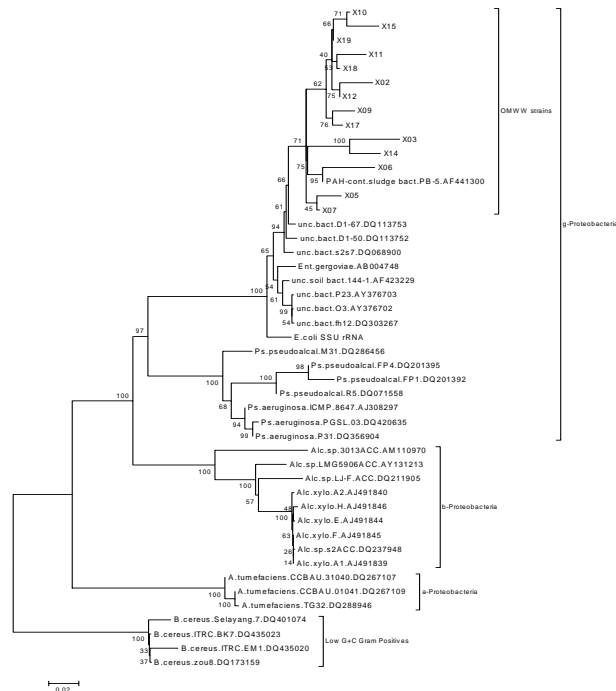


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΚΑΙ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**‘ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΝΕΝΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ’**

ΧΡΗΣΤΟΣ ΞΕΝΟΣ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΚΑΙ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**‘ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΝΕΝΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ’**

ΧΡΗΣΤΟΣ ΞΕΝΟΣ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



Επιβλέπων Καθηγητής: Ν. Ι. Πανόπουλος

Επιβλέπων Ερευνητής: Α. Μαγουλάς

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας Κρήτης. Η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή αρκετών καθηγητών, ερευνητών και συναδέλφων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω. Καταρχήν ο κύριος Ν. Πανόπουλος διέθεσε αρκετές ώρες έτσι ώστε να με καθοδηγήσει και τον ευχαριστώ για τη διάθεση και την υπομονή του. Θερμά ευχαριστώ τον κύριο Νίκο Σκανδάλη, που ξενύχτισε μαζί μου κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των μοριακών δεδομένων και μου έδωσε πολύτιμες συμβουλές, καθώς και τον κύριο Κώστα Τσιγγερόπουλο που διέθεσε αρκετό χρόνο, τόσο στο εργαστήριο, όσο και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δεδομένων. Πολύτιμη βοήθεια προσέφερε και ο κύριος Δημήτρης Γκούμας όσον αφορά το βιοχημικό χαρακτηρισμό των βακτηριακών στελεχών. Ευχαριστώ επίσης τους G. Ciafardini και M. Sacco για την ευγενική παραχώρηση των βακτηριακών στελεχών *Lactobacillus plantarum* B21 και LH3, τους Ε. Μανωλοπούλου και Τ. Ακτύπη για το στέλεχος *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 0142 και τον κύριο Λ. Σκαλτσούνη για την ελευρωπαΐνη. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Μαγουλά Αντώνη, Κωτούλα Γιώργο, Αντωνίου Αγλαΐα, Πουλακάκη Νίκο, Θεολογίδη Γιάννη και Σκοπελίτη Δαμιανό, το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και τους συναδέλφους του μεταπτυχιακού προγράμματος Διαχείρισης Θαλάσσιων και Χερσαίων Βιολογικών Πόρων για τη βοήθεια τους, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξή τους και την αδελφή μου, Ιωάννα Ξένου, που βρίσκεται πάντα δίπλα μου.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή.....	6
2.1 Σημασία του τομέα παραγωγής ελαιόλαδου στην περιοχή της Μεσογείου.....	6
2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων.....	8
2.2.1 Ελευροπαΐνη – Ένα σημαντικό συστατικό των ΥΑΕ.....	11
2.3 Επιπτώσεις των ΥΑΕ στο περιβάλλον	14
2.3.1 Τοξικότητα και μικροβιακή οικολογία των ΥΑΕ.....	16
2.4 Διαχείριση των ΥΑΕ.....	18
2.5 Η διάκριση μεταξύ ειδών στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.....	20
2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βάσει αλληλουχιών επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep – PCR).....	22
2.6 Στόχοι της Διατριβής.....	23
3 Υλικά και Μέθοδοι.....	25
3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	25
3.1.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με χρήση των τεστ API.....	25
3.1.2 Παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό σακχάρων.....	26
3.1.3 Ανάπτυξη στους 42 ⁰ C.....	27
3.1.4 Ανάπτυξη σε NaCl 4%.....	27
3.1.5 Ενεργότητα λιπάσης.....	27
3.1.6 Ενεργότητα ουρεάσης.....	28
3.1.7 Ενεργότητα οξειδάσης.....	28
3.1.8 Φθορισμός σε υπεριώδη ακτινοβολία.....	29
3.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	29
3.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX – PCR.....	29
3.2.2 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση ERIC – PCR.....	30
3.2.3 Ανάλυση αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA.....	31
3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA.....	31
3.3 Ανίχνευση ικανότητας υδρόλυσης της ελευροπαΐνης.....	33
4. Αποτελέσματα.....	34
4.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	34
4.1.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με χρήση των τεστ API.....	36

4.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	41
4.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX – PCR.....	41
4.2.2 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση ERIC – PCR.....	44
4.2.3 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA.....	47
4.3 Ανίχνευση ικανότητας υδρόλυσης της ελευροπαΐνης.....	49
5. Συζήτηση.....	54
5.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	54
5.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	55
5.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX – PCR και ERIC – PCR.....	55
5.2.2 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA.....	57
5.3 Συμπεράσματα ταυτοποίησης βακτηριακών στελεχών.....	58
5.4 Ανίχνευση ικανότητας αποδόμησης της ελευροπαΐνης.....	59
6. Συμπεράσματα	64
7. Βιβλιογραφία.....	65
8. Παραρτήματα	68

Περίληψη

Δεκαοκτώ βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από ΥΑΕ χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με χρήση των τεστ API και με επιπλέον βιοχημικά τεστ. Η διάκριση μεταξύ των στελεχών έγινε με την ενίσχυση των αλληλουχιών BOX και ERIC, ενώ δεκατέσσερα από αυτά τα στελέχη ταξινομήθηκαν με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA. Επίσης, διερευνήθηκε η ικανότητα των στελεχών να αναπτύσσονται σε ελευρωπαϊνή και να την αποδοθούν. Τα βακτηριακά στελέχη φαίνονται να κατατάσσονται στα *γ-Proteobacteria* στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, όπου σχηματίζουν μια διακριτή ομάδα σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων ανάλυσης. Τα στελέχη παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα αλληλουχιών του 16S RNA με στελέχη που δεν έχουν απομονωθεί ξανά και των οποίων οι αλληλουχίες 16S RNA είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων ριβοσωμικού RNA. Επιπλέον τα βακτηριακά στελέχη είναι ικανά να αναπτύσσονται σε συγκέντρωση 0.1% ελευρωπαϊνης ως μόνη πηγή άνθρακα σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο τύπου M9. Όμως όλα τα στελέχη δεν έδειξαν ενεργότητα β-γλυκοσιδάσης σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν το χρωμογόνο υπόστρωμα του ενζύμου, ένδειξη ότι αποδοθούν την ελευρωπαϊνή μέσω άλλου βιοχημικού μηχανισμού.

