρθρο] // *Mol Plant-Microbe Interact.*, 15: 662-671.
- Capdevila S. [et al.]** (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens F113* genes implicated in flagellar synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*, 150: 3889-3897.
- Cartileaux, F.** (2003). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a genetal effect on disease resistance. *Plant Journal*, 36: 177-188.
- Casaz, P.** (2001). The *Pseudomonas fluorescens* transcription activator *AdnA* is required for adhesion and motility. *Microbiology*, 147: 355-361.
- Cavalier-Smith, T.** (2004). Only six kingdoms of life. *Proc.R.Soc.Lond B* 271: 1251-1262.
- Cazorla, F.M. [et al.]** (2006). Biocontrol of avocado *Dematophora* root rot by the antagonistic *Pseudomonas fluorescens PCL1606* correlates with the production of 2-hexyl-5-propyl-resorcinol. *Mol Plant Microbe Interact.*, 19: 418-428.
- Chanway, C.P. [et al.]** (2000). Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *For Ecol Manage*, 133: 81-88.
- Chasteen, N.D.** (1998). Ferritin. Uptake, storage and release of iron. *Met Ions Biol Syst.*, 35: 479-514.
- Chen, C. [et al.]** (1995). Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Control.*, 5: 83-91.
- Chen, R. [et al.]** (2009). Role of the σ -dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J.Bacteriol.*, 191: 5775-5784.
- Chevance, F.F.V. and Hughes, K.T.** (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat.Rev.Microbiol.*, 6: 455-465.

Chin-A-Woeng, T.F. [et al.] (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant Microbe Interact.*,13: 1340-1345.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (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

Compant, S. [et al.] (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*,71: 4951-4959.

Cook, J. R. and Baker, F. K. (1983). The nature and practise of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society Press*: 126-144. St.Paul, Minnesota.

Copeland, M. and Weibel, D. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter* ,5(6): 1174-1187.

Copeland, M.F. [et al.] (2010). Studying the dynamics of flagella in multicellular communities of *Escherichia coli* by using biarsenical dyes. *Appl. Environ. Microbiol.*,76: 1241-1250.

Cornellis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,86: 1637-1645.

Couillerot, O. [et al.] (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 505-512.

Cuppels, A. [et al.] (1987). The constitution and properties of a pyochenin-zinc complex. *Can J Chem.*,65: 2126-2130.

D'aes, J. [et al.] (2011). Biological control of *Rhizoctonia* root rot on bean by phenazine and cyclic-lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology*, 101: 996-1004.

Darnton, N.C. [et al.] (2010). Dynamics of bacterial swarming. *Biophys. J.*, 98: 2082-2090.

Dasgupta, N. [et al.] (2002). *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is $\sigma 70$ dependent and is downregulated by *Vfr*, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.*,184: 5240-5250.

Dasgupta, N. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*,50: 809-824.

Dasgupta, N., Arosa, S.K. and Ramphal, R. (2000). *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*,182: 357-364.

Davies, D.G. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*,280: 295-298.

De Bruijn, I. and Raaijmakers, J.M. (2009a). Diversity and functional analysis of the *LuxR*-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*,75: 4753-4761.

De Bruijn, I. [et al.] (2007). Genome-based discovery-structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.*,63: 417-428.

De Bruijn, I. [et al.] (2008). Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*,190: 2777-2789.

De Souza, J.T. [et al.] (2003a). Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microb.*,69: 7161-7172.

De Souza, J.T., Mazzola, M. and Raaijmakers, J.M. (2003b). Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol.*,5: 1328-1340.

De Souza, J.T. (2003). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*,93: 966-975.

De Vos, P. [et al.] (1989). Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid:ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,39: 35-49.

De Vos, P. and De Ley, J. (1983). Intra- and intergenetic similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,33: 487-509.

De Vos, P., Goor, M. and De Ley, J. (1985). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Intl. J. Syst. Bacteriol.*,35: 169-184.

De Weert, S. [et al.] (2002). Flagella-driven chemotaxis toward exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact.*,15: 1173-1180.

De Weger, L.A. [et al.] (1987). Flagella of a plant-growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.*,169: 2769-2773.

De Beer, D. [et al.] (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.*,43: 1131-1138.

Debode, J. [et al.] (2006). Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium* microsclerotia by *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Microbiol.*,103:1184-1196.

Dekkers, L.C. [et al.] (2000). The *sss* colonization gene of the tomato- *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* biocontrol startin *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild type *Pseudomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.*,13: 1177-1183.

Dekkers, L.C. [et al.] (1998b). Role of the O-antigen lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant-Microbe Interact.*,11: 763-771.

Delaney, M. [et al.] (2001). *phzO*, a Gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology*,183: 318-327.

Delany, I. [et al.] (2000). Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiol.*,146: 537-546.

Deziel, E. [et al.] (2003). *rhlA*, is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*:3-(3-hydroxyalkanoic) alkanolic acids(HAAs) the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149: 2005-2013.

Deziel, E., Comeau, Y. and Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J.Bacteriol.*,183: 1195-1204.

Douglas, W., James, J. R. and Gutterson, N. (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 1183-1189.

Doyle, R. (2006). Microbial growth in biofilms, part A: developmental and molecular biological aspects. *Methods Enzymol.*: 336.

Doyle, T.B., Hawkins, A.C. and Mc Carter, L.L. (2004). The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*,186: 6341-6350.

Dubern, J.F. [et al.] (2008). Genetic and functional characterization of the gene cluster directing biosynthesis of *putisolvin I* and *II* in *Pseudomonas putida* PCL1445. *Microbiology*, 154: 2070-2083.

Dubern, J.F., Lugtenberg, B.J. and Bloemberg, G.V. (2006). The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides *putisolvins I* and *II*. *J.Bacteriol.*,188: 2898-2906.

Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J.M. (2003). Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu.Rev.Phytopathol.*,41: 501-538.

Duffy, B.K. and Defago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ.Microbiol.*,65: 2429-2438.

Eberl, L. [et al.] (1996). Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J.Bacteriol.*, 178: 554-559.

- Eberl, L., Molin, S. and Givsov, M. (1999). Surface motility of *Serratia marcescens* MG1. *J.Bacteriol.*, 181: 1703-1712.
- Emanuele, M.C., Scaloni, A. and Lavermicocca, P. (1998). Corpeptins, new bioactive lipopeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata* *FEBS Lett.*, 433: 317-320.
- Euzeby, J.P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet *Int J Syst Bacteriol.*, 47(2): 590-592.
- Fiore, A., Mannina, L. and Sobolev, A.P. (2008). Bioactive lipopeptides of ice-nucleating snow bacterium *Pseudomonas syringae* 31R1. *FEMS Microbiol Lett.*, 286: 158-165.
- Friedman, L. and Kolter, R. (2004b). Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J.Bacteriol.*, 186: 4457-4465.
- Friedman, L. and Kotler, R. (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* P14 biofilms. *Mol.Microbiol.*, 51: 675-690.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev.Genet.*, 35: 439-468.
- Furness, R.B. [et al.] (1997). Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the *flcDC* master operon controlled cell division and flagellum synthesis. *J.Bacteriol.*, 179: 5585-5588.
- Fux, C.A. [et al.] (2003). Bacterial biofilms-a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev.Anti-Infective Ther.*, 1: 667-683.
- Garret, E.S., Perlegas, D. and Wozniak, D.J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor *AlgT*. *J.Bacteriol.*, 181: 7401-7404.
- Gavin, R. [et al.] (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol.Microbiol.*, 43: 383-397.
- Geels, F.P. and Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathol Z.*, 108: 193-206.
- Gerard, J. [et al.] (1997). Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J Nat Prod.*, 60: 223-229.
- Germida, J.J. and Siciliano, S.D. (2001). Taxonomy diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Bio Fert Soils.*, 33: 410-415.
- Ghelardi, E. [et al.] (2007). Swarming behaviour of and hemolysins BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 73: 4089-4093.

- Girgis, H.S [et al.]** (2007). A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet.*, 3: 154-166.
- Glandorf, D.C.M. [et al.]** (1994). Agglutination, adherence, and root colonization by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1726-1733.
- Goddard, V.J. [et al.]** (2001). Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: a community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant Soil.*, 232: 181-193.
- Graham, P. H. and Vance, C. P.** (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs *Field Crops Research.*, 65: 93-106.
- Grosch, R. [et al.]** (2005). Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kuhn on lettuce and potato. *Can J Microbiol.*, 51: 345-353.
- Gross, H. [et al.]** (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem Biol.*, 14: 53-63.
- Gross, H. and Loper, L.** (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp.* *Nat. Prod. Rep.*, 26: 1408-1446.
- Haas, D. and Degaf, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.*, 3: 307-319.
- Haas, D. and Keel, C.** (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*: 117-153.
- Hallmann, J. [et al.]** (1998). Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem.*, 30: 925-937.
- Hallmann, J. [et al.]** (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.*, 43: 895-914.
- Handelsman, J. and Stabb, V.** (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.
- Harrison, J.J., Turner, R.J. and Ceri, H.** (2005). Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.*, 7(7): 981-994.
- Harsey, Rasika** (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 249-273.
- Harsey, R.M. and Matsuyama, T.** (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8631-8635.

- Harsey, R.M.** (1994a). Bees aren't the only ones:swarming in gram-negative bacteria. *Mol.Microbiol.*,13: 389-394.
- Hasan, K.A.** (2010). Inactivation of the *GacA* response regulator in *Pseudomonas fluorescens Pf-5* has far-reaching transcriptomics consequences. *Environ.Microbiol.*, 12: 899-915.
- Hassett, D.J. [et al.]** (2000). A protease-resistant catalase *KatA*, released upon cell lysis during stationary phase is essential for aerobic survival in *P.aeruginosa oxyR* mutant at low cell densities. *J.Bacteriol.*, 182 (16): 4557-4563.
- Heeb, S. and Haas, D.** (2001). Regulatory roles of the *GacS/GacA* two-component system in the plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol.Plant.Microbe In.*, 14: 1351-1363.
- Henrichsen, J.** (1972). Bacterial surface translocation:a survey and classification. *Bacteriol. Pev.*, 36: 478-503.
- Henrichsen, J. and Bloom, J.** (1975). Examination of fibrillation of some gram-negative rods with and without twitching and sliding motility. *Acta. Pathol.Microbiol.Scand.[B]*,83: 161-170.
- Hernandez, E., Kappler, A. and Newman, K.** (2004). Phenazines and their other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl.Environ.Microbiol.*, 70: 921-928.
- Hiramatsu, F. [et al.]** (2005). Patterns of expansion produced by a structured cell population of *Serratia marcescens* in response to different media. *Microbes Environ.*,20: 120-125.
- Hirsch, E.B. and Tam, V.H.** (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.*, 10: 441-451.
- Hoener, J.F.M.** (1964). Cellular changes accompanying the swarming of *Proteus mirabilis*.Observation of living cultures. *Can.J.Microbiol.*,10: 1-9.
- Hoener, J.F.M.** (1965). Development of flagella by *Proteus mirabilis*. *J.Gen.Microbiol.* ,40: 29-62.
- Hofte, M. and De Vos, P.** (2006). Plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Plant-Associated Bacteria*, 3: 507-533.
- Howie, W.J., Cook, R.J. and Weller, D.M.** (1987). Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonas suppressive to take-all. *Phytopathology*, 77: 86-292.
- Huang, J.J. [et al.]** (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Appl.Environ.Microbiol.*, 69: 5941-5949.
- Iavicoli, A. [et al.]** (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root rot inoculation with *Pseudomonas fluorescens CHA0*. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 16: 851-858.