2. Εισαγωγή

2.1 Σημασία του τομέα παραγωγής ελαιόλαδου στην περιοχή της Μεσογείου

Η παραγωγή και χρήση ελαιόλαδου χρονολογείται στην περιοχή της Μεσογείου πάνω από 6000 χρόνια και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιστορία των πολιτισμών της. Αρκετές σύγχρονες λέξεις θυμίζουν αυτή την αρχαία κληρονομιά. Από την Ελληνική λέξη *ελαια* προήλθαν οι Λατινικές λέξεις *olea* (έλαιο) και *olivum* (ελαιόκαρπος); και από το Εβραϊκό *zait* προήλθαν οι Αραβικές λέξεις *az-zait* (*aceite* – έλαιο στα Ισπανικά) και *zaitum* (*acetuna* – ελαιόκαρπος στα Ισπανικά) (24). Τα οφέλη της καλλιέργειας ελαιόδεντρων είναι πολλαπλά. Έχουν την ικανότητα να βλαστάνουν σε ξηρές περιοχές, συμβάλλουν κατά της ερημοποίησης και διάβρωσης του εδάφους, ενώ βοηθούν στη ρύθμιση του υδρολογικού κύκλου. Το ελαιόλαδο έχει υψηλή διαιτητική και θεραπευτική αξία, ενώ συμβάλλει στην πρόληψη αγγειακών παθήσεων, υπέρτασης, αρτηριοσκλήρωσης, θρομβώσεων, καθώς και κάποιων μορφών καρκίνου (9, 47).

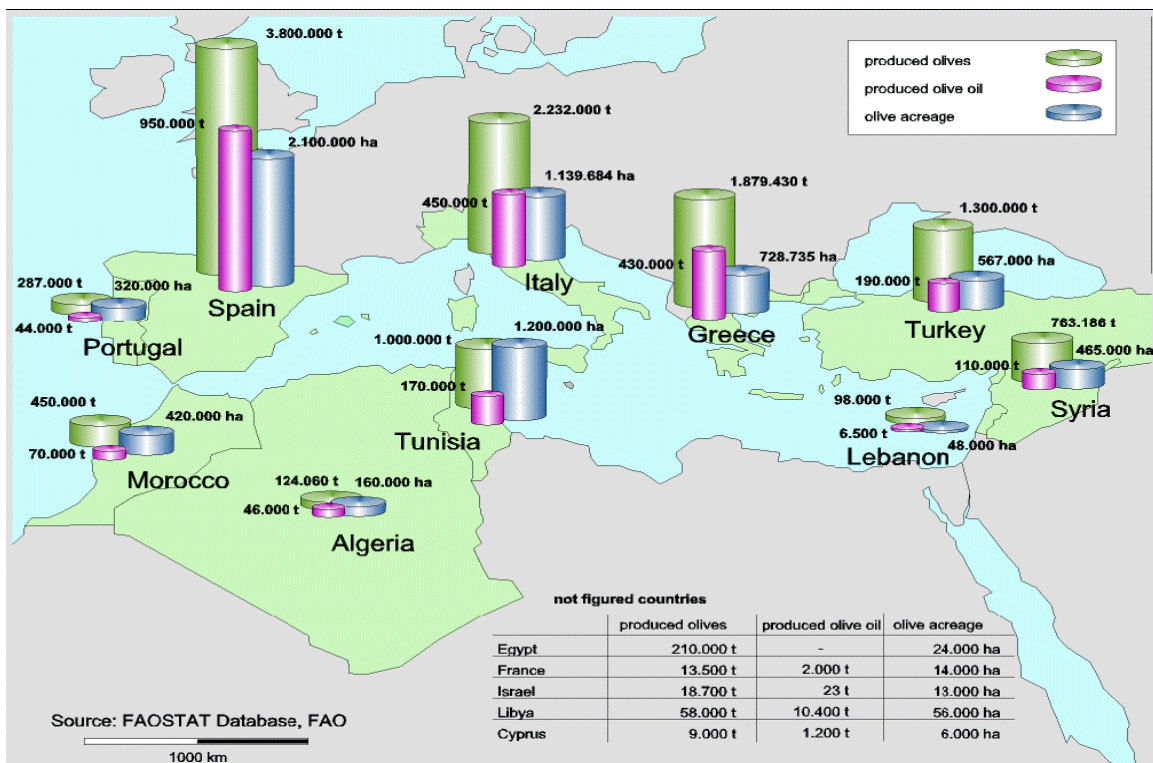
Η κοινωνική και οικονομική σημασία του τομέα παραγωγής ελαιόλαδου γίνεται εμφανής αν ληφθούν υπ' όψιν μερικά αντιπροσωπευτικά δεδομένα (14, 24). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση λειτουργούν περίπου 2,000,000 εταιρίες που σχετίζονται με την επεξεργασία ελαιοκάρπων και την παραγωγή ελαιόλαδου, η οποία στην Ευρωπαϊκή Ένωση – συμπεριλαμβανομένων και των τριών κύριων παραγωγών χωρών, Ισπανίας, Ελλάδας και Ιταλίας – αντιπροσωπεύει περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής. Στην περιοχή της Μεσογείου οι τομείς επεξεργασίας ελαιοκάρπου και παραγωγής ελαιόλαδου αποτελούν το βασικό εισόδημα για εκατομμύρια οικογένειες. Στον πίνακα 2.1. παρατίθενται οι σχετικές τιμές για την Ελλάδα όσον αφορά το έτος 2004.

Η παραγωγή ελαιοκάρπων διακυμαίνεται εξαιτίας πολλών παραμέτρων που σχετίζονται κυρίως με τις καιρικές συνθήκες και με πανδημίες που επηρεάζουν τα δέντρα και τους καρπούς. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι τιμές που παρατίθενται (Πιν. 2.1, Εικ. 2.1) αντιπροσωπεύουν

ενδεικτικά μεγέθη, που αποσκοπούν στο να τονιστεί η σημασία του τομέα, καθώς και το μέγεθος του προβλήματος που δημιουργείται από τα απόβλητα της παραγωγής ελαιόλαδου στη Μεσογειακή λεκάνη.

Πίνακας 2.1.: Μεγέθη εξαγωγών και εσόδων από αυτές, σχετιζόμενα με τον τομέα παραγωγής και επεξεργασίας ελαιόλαδου και ελαιοκάρπου στην Ελλάδα για το έτος 2004 (15).

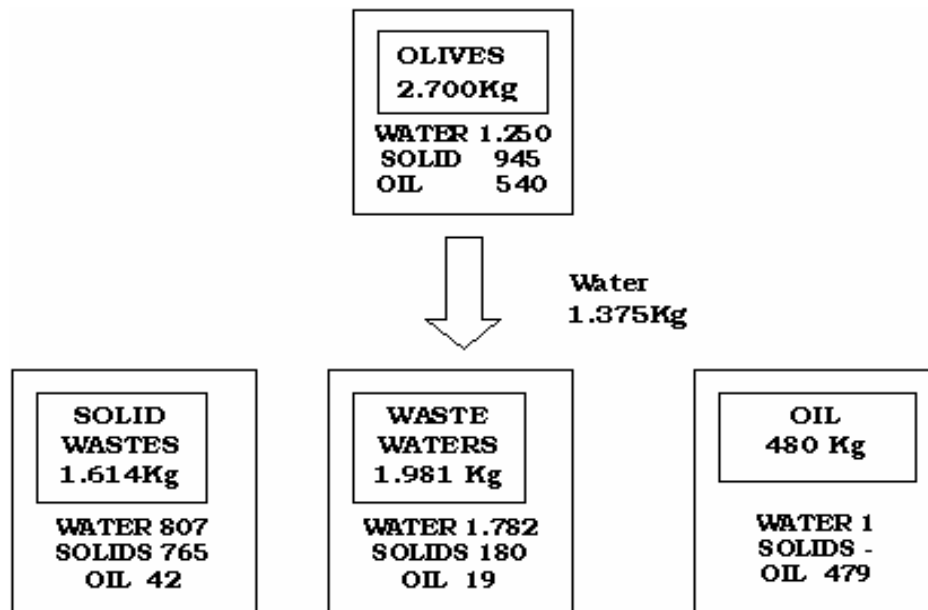
	Εξαγωγές (ποσότητα, Mt)	Έσοδα (αξία, 1000\$)
Ελαιόλαδο	52,946	166,730
Ελαιόκαρποι (νωποί)	6,081	18,564
Ελαιόκαρποι (επεξεργασμένοι)	79,051	163,411



Εικόνα 2.1: Τιμές μέσων όρων παραγωγής ελαιόλαδου και ελαιοκάρπων στη Μεσόγειο. Οι τρεις κύριοι παραγωγοί χώρες – Ισπανία, Ιταλία και Ελλάδα – ακολουθούνται από την Τунησία και την Τουρκία. Οι υπόλοιπες χώρες συνεισφέρουν πολύ λιγότερο στην παραγωγή επομένως και στη ρύπανση (14, 24).

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων

Στο παρελθόν η επεξεργασία του ελαιολάδου γινόταν κυρίως από πιεστικά ελαιοτριβεία, τα οποία βασιζόνταν στη μηχανική έκθλιψη του ελαιοκάρπου ακολουθούμενης από εκχύλιση με πίεση. Η εντατικοποίηση της παραγωγής οδήγησε στην εγκατάλειψη αυτής της παραδοσιακής μεθόδου και στην εγκατάσταση περισσότερο αποδοτικών και μεγαλύτερης δυναμικότητας φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων. Σήμερα υπάρχουν δύο βασικές τεχνολογίες εξαγωγής ελαιολάδου, που εφαρμόζουν μηχανική έκθλιψη – ομογενοποίηση -, ακολουθούμενη από φυγοκεντρικό διαχωρισμό παραλαβής «δύο φάσεων» ή «τριών φάσεων» (47). Από τα ελαιουργεία τριών φάσεων παράγονται τεράστιες ποσότητες υγρών αποβλήτων (ΥΑΕ) όπως τα φυτικά υγρά, προερχόμενα από το υδάτινο κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου, το νερό της πλύσης, και το νερό που προστίθεται κατά την μάλαξη της ελαιομάζας στον διαχωριστήρα. Τα λιόζουμα αποτελούν το 50% του ολικού προϊόντος κατά την παραγωγή του ελαιολάδου, ενώ το ελαιόλαδο και το στερεό υπόλειμμα αντιπροσωπεύουν το 20% και 30% αντίστοιχα στην ολική παραγωγή (45).



Εικόνα 2.2: Μεγέθη στερεών και υγρών αποβλήτων κατά τη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου σε φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο τριών φάσεων (43).

Τα παραδοσιακά πιεστικά ελαιοτριβεία παράγουν περίπου 400kg ΥΑΕ ανά τόνο ελαιοκάρπων. Ανάλογα με το μέγεθός τους, αυτά τα ελαιοτριβεία μπορούν να επεξεργαστούν 10 με 20 τόνους ελαιοκάρπων ανά ημέρα. Επομένως, ένα ελαιοτριβείο με δυνατότητα επεξεργασίας 20 τόνων ελαιοκάρπων την ημέρα και με αναλογία παραγωγής ΥΑΕ 0.4 m³ ανά τόνο ελαιοκάρπων, παράγει μέχρι και 8 m³ ΥΑΕ ανά ημέρα. Συγκρινόμενα με τα πιεστικά ελαιοτριβεία, εκείνα των τριών φάσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα παράγουν τη διπλάσια ποσότητα ΥΑΕ (750kg ανά τόνο ελαιοκάρπου) (Εικ. 2.2). Ανάλογα με το μέγεθός τους, τα σύγχρονα ελαιοτριβεία μπορούν να επεξεργαστούν ανάλογες ποσότητες ελαιοκάρπων (10 – 20 τόνους ανά ημέρα), και παράγουν περίπου 15 m³ ΥΑΕ ανά ημέρα. Η συγκέντρωση των συστατικών των ΥΑΕ είναι διπλάσια στα απόβλητα των παραδοσιακών πιεστικών ελαιοτριβείων από ότι στα ΥΑΕ που προέρχονται από την επεξεργασία τριών φάσεων (24). Μόνο στην περιοχή της Μεσογείου



Εικόνα 2.3: Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ), τα οποία επίσης ονομάζονται κασίγαρος ή λιόζουμα.

τα υγρά και στερεά απόβλητα ελαιουργείων ξεπερνούν τα 30 Mm³/ετησίως (24) μέσα σε μια περίοδο 2-4 μηνών (Νοέμβριος-Φεβρουάριος). Δημιουργείται έτσι ένα μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα, το οποίο θα μπορούσε να συγκριθεί με τη ρυπαντική δράση των αποβλήτων που προκύπτουν από έναν πληθυσμό 20 εκατ. ανθρώπων.

Τα ΥΑΕ είναι υγρά σκούρου χρώματος (Εικ. 2.3) με διάφορες αποχρώσεις (από κίτρινο-πράσινο έως κόκκινο σκοτεινό ή καφέ-μαύρο) που οφείλεται στην αυτό-οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Είναι θολά και

έχουν χαρακτηριστική οσμή, όξινο pH (3-5.9), πολύπλοκο οξειδοαναγωγικό σύστημα (αγωγιμότητα: 8,000-16,000 μs), υψηλή ρυθμιστική ικανότητα επιφανειακή τάση και είναι πλούσια σε οργανικά και ανόργανα συστατικά διαλυμένα στην υδάτινη κυρίως φάση (Πιν. 2.2). Η πυκνότητά τους

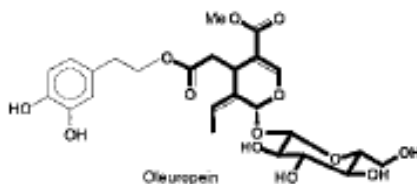
κυμαίνεται από 1,015-1,081 gr/cm³. Επιπρόσθετα, περιέχουν μεγάλες ποσότητες διαλυμένων στερεών (20gr/l), και υψηλές συγκεντρώσεις πολυαρωματικών συστατικών (80gr/l). Τα παραπάνω θεωρούνται κυρίως υπεύθυνα (πιθανώς μαζί με λιπαρά οξέα και πτητικά οξέα) για την υψηλή φυτοτοξικότητά τους και τις ισχυρές αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (24, 41). Περιέχουν επίσης αδιάλυτα οργανικά σωματίδια υπό μορφή αιωρήματος καθώς και σταγονίδια ελαίου που τους προσδίδουν την μορφή γαλακτώματος.