- Ingham, C.J. and Ben Jacob, E.** (2008). Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiol.*,8: 36.
- Ishimaru, C.A. and Loper, J.E.** (1993). Biochemical and genetic analysis of siderophores produced by plant-associated *Pseudomonas* and *Erwinia* species. *In: Iron chelation in plant and soil microorganisms*, San Diego, Academic Press.
- Jackson, K.D. [et al.]** (2004). Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J.Bacteriol.*,186: 4466-4475.
- Jones, B.V. [et al.]** (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cells rafts and role of swarming in catheter-associated urinary track infection. *Infect.Immun.*,72: 3941-3950.
- Jukevitch, E., Hadar, Y. and Chen, Y.** (1992). Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rizosphere bacteria. *Appl.Environ Microbiol.*, 58: 119-124.
- Julkowska, D. [et al.]** (2004). Branch swarming patterns on synthetic medium formed by wild type *Bacillus subtilis* 3610:detection of different cellular morphologies and constellations of cell as the complex architecture develops. *Microbiology*, 150: 1839-1849.
- Julkowska, D. [et al.]** (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type:critical effects of surfaction and the composition of the medium. *J.Bacteriol.*, 187: 65-76.
- Kaur, R. [et al.]** (2006). Gluconic acid, an antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. *Phytochemistry*, 67: 595-604.
- Kawakami, T. [et al.]** (2009). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ.Microbiol.*,12(6): 1399-1412.
- Kearns Daniel** (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.*, 8 : 634-644.
- Kearns, D.B. and Losick, R.** (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 19: 3083-3094.
- Kearns, D.B. and Losick, R.** (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.*, 49: 581-590.
- Keel, C. [et al.]** (1989). Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobacco black rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 79: 584-589.
- Keel, C.** (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 5: 4-13.
- Keer, R. J. [et al.]** (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 385-387.

- Kim, W. [et al.]** (2003). Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J.Bacteriol.*, 185: 3111-3117.
- Kim, W. and Surette, M.G.** (2005). Prevalence of surface swarming behaviour in *Salmonella*. *J.Bacteriol.*, 187: 6580-6583.
- Kim, Y.-K. and McCarter L.L.** (2000). Analysis of the polarflagellar gene system of *V.parahaemolyticus*. *J.Bacteriol.*, 182: 3693-3704.
- Kinscherf, T.G. and Willis, D.K.** (1999). Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS(lemA)* and *gacA* but not the acylhomoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J.Bacteriol.*, 181: 4133-4136.
- Kirisits, M.J. [et al.]** (2005). Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl.Environ.Microbiol.*, 71: 4809-4821.
- Kirov, S.M. [et al.]** (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J.Bacteriol.*, 184: 547-555.
- Kloepper, J.W. [et al.]** (1999). Plant-root bacteria interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Austral.Plant Pathol.*, 28: 21-26.
- Kloepper, W. [et al.]** (1980b). Enhancing plant growth by siderophore produced by plant-growth promoting rhizobacteria. *Nature* , 286: 885-886.
- Kloepper, W. [et al.]** (1980a). *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.*,4: 317-320.
- Kloepper, W. J., Wei, G. and Tuzun, S.** (1992). Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant-growth promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: Biological Control of plant diseases. [Tjamos E.C.,Papavizas G.C.and Cook R.J. *Plenum Press*].
- Kohler, T. [et al.]** (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J.Bacteriol.*,182: 5990-5996.
- Koster, M. [et al.]** (1993). Identification and characterization of the *pupB* gene encoding an inducible gerric-pseudobactin receptor of *Pseudomonas putida* WSC358. *Mol Microbiol.*,8: 591-601.
- Krause, A. [et al.]** (2006). Complete genome of the mutualistic, N-2-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.*, 24: 1385-1391.
- Krieg, Noel** (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams&Wilkins(eds).

Kruijt, M., Tran, H. and Raaijmakers, J.M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant-growth promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl Microbiol.*, 107: 546-556.

Kuiper, I. [et al.] (2001). Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 14: 1096-1101.

Kuiper, I., Legendijk, E.L. and Pickford, R. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, *putisolvin I* and *II*, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.*, 51: 7-113.

Kuklinsky-Sorbal, H.L. [et al.] (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil.*, 273: 91-99.

Kuklinsky-Sorbal, H.L. [et al.] (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.*, 6: 1244-1251.

Kwok, O.C.H. [et al.] (1987). Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology*, 77 : 1206-1212.

Lai, H.C. [et al.] (1998). A swarming defective mutant of *Proteus mirabilis* lacking a putative cation-transporting membrane *P*-type *ATPase*. *Microbiol.*, 144: 1957-1961.

Lai, H.C. [et al.] (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.

Lalande, R. [et al.] (1989). Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil.*, 115: 7-11.

Lam, S.T. (1990). New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Microbial attributes associated with root colonization New York: Baker, R.R., Dunn, P.E..

Lamont, I.L. and Martin L.W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 149: 833-842.

Lavermicooca, P. [et al.] (1997). Biological properties and spectrum activity of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* toxins. *Physiol Mol Plant.*, 50: 129-140.

Le, N., Kruijt, M. and Raaijmakers, M. (2012). Involvement of phenazines and lipopeptides in interactions between *Pseudomonas* species and *Sclerotium roflsii*, casual agent of stem rot disease on groundnut. *J. Appl. Microbiol.*, 112: 390-403.

- Lebuhn, M., Heulin, T. and Hartman, A.** (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Phaenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecology*, 22: 325-334.
- Lee, S.** (2009). Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* , 106: 14570-14575.
- Lemanceau, P. [et al.]** (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *pseudobactin 358* upon pathogenic *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi*. *Appl Environ Microbiol.*: 59.
- Lemanceau, P. [et al.]** (1992). Effect of *pseudobactin 358* production by *Pseudomonas putida WCS358* on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by non pathogenic *Fusarium oxysporum Fo47*. *Appl Environ Microbiol.*, 8: 2978-2982.
- Lewenza, S. [et al.]** (2005). Construction of a mini *-Tn5-luxCDABE* mutant library in *Pseudomonas aeruginosa PAO1*: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Res.*, 15: 583-589.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T.** (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl.Environ.Microbiol.*,69: 1875-1883.
- Loh, J. [et al.]** (2002). Quorum sensing in plant associated bacteria. *Curr.Opin.Plant.Biol.*,5: 285-290.
- Loper, J. E. and Buyer, J. S.** (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces *Mol Plant Microbe Interact.*, 4: 5-13.
- Loper, J.E., Haack, C., and Schroth, M.N.** (1985). Population dynamics in the rizosphere of potato(*Solanum tuberosum L.*). *Appl. Environ.Microbiol.*,49: 416-422.
- Lu, S.E., Scholz-Schroeder,B.K. and Gross, D.C.** (2002). Characterization of the *salA*, *syrF*, *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster *pf* *Pseudomonas syringae pv.syringae*. *Mol.Plant Microbe In.*, 15: 43-53.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F.** (2009). Plant-Growth Promoting Rhizobacterial. *Annual Review of Microbiology*, 63: 542-556.
- Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V.**(2004) *Pseudomonas* vol.1.In: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Lugtenberg, B.J.J. and Van Alphen, L.** (1983). Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochem.Biophys.Acta.*, 737: 51-115.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V. and Simons, M.** (1999). Tomato seed and root exudates sugars:composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains, and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol.*,1: 439-466.

- Lugtenberg, J., Bloemberg, V. and Chin-A-Woeng, T.F.C.** (2003). Phenazines and their role in the biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist.*,157: 503-523.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B.** (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versalite opportunist. *Microbes Infect.*,2(9): 1051-1060.
- Ma, L. [et al.]** (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional *Psl* variants reveals roles for the *Psl* polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J.Bacteriol.*,188: 8213-8221.
- Macnab, R.** (1996). Flagella and motility In: *Eschericia coli* and *Salmonella*:Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C. [et al.]. Washington, ASM(eds).
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J.**(2005). Brock Biology of Microorganisms. Για την ελληνική έκδοση: Πανεπιστημιακές εκδόσεις. *Pearson Education INC.*
- Mandryk, M. N., Kolomiets, E. S. and Dey, E. S.** (2007). Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1. *Polish journal of microbiology*, 4: 245-250.
- Mantelin, S. and Touraine, B.** (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J.Exp.Bot.* 55(394): 27-34.
- Mark, G. [et al.]** (2006). Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiol Ecol.*,56: 167-177.
- Marrug, J.D. [et al.]** (1989). Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore uptake in *Pseudomonas putida* WSC358. *J Bacteriol.* , 171: 2819-2826.
- Marshall, B.** (2001). The *adnA* transcriptional factor affects persistence and spread of *Pseudomonas fluorescens* under natural field conditions. *Appl.Environ.Microbiol.*, 67: 852-857.
- Martinez, A., Torello, S. and Kolter, R.** (1999). Sliding motility in mycobacteria. *J.Bacteriol.*,181: 7731-7738.
- Martinez-Granero, F., Rivilla, R. and Martin, M.** (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl.Environ.Microbiol.*,72: 3429-3434.
- Mastropaolo, M. [et al.]** (2012). Novel genes involved in *Pseudomonas fluorescens* PFO-1 motility and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 12: 4318-4329.
- Matilla, M.A. [et al.]** (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ.Microbiol.*, 9: 1842-1850.
- Matsukawa, M. and Greenberg, E.P.** (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J.Bacteriol.*,186: 4449-4456.

- Matsushita, K. [et al.]** (2002). Quinoproteins:structure, function and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58: 13-22.
- Matsuyama, T. [et al.]** (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J.Bacteriol.*,174: 1769-1776.
- Matsuyama, T. [et al.]** (2000). Dynamic aspects of the structured cell population in swarming colony of *Proteus mirabilis*. *J.Bacteriol.*,182: 385-393.
- Matsuyama, T. [et al.]** (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J.Gen.Microbiol.*,132: 865-875.
- Matsuyama, T. and Matsuyama, M.** (2001). Population morphogenesis by cooperative bacteria. *Forma.*, 16: 307-326.
- Matsuyama, T., Bhasin, A. and Harsey, R.M.** (1995). Mutation analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J.Bacteriol.*,177: 9897-991.
- Matsuyama, T., Sogawa, M. and Nakagawa, Y.** (1989). Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiol.Lett.*, 52: 243-246.
- Mattick, J.S.** (2002). Type IV pilli and twitching motility. *Annu.Rev.Microbiol.*, 56 : 289-314.
- Maurhofer M. [et al.]** (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88: 678-684.
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B. R.** (1999). Effect of wild type mutant Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 18: 49-53.
- Mayfield, C.I. and Inniss, W.E.** (1997). A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can.J.Microbiol.*, 23: 1311-1313.
- McBride, M.J.** (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu.Rev.Microbiol.*, 55.: 49-75.
- McCarter, L.** (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J.Bacteriol.Biotechnol.*, 1: 51-57.
- McCarter, L.L and Wright, L.E.** (1993). Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J.Bacteriol.*,175: 3361-3371.
- McCurter, L** (2006). Regulation of flagella. *Curr.Opin.Microbiol.*,9: 180-186.
- McSpadden Gardener, B.** (2007). Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* in agricultural systems. *Phytopathology*, 97:221-226.