Πίνακας 2.2: Ποσοτική ανάλυση των συστατικών που βρίσκονται στα ΥΑΕ και των ουσιών που αυτά περιλαμβάνουν.

Κατηγορία	Τιμή %	Κύρια συστατικά
Νερό	83 - 92	—
Οργανικό κλάσμα	4 - 15	—
Λίπη	0.03 - 1	Υπολείμματα ελαίου
Αζωτούχες ουσίες	1.2 - 2.4	Προλίνη, Ιστιδίνη, Γλυκίνη, Αργινίνη, Αλανίνη, Ασπαρτικό οξύ, Βαλίνη, Γλουταμικό οξύ, Γλυκοζαμίνη, Θρεονίνη, Ισολευκίνη, Λευκίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Σερίνη, Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη
Σάκχαρα	2 - 8	Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Μανόζη, Ραφινόζη, Γαλακτόζη, Ξυλόζη, Ραμνόζη, Αραβινοζη
Πολυαλκοόλες	0.5 - 1.5	Γλυκερίνη, Μανιτόλη
Πηκτίνες και Ταννίνες	0.4 - 1.5	—
Οργανικά οξέα	0.5 - 1.5	Τρυγικό, Οξαλικό, Μηλικό, Γαλακτικό, Φουμαρικό, Κιτρικό, Οξικό, Μηλονικό, Ταρταρικό, κ.α
Φαινολικά	0.3 - 0.8	Φαινόλες: Καφεϊκό οξύ, Κινναμικό οξύ, Κουμαρικό οξύ, Βανιλικό οξύ, Πρωτοκατεχικό οξύ, Βερατρικό οξύ, p- Υδροξυβενζοϊκό οξύ, Τυροσόλη, Υδροξυτυροσόλη, 2,6- διυδροξυβενζοϊκό οξύ, Συρινγγικό οξύ, Φλαβονοειδή: Απεγνίνη, Λουτεολίνη, Κερκετίνη, Ρουτίνη Ανθοκυάνες: Κυανιδίνη, Παιονιδίνη, Δελφινιδίνη, Ελευροπαίνη, Βερμπασκοσίδη
Ανόργανο κλάσμα	1 - 1.8	K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, O, S Ανθρακικά 21%, Φωσφορικά 14%, Άλατα Καλίου 47%, Άλατα Νατρίου 7%, Υπόλοιπα 11%

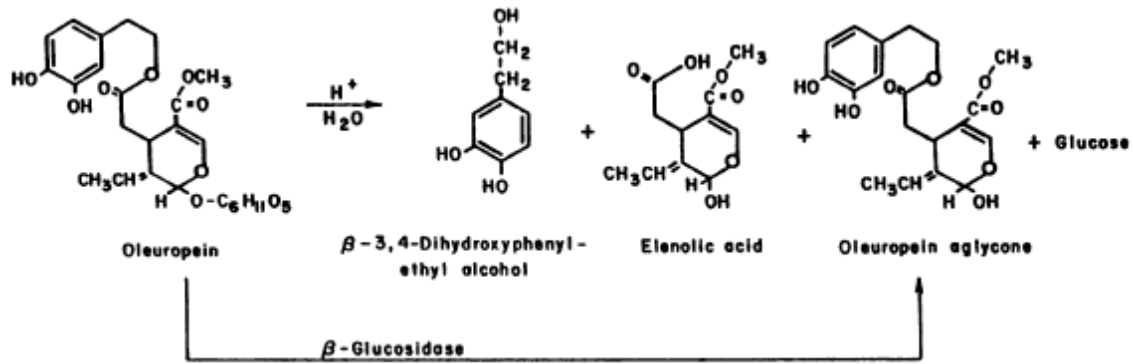
2.2.1 Ελευροπαΐνη – Ένα σημαντικό συστατικό των ΥΑΕ

Η ελευροπαΐνη είναι ένας φαινολικός γλυκοζίτης ο οποίος απομονώθηκε από φύλλα ελαιόδεντρου (*Olea europaea*) στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Η ένωση βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (60-90mgg⁻¹ ξηρό βάρος) στα φύλλα των ελαιόδεντρων, καθώς και στους ελαιόκαρπους, και είναι το συστατικό που δίνει τη χαρακτηριστική πικρή γεύση στους μη επεξεργασμένους ελαιόκαρπους (47). Η ελευροπαΐνη ανήκει σε μία συγκεκριμένη ομάδα, η οποία ονομάζεται σεκοΐριδοειδή (secoiridoids), και είναι ένας εστέρας ελενολικού και υδρόξυ – τυροσολικού οξέος (4, 9, 31) (Εικ. 2.4). Κατά την επεξεργασία των ελαιόκαρπων η ελευροπαΐνη υδρολύεται βιοχημικά με την προσθήκη NaOH (4, 31, 38, 47). Η υδρόλυσή της όμως μπορεί να επιτευχθεί και ενζυματικά (Εικ. 2.5) με τη δράση της β – γλυκοσιδάσης (4, 31).



Εικόνα 2.4: Δομή της ελευροπαΐνης (47).

Η ελευροπαΐνη είναι σημαντικό συστατικό καθώς διαθέτει τόσο αντιοξειδωτικές όσο και αντιμικροβιακές ιδιότητες (4, 8, 31, 38, 47). Πιο συγκεκριμένα η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος της ελιάς στους *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, και στους παθογόνους *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* έχει αποδοθεί στην ελευροπαΐνη και στα προϊόντα διάσπασής της (52). Ειδικότερα, η ζύμωση της ελιάς που επιτυγχάνεται με τα είδη *Lactobacillus spp.*, είναι γνωστό ότι παρεμποδίζεται από τις φαινολικές ουσίες της ελιάς (8, 31). Η συγκεκριμένη παρεμπόδιση έχει αποδοθεί, μεταξύ άλλων, στο φαινολικό γλυκοζίτη της ελευροπαΐνης και στα προϊόντα της υδρόλυσής της, την β-3,4-διυδροξυφαιθυλαιθανόλη, το ελενολικό οξύ και το άγλυκο της ελευροπαΐνης (31) (Πιν. 2.3).



Εικόνα 2.5: Η δομή της ελευροπαΐνης καθώς και των προϊόντων της υδρόλυσής της από τη β-γλυκοσιδάση (8).

Επιπλέον, εκχυλίσματα που περιέχουν τις παραπάνω ουσίες φέρεται να παρεμποδίζουν την αύξηση ενός αριθμού, κυρίως Gram- αρνητικών βακτηρίων, ενώ στις αντιμικροβιακές ιδιότητες της ελευροπαΐνης αποδίδεται η παρεμπόδιση της εκβλάστησης των σπορίων των *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* και η βακτηριοστατική δράση στη *Salmonella enteridis* (34).

Πίνακας 2.3: Παρεμπόδιση γαλακτικών βακτηρίων από τα προϊόντα υδρόλυσής της ελευροπαΐνης (34).