- Mendes, R. [et al.]** (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome of disease-suppressive bacteria. *Science*, 332: 1097-1100.
- Merino, S., Shaw, J.G. and Tomas, J.M.** (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol.Lett.*, 263: 127-135.
- Merritt, J.H. [et al.]** (2007). *SadC* reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J.Bacteriol.*, 189: 8154-8164.
- Merz, A.J., So, M. and Sheetz, M.P.** (2002). Pilus reaction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407: 98-102.
- Meyer, M. and Abdallah, A.** (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J.Gen.Microbiol.*, 107: 319-328.
- Michaels, B. and Tisa, L.S.** (2011). Swarming motility of *Photobacterium temperate* is influenced by environmental condition and uses the same flagella as that used in the swimming motility. *Can.J.Microbiol.*, 57: 196-203.
- Mignot, T.** (2007). The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol. Life Sci.*, 64: 2733-2745.
- Migula, W.** (1894). Uber ein neues System der Bakterien. *Arb.Bakteriol.Inst.Karlsruhe*, 1: 235-238.
- Mireles, J.R., Toguchi, A. and Harsey, R.M.** (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *J.Bacteriol.*, 183: 5848-5854.
- Mirleau, P. [et al.]** (2000). Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol Ecol.*, 34: 35-44.
- Mocali, S. [et al.]** (2003). Fluctuation of bacteria isolated from *elm* tissues during different season and from different plant organs. *Res Microbiol.*, 154: 105-114.
- Moore, E.R.B. [et al.]** (1996). Determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of *Pseudomonas (sensu stricto)* and estimation of intrageneric relationships. *Syst.Appl.Microbiol.*, 19 : 478-492.
- Moore, E.R.B. [et al.]** (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In: *The Prokaryotes*, 3rd edition Dworkin, S. [et al.]. New York, Springer-Verlag(eds).
- Morris, C.E., Georgakopoulos, D.G. and Sands, D.C.** (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J.Phys.IV France*, 121: 87-103.
- Morrissey, J.P. [et al.]** (2002). Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 599-606.

- Morrisson, R.B. and Scott, A.** (1966). Swarming of *Proteus*-a solution to an old problem. *Nature*, 211: 255-257.
- Mossialos, D. [et al.]** (2006). Defects in a quinol oxidase lead to loss of *KatC* catalase activity in *Pseudomonas aeruginosa*: *KatC* activity is temperature dependent and it requires an intact disulphide bond formation system. *Biochem Biophys Res Commun.*,3: 697-702.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.**(1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp.Quant. Biol.*,51:263-273.
- Munsch, P. [et al.]**. (2002). *Pseudomonas constantinii sp.nov.*, another casual agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1973-1983.
- Navazo, A.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens F113*. *Microb.Biotechnol.*, 2: 489-498.
- Nehl, B. D., Allen, J. S. and Brown, F. J.** (1996). Deleterious rhizosphere bacteria: an intergrating perspective. *Applied Soil Ecology*,5: 1-20.
- Neilands, J.B. and Leong, S.A.** (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev Plant Physiol.*,37: 187-208.
- Nejad, P. and Johnson, P.A.** (2000). Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol Control.*,18: 208-215.
- Nelson, K.E. [et al.]**. (2002). Complete genome comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putinda KT2440*. *Environ. Microbiol.*,4: 799-808.
- Nogales, J. [et al.]** (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti fadD* mutant reveals the role of *rhizobactin 1021* biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics*,11: 157-173.
- Nybroe, O. and Sorensen, J.** (2004). Production of cyclic lipopeptides by fluorescent *Pseudomonas*. In: *Pseudomonas, Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ochsner, U.A. and Reiser, J.** (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 92: 6424-6428.
- Ochsner, U.A. [et al.]** (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: *OxyR*-dependent regulation of *katB-ankB ahpB* and *ahpC-ahpF*. *J.Bacteriol.*,16(182): 4533-4544.
- Ongena, M. [et al.]** (2007). Surfactin and fegysin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ.Microbiol.*, 9: 1084-1090.

- Ongena, M. [et al.]**. (2004). Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a non pathogenic *Pseudomonas* strain. *Mol.Plant Microbe Interact.*,17: 1009-1018.
- Ongena, M. and Jacques, P.** (2008). *Bacillus* lipopeptides:versalite weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*,16: 115-125.
- O'Rear, J., Alberti, L. and Harshey, R.M.** (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. [et al.]**. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-TN5-lux mutant library. *J.Bacteriol.*,189: 2164-2169.
- Overhage, J. [et al.]**. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increasing production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 8: 2671-2679.
- Oyaizu, H. and Komagata, K.** (1983). Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J.Gen.Appl.Bacteriol.*, 29: 17-40.
- Pal, K. K. and McSpadden Gardener, B.** (2006). Biological control of plant pathogens. DOI:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Palleroni, N. and Noberto. J.** (2010). "The *Pseudomonas* story". *Environ.Microbiol.*,6(12): 1377-1383.
- Palleroni, N.J. [et al.]** (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Intl.J.Syst.Bacteriol.*,3: 333-339.
- Pankhurst, C.L., Johnson, N.W. and Woods, R.G.** (1998). Microbial contamination of dental unit waterlines:the scientific argument. *Int.Dent.J.*,48: 359-368.
- Patrick, J.E. and Kearns D.B.** (2009). Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *J.Bacteriol.*,191: 7129-7133.
- Paulitz, T. [et al.]** (2000). A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. *Journal Chemical Ecology*,26: 1515-1524.
- Paulsen, I.T. [et al.]** (2005). Complete genome sequence of plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol.*,23: 873-878.
- Pearson, M.M. [et al.]** (2010). Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis*. *Infect Immun.*,78: 2834-2845.
- Penyalver, R. [et al.]** (2001). Iron-Binding compounds from *Agrobacterium* spp.: Biological control strain *Agrobacterium* rhizogenes K84, produces a hydroxamate siderophore. *Applied and Environmental Microbiology*,67: 654-664.

Perneel, M. [et al.] (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium spp.* *Environ. Microbiol.*, 10: 778-788.

Phoebe, H. C. (2002). Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J.Antibiot.*,54: 56-65.

Pierson S. L. and Pierson, A. E. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behaviour of bacteria in the environment and biotechnological process. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*,86: 1659-1670.

Pillay, V.K. and Nowak, J. (1997). Inoculum density, temperature and genotype effects on on vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato(*Lycopersicon esculentum L.*) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can J Microbiol.*,43: 354-361.

Pirttila, A.M. [et al.] (2005). Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. *Tree Physiol.*,25: 289-297.

Porter, J.R. (1976). "Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria" *Bacteriological reviews*, 2(40): 260-269.

Quinones, B., Dulla, G. and Lindow, S. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility and virulence in *Pseudomonas syringae* . *Mol.Plant.Microb.Interact.*,18: 682-693.

Quinones, B., Pujol, C.J. and Lindow, S.E. (2004). Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *Mol.Plant.-Microbe Interact.*,17: 521-531.

Raaijmakers, J. [et al.]. (2010). Natural function of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*,34: 1037-1062.

Raaijmakers, J.M. [et al.] (1995a). Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas spp.* *Phytopathology*,85: 1075-1081.

Raaijmakers, J.M., De Bruin, I. and De Kock, M.J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas spp.*:diversity, activity, biosynthesis and regulation. *Mol Plant Microbe Interact.*,19: 699-710.

Raaijmakers, M., Vlami, M. and De Souza, J. (2002). Antibiotic production by bacteria biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*: 537-547.

Ragatz, L. [et al.] (1995). Macroscopic phototactic behaviour of the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Arch.Microbiol.*,163: 1-6.

Rainey, P.B. (1999). Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ Microbiol.*, 1: 243-257.

Ramos, L. J. (2004). *Pseudomonas* (volume 3): Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers (eds).

Rashid, M.H. and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 97: 4885-4890.

Rauprich, O. [et al.] (1996). Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J.Bacteriol.*, 178: 6525-6538.

Recht, J. [et al.] (2000). Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J.Bacteriol.*, 182: 4348-4351.

Recht, J. and Kolter, R. (2001). Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J.Bacteriol.*, 183: 5718-5724.

Reddi, K. T. and Borovkov, V. A. (1969). Mono-di and tri-acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens* *Khim.Prir.Soendin.*, 2: 133.

Redondo-Nieto, M. (2008). Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *J.Bacteriol.*, 190: 4106-4109.

Rehm, B., Kruger, N and Steinbuckel, A. (1998). A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The *PhaG* gene from *Pseudomonas putida* *KT2240* encodes a 3-hydroxyacyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J.Biol.Chem.*, 273: 24044-24051.

Reiter, B. [et al.] (2003). Endophytic *Pseudomonas spp.* populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S rDNA- and 16s rRNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.*, 257: 397-405.

Rezzonoco, F. [et al.] (2005). The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* *KD* targets the phytopathogenic chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 9: 991-1001.

Ritchings, B.W. [et al.] (1995). Cloning and phenotypic characterization of the *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect.Immun.*, 63: 4868-4876.

Robleto, E.A, Lopez-Hernandez, I. and Silby, M.W. (2003). Genetic analysis of the *AdnA* regulon in *Pseudomonas fluorescens* nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J.Bacteriol.*, 185: 453-460.

Rodriguez, Z. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.

Roongsawang, N. [et al.] (2003). Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrfactin synthetase from *Pseudomonas sp.MIS38*. *Chem Biol.*, 10: 869-880.

- Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. (2006). Bacterail endophytes and their interactions with hosts. *Mol.Plant-Microbe Interact.*,19: 827-837.
- Rucker, R., Chohanadisai, W. and Nakano, M. (2009). Potential physiological importance of pyrroloquinoline. *Altern Med Rev*,14(3): 268-277.
- Rudner, R. [et al.] (1998). Classification and genetic characterization of pattern forming *Bacilli*. *Mol Microbiol.*,27: 687-703.
- Rudrapa, T. [et al.] (2008). Root-secreted malic acid recruits soil bacteria. *Plant Physiol.*,148: 1547-1556.
- Ryu, C.-M. [et al.] (2003). Bacteria votalites promotes growth of *Arabidopsis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 100: 4927-4932.
- Saitou, N. and Nei, M.(1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol.Biol.Evol.*, 4(4) : 406-425.
- Salunkhe, P. [et al.] (2005). Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J.Bacteriol.* 8(18): 2565-2572.
- Sarangamat, G. [et al.] (1986). Characterization of an antibiotic produced by strain *Pseudomonas fluorescens* to *Gaeumannomyces gramins var.tritici* and *Pythium spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*,29: 488-495.
- Schaad, N.W. [et al.] (200). Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology*, 20: 08-213.
- Scher, M. and Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wil* pathogens. *Phytopathology* , 72: 1567-1573.
- Schroth, N. and Hancock, G. (1982). Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, 216: 1376-1381.
- Schuster M. [et al.] (2004). The *Pseudomonas aeruginosa RpoS* regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol.* , 4: 973-985.
- Scortichini, M., Marchesi, U. and Di Prospero, P. (2002). Genetic relatedness among *Pseudomonas avellanae*, *P.syringae pv.theae* and *P.s.pv.actinidae*, and their identification. *European Journal of Plant Pathology* ,108: 269-278.
- Scroth, M., Hildebrand, D. and Panopoulos, N. (2006). Phytopathogenic pseudomonas and related plant-associated pseudomonas. In: *The Prokaryotes* 3(3.3).
- Semrad, K., Green, R. and Schroeder, R. (2004). RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA*, 12: 1855-1860.
- Senesi, S. [et al.] (2002). Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of *fliY* mutant impaired in swarm cell diferentiation. *Microbiology*, 148: 1785-1794.

Shanahan, P. [et al.] (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a Fluorescent Pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 353-358.

Shimada, H [et al.] (2004). Dependence of local cell density on concentric ring colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *J.Phys.Soc.Japan.*, 73: 1082-1089.

Shinoda, S. and Okamoto, K. (1977). Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J.Bacteriol.*, 129: 1266-1271.

Shrout, J.D. [et al.] (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol.Microbiol.*, 62: 1264-1277.

Shuhegge, R. [et al.] (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.*, 29: 5646-5649.