Βακτήρια	Ελευροπαΐνη	Άγλυκο	Αιθανολικό οξύ	Διύδροξυ-φαινυλ-αιθανόλη	Μέθυλ-ο-μέθυλ-ελενολικό
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-	-
<i>Pedicoccus cerevisae</i>	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+	+	-	-

Επιπροσθέτως, παρότι η ελευροπαΐνη είναι ικανή να μειώσει κατά 80% την παραγωγή αφλατοξίνης από μύκητες, έχει βρεθεί πως η ανάπτυξη των στελεχών *Penicillium* και *Aspergillus* δεν παρεμποδίζεται σε σημαντικό βαθμό από την ελευροπαΐνη αλλά από τα προϊόντα της υδρόλυσής της, όπως η τυροσόλη (34).

Οι έρευνες του μηχανισμού δράσης της ελευροπαΐνης, των προϊόντων της υδρόλυσής της, καθώς και των περισσότερων φαινολικών ουσιών στρέφονται γύρω από τις επιδράσεις τους στην κυτταρική μεμβράνη (34) και σχετίζεται με την παρουσία μιας υδροξυλομάδας που υπάρχει στο μόριό τους. Πιο συγκεκριμένα, η ελευροπαΐνη και το άγλυκό της μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων και προκαλούν διαρροή μεταβολιτών και ενζύμων από το κύτταρο με συνέπεια τη θανάτωση του μικροοργανισμού (31). Εντούτοις, μερικά στελέχη του *L. plantarum* είναι ικανά να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις υδρόξυ – τυροσολικού οξέος σε ελαιόκαρπους που έχουν υποστεί επεξεργασία με NaOH. Αυτό υποδηλώνει πως οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα των ελαιοκάρπων μπορούν να περιορίσουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φαινόλων όταν αναμιχθούν με αυτές (31). Επιπλέον, η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε φαινόλες αυξάνεται καθώς μειώνεται η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε πρωτεΐνες και λίπη. Η ελευροπαΐνη δεν είχε καμία παρεμποδιστική επίδραση απέναντι στην *Salmonella enteridis* όταν προστέθηκε σε άπαχο γάλα σε αντίθεση με θρεπτικό μέσο (48).

Η παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών στα ΥΑΕ μπορεί να επηρεάσει τη μικροχλωρίδα του εδάφους, ιδιαίτερα τα αερόβια σπορογόνα βακτήρια, σε περιοχές απόρριψης με αποτέλεσμα τη μόλυνση των υδάτινων πόρων (θαλασσιών ή μη) των χωρών της Μεσογείου. Συμπερασματικά η βιοαποδόμηση της ελευροπαΐνης, καθώς και των προϊόντων της υδρόλυσής της, έχει προτεραιότητα στην οποιαδήποτε προσπάθεια διαχείρισης των ΥΑΕ.

2.3 Επιπτώσεις των ΥΑΕ στο περιβάλλον

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των ΥΑΕ (Πιν. 2.2) συνηγορούν σε υψηλές τιμές για τις περισσότερες παραμέτρους ρύπανσης (Πιν. 2.4): (οι τιμές COD φτάνουν μέχρι και 220g/l) με μια αναλογία COD/BOD₅ που κυμαίνεται μεταξύ 2.5 – 5, η οποία καθιστά την αποδόμησή τους σχεδόν αδύνατη (24).

Πίνακας 2.4: Σύγκριση παραμέτρων ρύπανσης σε ΥΑΕ από διαφορετικές πηγές (24).

Παράμετρος	Pompei (1974)	Fiestas (1981)	Steegmans (1992)	Hamadi (1993)	Andreozzi (1998)
pH	-	4,7	5,3	3 - 5,9	5,09
(COD)	195	-	108,6	40-220	121,8
(BOD ₅)	38,44	-	41,3	23-100	-
Ολικά στερεά (TS)	-	1 - 3	19,2	1 - 20	102,5
Ολικά οργανικά στερεά (OTS)	-	-	16,7	-	81,6
Λιπαρά	-	-	2,33	1 - 23	9,8
Πολυφαινόλες	17,5	3 - 8	0,002	5 - 80	6,2
Πτητικά οργανικά οξέα	-	5 - 10	0,78	0,8 - 10	0,96
Ολικό άζωτο	0,81	0,3 - 0,6	0,6	0,3 - 1,2	0,95

Όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4 οι πολυφαινόλες, αν και είναι ποσοτικά υποδεέστερες, είναι από περιβαλλοντικής απόψεως τα πιο σημαντικά συστατικά, διότι κυρίως σε εκείνα οφείλονται οι χαρακτηριστικές φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των ΥΑΕ (21). Τα περισσότερα από τα φαινολικά συστατικά που έχουν ανιχνευθεί στα ΥΑΕ ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών, φλαβονοειδών παραγώγων και ανθοκυανών. Σε αυτά θα πρέπει να προστεθούν και πολυμερείς ουσίες καστανόμαυρου χρώματος που σχηματίζονται δευτερογενώς μέσω ενζυμικών αντιδράσεων που αρχίζουν αμέσως μετά την έκθλιψη του ελαιοκάρπου (44).

Τα ΥΑΕ, μεταξύ άλλων, παρουσιάζουν ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον διότι :

α) Προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι φυτών, καθώς και έναντι πολλών ευαίσθητων υδρόβιων ζωικών ειδών.

β) Περιορίζουν το φάσμα και τη δράση των μικροοργανισμών εκείνων που θα μπορούσαν να εγκατασταθούν και να αποδομήσουν τα υπόλοιπα συστατικά των Υ.Α.Ε.

γ) Βιοαποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό από εξειδικευμένες και σχετικά ολιγάριθμες ομάδες μικροοργανισμών, συνεπώς παρουσιάζουν εμμονή στο περιβάλλον.

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται ως βιομηχανικά απόβλητα και μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένη μόλυνση με σημαντικά περιβαλλοντικά επακόλουθα σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα. Αν και υψηλού περιβαλλοντικού κινδύνου, τα Υ.Α.Ε. δεν περιέχουν βαρέα μέταλλα, αμίαντο, ή άλλες μη βιοαποδομήσιμες συνθετικές οργανικές ενώσεις, σε αντίθεση με άλλους τύπους βιομηχανικών αποβλήτων. Στον πίνακα 2.5, συνοψίζονται οι αρνητικές επιδράσεις των ΥΑΕ στο περιβάλλον σε συσχετισμό με τα κύρια χαρακτηριστικά του.

Πίνακας 2.5: Επιδράσεις των χαρακτηριστικών των ΥΑΕ στο περιβάλλον.