Siciliano, SD. and Germida, JJ.(1999). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus cv.Quest*, compared to the non-transgenic *B.napus cv.Excel* and *B.napus cv.Parkland*. *FEMS Microbiol Ecol.*, 29: 263-272.

Siddiqui, I. A. and Shaukat, S. S. (2003). Suppression of root knot disease by *Pseudomonas fluorescens CHAO* in tomato: importance of bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology&Biochemistry*, 35: 1615-1623.

Siefert, J.L. and Fox, G.E. (1998). Phylogenetic mapping of bacterial morphology *Microbiology*, 144: 2803-2808.

Silby, MW. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interaction of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.*,10.

Simeoni, A., Lindsay, L. and Baker, R. (1987). Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 77: 1057-1061.

Simons, M. [et al.] (1997). Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant-Microbe Interact*, 10: 102-106.

Simons M. [et al.] (1996). Gnotobiotic system for studying the rhizosphere colonization by plant-growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 9: 600-607.

Sinnaeve, D., Michaux, C. and Van Hemel, J. (2009). Structure and X-ray confirmation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron*, 65: 4173-4181.

Sirk,M. [et al.] (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 4(35): 652-680.

Skerker, JM. and Berg, HC. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*, 98: 6901-6904.

- Smith, RS. and Iglewski, BH.** (2003). *P.aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Curr.Opin.Microbiol.*, 6: 56-60.
- Sneh, D. D., Poznika, D. and Salomon D.** (1987). Soil suppressiveness to Fusarium wilt of lemon, induced by repeated croppings of resistant varieties of melons. *J.Phytopathology*, 120: 347-354.
- Snyder, L. and Champness, W.** (1997). Molecular genetics of bacteria: 504.
- Soler-Rivas, C. [et al.]** (1999). WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas 'reactans'*, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Appl Microbiol.*, 86: 635-641.
- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan, M.** (2004). Rhizosphere signaling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30: 205-240.
- Soutourina, OA. [et al.]** (2001). Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from lake Baikal. *Appl.Environ.Microbiol.*, 67: 3852-3859.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 4(31): 425-448.
- Spiers, A.J., Buckling, A. and Rainey, P.B.** (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146: 2345-2350.
- Starnbach, MN. and Lory, S.** (1992). The *fliA(rpoF)* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol.Microbiol.*, 6: 459-469.
- Stephens, PM., O'Sullivan, M. and O'Gara, F.** (1987). Influence of bacteriophages on the colonization of strains of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of sugarbeet. *Appl Environ Microbiol.*, 53.
- Stover, CK. [et al.]** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- Sun, H., Zusman, DR. and Shi, W.** (2000). Type IV pili of *Mycococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr.Biol.*, 10: 1143-1146.
- Sylvia, M. D. [et al.]** (1998). In: Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall(eds).
- Tagushi, F.** (2008). Effects of glycozilation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation in *Pseudomonas syringae pv.tabaci* 6605. *J.Bacteriol.*, 190: 764-768.
- Tagushi, F.** (2006). Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae pv.tabaci*. *Cell Microbiol.*, 8: 923-938.
- Takeuchi, K.** (2003). Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae pv.glycinea* and its role in host specificity. *J.Bacteriol.*, 8: 923-938.

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

Tart, AH, Blanks, MJ. and Wozniak, DJ (2006). The *AlgT*-dependent transcriptional regulator *AmrZ*, inhibits flagellum biosynthesis in mucoid nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J.Bacteriol.*, 188: 6483-6489.

Tart, AH., Wolfgang, MC and Wozniak, DJ (2005). The alternative sigma factor *AlgT* represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J.Bacteriol.*, 187: 7955-7962.

Teizel, GM. [et al.] (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, 20(188): 7242-7256.

Thompson, J.D, Higgins, D.G. and Gibson, T.J.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.*, 22: 4673-4680.

Thrane, C. [et al.] (2000). Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.*, 33: 139-146.

Thrane, C. [et al.] (1999). Vital fluorescent strains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. *FEMS Microbiol Ecol.*, 30: 11-23.

Todar, K. (2004b). *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. <http://textbookofbacteriology.net>.

Togushi, A. [et al.] (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: critical role for lipopolysaccharide. *J.Bacteriol.*, 182: 6308-6321.

Tomashow, L.S. [et al.] (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 908-912.

Tomashow, S. and Weller, M. (1995). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-Microbe Interactions*, Chapman&Hall(eds), New York.

Tomashow, S., Bonsall, F. and Weller, M. (2002). Antibiotic production by soil rhizosphere microbes in situ. In: *Manual of Environmental Microbiology*, ASM PRESS(eds.), 2nd edition.

Totten, PA, Lara, JC and Lory, S. (1990). The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *J.Bacteriol.*, 172: 389-396.

- Toutain, C.M., Zegans, M.E. and O'Toole, G.A.** (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187: 771-777.
- Tran H. [et al.]** (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol*, 175: 731-742.
- Tran, H., Kruijt, M. and Raaijmakers, JM.** (2008). Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. *J. Appl Microbiol.*, 104: 839-851.
- Tremblay, J. [et al.]** (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ.Microbiol.*, 9: 2622-2630.
- Tremblay, J. and Deziel, E.** (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics*, 11: 587-599.
- Tremoulet, F. [et al.]** (2002). A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol.Lett.*, 215: 7-14.
- Tunbull, GA. [et al.]** (2001b). The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonization of wheat roots. *FEMS Microbial Ecol*, 36: 21-31.
- Turnbull, GA. [et al.]** (2001a). The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. *FEMS Microb Ecol.*, 35: 57-65.
- Turner, L., Ryu, WS. and Berg, HC** (2000). Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J.Bacteriol.*, 182: 2793-2801.
- Van de Mortle, JE. [et al.]** (2009). Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. *Appl Environ Microb.*, 75: 4950-4957.
- Van Loon, C. L. and Bakker, P.A.H.M.** (2003). *In: Root ecology*, Springer-Verlag(eds), Berlin.
- Van Loon, C. L., Bakker P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* , 30: 453-483.
- Van Loon, LC.** (2007) Plant responses to plant-growth promoting bacteria. *Eur.J.Plant Pathol*, 109: 243-254.
- Van Pee, H. K. and Ligon, M. J.** (2000). Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat.Prod.Rep.*, 17: 157-164.
- Van Peer, R., Niemann, GJ. AND Schippers, B.** (1991). Induced resistance and phtoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas sp.* strain WCS417r. *Phytopathology*, 81: 728-734.