Χαρακτηριστικά των Υ.Α.Ε.	Αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον
1. Υψηλή περιεκτικότητα σε χρωστικές	<ul style="list-style-type: none"> • Περιορισμός φωτοσύνθεσης στους υδάτινους αποδέκτες • Παρεμπόδιση ορατότητας των ψαριών • Αισθητική υποβάθμιση φυσικού περιβάλλοντος και κατοικημένων περιοχών
2. Υψηλή περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο και άλλες λιπαρές ενώσεις	<ul style="list-style-type: none"> • Παρεμπόδιση οξυγόνωσης υδάτινων αποδεκτών • Μείωση πορώδους του εδάφους
3. Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες	<ul style="list-style-type: none"> • Βιοτοξικότητα-φυτοτοξικότητα (φαινόμενα αλληλοπάθειας φυτών) • Περιορισμός δράσης αποδομητών μικροοργανισμών των Υ.Α.Ε., βιοαποδόμηση από εξειδικευμένες και ολιγάριθμες ομάδες μικροοργανισμών (εμμονή στο περιβάλλον)
4. Υψηλά BOD ₅ - COD	<ul style="list-style-type: none"> • Δημιουργία ανοξικών συνθηκών στους υδάτινους αποδέκτες • Φαινόμενα ευτροφισμού
5. Χαμηλό pH, υψηλή EC	<ul style="list-style-type: none"> • Διάβρωση των εδαφών και διείδυση του σε υπόγειους υδροφορείς • Ακατάλληλο για άρδευση των περισσότερων καλλιεργειών

2.3.1 Τοξικότητα και μικροβιακή οικολογία των ΥΑΕ

Η αρχική ανίχνευση ουσίας φαινολικής προέλευσης έγινε σε πράσινες ελιές. Η κατασταλτική δράση των ΥΑΕ έναντι των βακτηρίων και των μυκήτων οφείλεται κυρίως στις πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους (>60kDa) (24, 45). Οι φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (< 8 kDa) διασπώνται εύκολα τόσο από βακτήρια όσο και από μύκητες, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ. Όσο όμως αυξάνεται το μοριακό βάρος των πολυφαινολών, (από 8 kDa μέχρι και > 60 kDa) τα βακτήρια δεν παρουσιάζουν την ίδια ικανότητα αποδόμησης σε αντίθεση με μύκητες (*P. chrysosporium*) που επιτυγχάνουν την βιοδιάσπαση των πολυφαινολών, μετά όμως από μεγάλο χρονικό διάστημα (45). Σε άλλες περιπτώσεις οι πολυφαινόλες μεγάλου ΜΒ δρουν αρνητικά στο βιοδιασπαστικό σύστημα του μύκητα αναστέλλοντας την δράση του ενζύμου LiP (λιγνιτική περοξειδάση) κατά 80%. Όπως προαναφέρεται, πολλές έρευνες αφορούν την αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών που εντοπίζονται στα ΥΑΕ. Ο μηχανισμός δράσης όλων των αντιμικροβιακών βασίζεται σε μία ή περισσότερες από τις παρακάτω αρχές:

- Αντίδραση με συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης,
- Αδρανοποίηση διάφορων ενζύμων, και
- Καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού.

Παρόλο που δεν έχει βρεθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης των φαινολικών συστατικών, από διάφορες έρευνες μπορεί κανείς να υποθέσει ότι οι ενώσεις αυτές επιδρούν στα κύτταρα και με τους τρεις τρόπους που αναφέρθηκαν (31). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ φέρεται να σχετίζεται με την παρουσία μιας υδροξυλομάδας που βρίσκεται στο μόριό τους (34). Οι περισσότερες έρευνες στρέφονται γύρω από την επίδραση των φαινολικών ουσιών στην κυτταρική μεμβράνη. Η προσθήκη φαινολικών συστατικών στα μικροβιακά κύτταρα διαταράσσει την ισορροπία και τη φυσιολογική λειτουργία της κυτταρικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρατηρείται απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών (31).

Ωστόσο η επίδραση των ΥΑΕ ή κάποιων συστατικών τους δεν είναι πάντα κατασταλτική στη δράση ενός μεγάλου μέρους των μικροοργανισμών.

Ενώ πολλά είδη μικροοργανισμών παρεμποδίζονται, άλλα ευνοούνται (*Azotobacter spp.*, *A. chroococcum*, *A. vinelandii*), εμπλουτίζοντας το έδαφος από την αξιοποίηση των συστατικών των ΥΑΕ (3, 5, 12, 39). Τα παραπάνω είδη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων βρέθηκαν σε εδάφη απόρριψης ΥΑΕ. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν πως τα συγκεκριμένα στελέχη ευνοούνται από τις συνθήκες που δημιουργούνται στο έδαφος με συνέπεια την αύξηση της αζωτοδέσμευσης (3, 5, 39). Παράλληλα παρατηρήθηκε και μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών που θεωρούνται υπεύθυνα για τα φαινόμενα φυτοτοξικότητας των ΥΑΕ. Σε πειράματα διάθεσης ΥΑΕ στο έδαφος παρατηρήθηκε αύξηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων κατά είκοσι φορές σε σχέση με το μη ρυπασμένο έδαφος, ενώ παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της σύστασης της μικροχλωρίδας (40). Ο πληθυσμός και η ποικιλότητα των μη σπορογόνων, Gram⁺ βακτηρίων (coryneform) αυξήθηκαν, σε αντίθεση με στελέχη βακίλων (*Bacillus spp.*, σπορογόνα Gram⁺). Επιπλέον στο εμπλουτισμένο με ΥΑΕ έδαφος εντοπίστηκαν βακτηριακά στελέχη (*Pseudomonas*, *Enterobacteria*), τα οποία απουσίαζαν στο μη εμπλουτισμένο έδαφος. Συνεπώς, σύμφωνα με την έρευνα (40), τα βακτηριακά στελέχη που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση των ΥΑΕ στο έδαφος θα πρέπει να αναζητηθούν ανάμεσα σε εκείνα που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε αυτά (τα ΥΑΕ). Επιπλέον, βακτήρια των γενών *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* και *Sphingomonas* έχουν απομονωθεί από ΥΑΕ και έχουν τη δυνατότητα όχι μόνο να αναπτύσσονται αλλά και να αποδομούν φαινολικές ενώσεις (11), ενώ στελέχη των *L. plantarum* (B21, LH3) μπορούν να επιτυγχάνουν την υδρόλυση της ελευροπαΐνης (8, 31, 32). Επίσης, κάποια στελέχη μυκήτων του γένους *Pleurotus*, επιτυγχάνουν τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ σε μεγάλο ποσοστό μετά από περίπου 17 ημέρες επώασης. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και με στελέχη των *Geotrichum*, *Aspergillus*, *P. chrysosporium* και *Candida tropicalis* (22). Ο αποχρωματισμός οφείλεται πιθανότατα στην διάσπαση φαινολικών ενώσεων από τη λιγνιτική περοξειδάση (LiP), ή / και από την προσρόφηση ορισμένων φαινολικών ενώσεων στο μυκήλιο. Πιο συγκεκριμένα, οι μεγάλοι μοριακού βάρους πολυφαινόλες προσκολλώνται ισχυρά στα μυκήλια με δεσμούς υδρογόνου

μεταξύ των πολυφαινολών και των πρωτεϊνών στην επιφάνεια στων μυκηλίων και απορροφώνται μέσω συσσωμάτωσης (45). Επιπλέον, στελέχη του *L. plantarum* είναι ικανά όχι μόνο να υδρολύουν την ελευροπαΐνη (8, 9, 31), αλλά και να επιτυγχάνουν τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ – σε αραιώση 1/10 - κατά 58%, και τη μείωση των συνολικών φαινολικών κατά 46% (26).

Συμπερασματικά, είναι προφανές πως η διαχείριση των ΥΑΕ είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που έχουν στις χώρες της Μεσογείου. Από τα δεδομένα των ερευνών μέχρι σήμερα γίνεται σαφές πως η βιοαποδόμηση των ΥΑΕ μπορεί να επιτευχθεί με την παράλληλη χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών (consortium).

2.4 Διαχείριση των ΥΑΕ

Λόγω της ποικιλίας των συστατικών των ΥΑΕ απαιτείται η χρήση διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας έτσι ώστε να επιτευχθεί η εξουδετέρωση των ενώσεων που είναι επικίνδυνες για το περιβάλλον. Οι μέθοδοι αυτές πρέπει όχι μόνο να είναι αποδοτικές αλλά και οικονομικά βιώσιμες (π.χ. αξιοποίηση των προϊόντων επεξεργασίας). Ο σχεδιασμός τους στοχεύει πρώτα στην εξουδετέρωση των οργανικών συστατικών και τη μείωση του όγκου των αποβλήτων. Σε μερικές περιπτώσεις επιτυγχάνεται και η εξουδετέρωση και διαφορετικών κλασμάτων. Συνήθως οι πιο πολλές μέθοδοι διαχείρισης των ΥΑΕ συνδυάζονται, επειδή τα αποτελέσματά τους διαφέρουν. Για την επεξεργασία των ΥΑΕ ακολουθούνται οι παρακάτω μέθοδοι:

- Άρδευση των καλλιεργειών – Διάθεση των ΥΑΕ στο έδαφος
- Λίμνες επεξεργασίας
- Παραγωγή βιολιπασμάτων – Θερμόφιλη χώνευση (composting)
- Παραγωγή εδώδιμης βιομάζας και ζωοτροφών
- Αναερόβια βιολογική επεξεργασία
- Φωτοχημική εξουδετέρωση της τοξικότητας - Υγρή οξείδωση
- Απομάκρυνση των στερεών
- Θρόμβωση, καθίζηση, επίπλευση, εξαγωγή φαινολικών με διαλύτη
- Υπερδιήθηση, αντίστροφη όσμωση

- Θερμική συμπύκνωση και αποτέφρωση

Κάθε μία από τις παραπάνω μεθόδους επεξεργασίας παρουσιάζει οφέλη αλλά και μειονεκτήματα (Πιν. 2.6).

Πίνακας 2.6: Συνοπτική παρουσίαση των προτερημάτων και μειονεκτημάτων των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των ΥΑΕ.

Μέθοδος Επεξεργασίας	Ωφέλη	Μειονεκτήματα
Άρδευση των καλλιεργειών – Διάθεση των ΥΑΕ στο έδαφος	<u>Ολοκληρωμένη</u> διαδικασία ανακύκλωσης. <u>Μακροπρόθεσμη</u> γονιμότητα (κυρίως περιεχόμενο σε Κ, Ρ και οργανική ουσία) των αγροτικών εδαφών.	<u>Μερική λύση</u> λόγω των περιορισμών διάθεσης ως προς τον όγκο των ΥΑΕ.
Λίμνες εξάτμισης	<u>Αποδοτικές</u> σε περιοχές με ξηροθερμικό κλίμα – Κρήτη.	<u>Διαθεσιμότητα</u> της απαιτούμενης έκτασης. <u>Κόστος μεταφοράς</u> των αποβλήτων από το εργοστάσιο στις λίμνες εξάτμισης. <u>Παρουσία</u> εντόμων και οσμών. <u>Ενδείξεις ρύπανσης</u> των υπόγειων υδροφορέων.
Παραγωγή βιολιπασμάτων – Θερμόφιλη χώνευση (composting)	<u>Βελτίωση</u> των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους. <u>Ανακύκλωση</u> των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στα ΥΑΕ. <u>Σημαντική</u> μείωση της φυτοτοξικότητας των ΥΑΕ.	<u>Δεν είναι δυνατή</u> η διαχείριση του όγκου των ΥΑΕ κάθε περιόδου από τις υπάρχουσες εγκαταστάσεις. <u>Βιωσιμότητα</u> των εταιριών εξαρτάται από το κόστος παραγωγής λιπάσματος και την τιμή πώλησης στην εκάστοτε χώρα.
Παραγωγή ζωοτροφών	<u>Παραγωγή</u> ζωοτροφών καθώς και εδώδιμων μανιταριών	
Αναερόβια βιολογική επεξεργασία	Μείωση του ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων μεταξύ 60-95 % σε όρους BOD ₅ . <u>Οικονομική αξιοποίηση</u> του βιοαερίου.	<u>Απαιτείται</u> μεγάλο χρονικό διάστημα επανεκκίνησης των βιοαντιδραστήρων κάθε χρονιά. <u>Χρειάζονται</u> ειδικές εγκαταστάσεις και εξειδικευμένο προσωπικό - αύξηση κόστους.
Υγρή οξείδωση	Σημαντική μείωση COD και αποχρωματισμός	<u>Υψηλό κόστος</u> εγκατάστασης και λειτουργίας. <u>Ειδικευμένο</u> προσωπικό
Απομάκρυνση των στερεών	<u>Μερική</u> απομάκρυνση των φαινολικών	<u>Μειωμένη</u> αξιοπιστία <u>Υψηλό</u> ενεργειακό κόστος
Θρόμβωση, καθίζηση, επίπλευση.	<u>Μερική</u> απομάκρυνση των φαινολικών. <u>Παραγωγή</u> λιπασμάτων μετά την επίπλευση.	<u>Απαιτείται</u> επιπλέον επεξεργασία των προϊόντων. <u>Μειωμένα</u> αποτελέσματα.
Υπερδιήθηση, αντίστροφη όσμωση	<u>Συγκέντρωση</u> του ρυπογόνου τμήματος σε μικρό όγκο. <u>Απόληψη</u> των υποπροϊόντων αξίας. <u>Επαναχρησιμοποίηση</u> του νερού.	<u>Υψηλό κόστος</u> μεμβρανών. <u>Συχνό βούλωμα</u> των μεμβρανών.
Θερμική συμπύκνωση και αποτέφρωση	<u>Χαμηλό</u> ενεργειακό κόστος.	<u>Μη ικανοποιητική</u> μείωση των ρυπογόνων συστατικών των ΥΑΕ.

Ιδανικά, η συνδυασμένη χρήση όλων των μεθόδων θα μπορούσε να δώσει μια ικανοποιητική λύση στο πρόβλημα ρύπανσης των ΥΑΕ, αλλά και πρόσθετο εισόδημα από την αξιοποίηση των προϊόντων επεξεργασίας τους.