- Van Rij, ET. [et al.]** (2004). Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 17: 557-566.
- Van Sluys, MA. [et al.]** (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 40: 169-189.
- Vandamme, P. [et al.]** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial classification. *Microbiol.Rev.*, 60: 407-438.
- Vasseur, P. [et al.]** (2005). The *pel* genes of *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*, 151: 985-997.
- Velicer, GJ, Kroos, L., and Lenski, RE.** (1998). Loss of social behaviour by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95: 12376-12380.
- Venturi, V. [et al.]** (2010). Co-swarming and local collapse: Quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 5(4): 1-10.
- Venturi, V.** (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol.Rev.*, 30: 274-291.
- Verhagen, B.W.M.** (2003). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.*, 17: 895-908.
- Visca, P.** (2004). *Pseudomonas* Vol.2, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 69-123, New York.
- Visca, P.** (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl.Environ.Microbiol.*, 58: 2886-2893.
- Von Bodman, S.B., Bauer, W.D. and Coplin, D.L.** (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu.Rev.Phytopathol.*, 41: 455-482.
- Wall, D. and Kaiser, D.** (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol.Microbiol.*, 32: 1-10.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P. and O'Gara, F.**(2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol.*, 12: 289-295.
- Wang, L. [et al.]** (2011). Influence of *Pseudomonas aeruginosa pvdQ* Gene on Altering Antibiotic Susceptibility Under Swarming Conditions. *Current Microbiology*, 4(63): 377-386.
- Wang, N. [et al.]** (2006). Characterization of the transcriptional activators *SalA* and *SyrF*, which are required for syringomycin and syringopeptide production by *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*. *J.Bacteriol*, 188: 3290-3298.

- Wang, Q. [et al.]** (2006a). Gene expression patterns in *Salmonella typhimurium* to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular Microbiology*, 52: 169-197.
- Wang, Q. [et al.]** (2005). Sensing wetness: a new role for the bacteria flagellum. *EMBO J.*, 24: 2034-2042.
- Waters, C. and Bassler, B.** (2005). Quorum-sensing: cell-to-cell communication in Bacteria. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 21: 319-346.
- Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.** (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strain of plant-growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81: 1508-1512.
- Weisburg, W.S., Barns, S.M., Pelletier, D.A and Lane, D.I.**(1981). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J.Bacteriol.*, 173: 697-703
- Welbaum, G. [et al.]** (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of the agroecosystems. *Cri Rev Plant Sci.*, 23: 175-193.
- Weller, M. D. [et al.]** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 40: 309-348.
- Weller, M. D.** (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
- Whelan, P. A., Dietrich, P. L.E. and Newman, K. D.** (2006). Rethinking "secondary" metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem.Biol.*, 2: 71-78.
- Whipps, J. M.** (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 48-51.
- Whipps, M.** (1997). Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. *Adv. Bot. Res*, 26: 1-133.
- Whitaker, R.J. [et al.]** (1981). Diverse enzymological patterns of phenylalanine biosynthesis in pseudomonads are conserved in parallel with deoxyribonucleic acid homology groupings. *J.Bacteriol.*, 147: 526-534.
- Williams, P. and Camara, M.** (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*, 12: 182-191.
- Winsor, GL. [et al.]** (2009). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res*, 37.
- Woese, C.R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol.Rev*, 51: 221-271.
- Wong, P.T. W. and Baker, R.** (1984). Suppression of wheat take-all and Ophiobolus patch by fluorescent pseudomonas from *Fusarium*-suppressive soil. *Soil Biol.Biochem.*, 16: 397-403.

Wood, J.M. (1988). Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J.Membr Biol.*, 3: 183-202.

Yoo, D.S., Lee, B.S. and Kim, E.K. (2005). Characteristics of microbial biosurfactants as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J. Microbiol Biotech.*, 15: 1164-1169.

Young, G.M. [et al.] (1999). The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flafellin production, swimming motility, and swarming motility. *J.Bacteriol.*, 181:2823-2833.

Zehnder, G.W. [et al.] (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur.J. Plant Pathol.*, 107: 39-50.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203-214.

Zhang, R., Turner, L. and Breg, H.C (2010). The upper surfaces of an *Escherichia coli* swarm is stationary. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 107: 288-290.

Γεωργόπουλος, Γ. Σ. και Ζίωγας, Ν. Β.(1992). Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθνεσιών των φυτών.

Γραβάνης, Θ. Φ. (2004). Η Φυτοπροστασία στη Βιολογική Γεωργία. Στο:Θέματα βιολογικής Γεωργίας. ECO-ARGO, Pilot Project Leonardo da Vinci, ΚΕΚ ΑΙΓΕΑΣ,Λάρισα.

Ζίωγας, Ν. Β. και Μάρκογλου, Ν. Α. (2007). Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης των Φυτοπροδοτατευτικών Προϊόντων. Εκτυπωτική Αθήνας(εκδ.).

Μαργαρίτης,Λ. [και συν.] (2004). Κατευθυνόμενη συγκρότηση του βακτηριακού μαστιγίου. Στο: Βιολογία κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.

Σγούντζος, Ιωαννης Ν. (2007). Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά την βιοαποδόμηση τοξικών ρύπων σε πορώδη μέσα. Διδακτορική διατριβή , Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πατρα.

Τζάμος, Ε. (2004). Φυτοπαθολογία .Α.Σταμούλης(εκδ.), Αθήνα.