2.5 Η διάκριση μεταξύ ειδών στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

Μέχρι την ανακάλυψη του DNA και την αναγνώρισή του ως μορίου με πληροφοριακό χαρακτήρα, η ταξινόμηση των προκαρυωτικών οργανισμών είχε ως βάση αποκλειστικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Το γεγονός ότι τα κριτήρια για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών δεν ήταν σαφώς καθορισμένα, σε συνδυασμό με την παράλληλη ταξινόμηση διάφορων μικροοργανισμών από διαφορετικούς επιστήμονες, οδήγησε σε προβλήματα ταξινόμησης, αφού μικροοργανισμοί που κατατάσσονταν στο ίδιο είδος βρίσκονταν στις λίστες ονοματολογίας υπό διαφορετικά διωνυμικά ονόματα. Η χρήση μοριακών τεχνικών που περιλαμβάνουν πειράματα αποδιάταξης και επανασύνδεσης DNA αλλά και υπολογισμό του ποσοστού G+C του προκαρυωτικού γονιδιώματος έδωσαν νέα διάσταση στη φυλογενετική κατάταξη των μικροοργανισμών. Οι μοριακές μέθοδοι, παρότι είναι πιο φθηνές και θεωρούνται πιο αξιόπιστες, δεν έχουν όλες την ίδια διακριτική ικανότητα (Εικ. 2.6). Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η σύγκριση των συντηρημένων αλληλουχιών (π.χ. 16S rRNA) δεν εκφράζει απαραίτητα και την εξέλιξη των μικροοργανισμών, αλλά την εξέλιξη των ίδιων των γονιδίων (37). Παρόλα αυτά η μέθοδος της ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο από τους σύγχρονους γενετιστές (51). Η συσχέτιση μεταξύ της ομοιότητας του γονιδίου 16S rRNA και το ποσοστό υβριδισμού DNA-DNA επιτυγχάνεται μέσω μιας λογαριθμικής εξίσωσης, σύμφωνα με την οποία, το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας του 16S rRNA μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους αναμένεται να είναι >98% (αντιστοιχεί σε >70% ομοιότητα γενωμικού DNA, 0.916 ομοιότητα στη βάση δεδομένων RDP II), και μεταξύ διαφορετικών ειδών του ίδιου γένους να κυμαίνεται μεταξύ 93.3 και 99%, ανάλογα με το γένος (6, 10), όπως στα fluorescent *Pseudomonas* spp. Παρόλα αυτά διαφορετικοί ερευνητές έχουν φτάσει σε διαφορετικά συμπεράσματα σε σχέση με το

επίπεδο του ποσοστού ομοιότητας της αλληλουχίας του 16S rRNA που διαφοροποιεί μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους και ειδών του ίδιου γένους. Σε γενικές γραμμές η οι διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών των στελεχών του ίδιου είδους δεν θα πρέπει να ξεπερνάνε το 1-1.5%, ενώ όσον αφορά το αμέσως ανώτερο επίπεδο, μια διαφορά της τάξης του 5-7% υποδεικνύει διαφορετικό γένος (10). Η επικρατούσα άποψη στη σύγχρονη Ταξινόμική, είναι ότι η ταξινόμηση σε επίπεδο είδους, για τους μικροοργανισμούς, μπορεί να επιτευχθεί μόνο από το συνδυασμό φαινοτυπικών και γονοτυπικών παραμέτρων. Για την ταξινόμηση χρησιμοποιούνται αποτελέσματα συστημάτων ταυτοποίησης όπως τα API, VITEK (Biomerieux, Γαλλία) και BIOLOG (Biolog, ΗΠΑ), που στηρίζονται στη δημιουργία ενός βιοχημικού προτύπου, σε συνδυασμό με μοριακές μεθόδους ταυτοποίησης (51).

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
DNA sequencing				
16 S rDNA sequencing				
ARDRA				
DNA-DNA reassociation				
tRNA-PCR				
ITS-PCR				
RFLP LFRFA PFGE				
Multilocus Isozyme				
Whole cell protein profiling				
AFLP				
RAPD's APPCR				
rep-PCR				

Εικόνα 2.6: Σύγκριση της διακριτικής ικανότητας διαφόρων μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης βακτηρίων(51).

2.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βάσει αλληλουχιών επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep – PCR)

Σημαντική ομάδα μοριακών τεχνικών αποτελεί και η rep – PCR, η οποία έχει αποδειχθεί πως είναι εξαιρετικά αξιόπιστη, γρήγορη, με υψηλή διακριτική ικανότητα και επαναληψιμότητα (49). Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί εκκινητικά μόρια (primers), τα οποία είναι συμπληρωματικά με ισχυρά συντηρημένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες εμφανίζονται σε πολλά αντίγραφα στο γονιδίωμα των περισσότερων Gram⁻ αλλά και Gram⁺ βακτηρίων (28). Έχουν αναγνωριστεί τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στις οποίες περιλαμβάνονται μια εξωγονιδιακή αλληλουχία μήκους 35 – 40bp, η REP (**R**epetitive **E**xtragenic **P**alindrome), η οποία αποτελεί ένα παλίνδρομο, μια ενδογονιδιακή αλληλουχία με μήκος 124 – 127bp, την ERIC (**E**nterobacterial **R**epetitive **E**xtragenic **C**onsensus) και την αλληλουχία BOX με μήκος 154bp (28, 49). Αυτές οι αλληλουχίες εμφανίζονται σε ξεχωριστές θέσεις σε όλο το γονιδίωμα. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορεί να εμφανίζονται και προς τις δύο κατευθύνσεις του δίκλωνου DNA. Η μέθοδος επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση των περιοχών που βρίσκονται μεταξύ των στοιχείων REP, ERIC και BOX. Τα ενισχυμένα κομμάτια μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα (bar code), μοναδικού για κάθε στέλεχος (49). Στην προσπάθεια να μελετηθεί η μικροβιακή ποικιλότητα η τεχνική της rep – PCR έχει αναχθεί σε πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση και κατάταξη των βακτηρίων, καθώς και για μοριακές μελέτες πάνω σε παθογόνους μικροοργανισμούς, που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα φυτά, αφού επιτρέπει το διαχωρισμό των μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους (49).

2.6 Στόχοι της Διατριβής

Το αντικείμενο έρευνας της παρούσας διατριβής εντάσσεται σε ένα πρόγραμμα χρηματοδοτούμενο από την Ε.Ε. με τίτλο: «Βιολογική επεξεργασία και αξιοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργίας: Μηχανισμοί και ολοκληρωμένες εφαρμογές». Στόχοι του έργου, μεταξύ άλλων, είναι οι εξής:

- Σύστημα ολοκληρωμένης διαχείρισης των ΥΑΕ με τη χρήση μικροοργανισμών ή / και εδαφικών φίλτρων με αποτέλεσμα την ασφαλή διάθεσή τους στο περιβάλλον και την:
 - Παραγωγή ζωοτροφής από τη ζύμωση των παραπροϊόντων της ελαιουργίας (αερόβια αποδόμηση ΥΑΕ).
 - Βιομετατροπή του πυρηνόξυλου σε υπόστρωμα κατάλληλο για την καλλιέργεια μανιταριών.
 - Παραγωγή χρήσιμων χημικών από την ανάπτυξη βακτηρίων και το μεταβολισμό των ενδιάμεσων παραγώγων που προκύπτουν από την επεξεργασία των ΥΑΕ.
- Αριστοποίηση διαδικασιών παραγωγής κομπόστ με τη συγκομποστοποίηση ΥΑΕ και παραπροϊόντων ελαιουργίας και ανακύκλωση των παραγόμενων οργανικών βελτιωτικών εδάφους σε γεωργικές καλλιέργειες.

Στα πλαίσια της παραπάνω έρευνας διεκπεραιώθηκε η μεταπτυχιακή διατριβή της κας Σαλούστρου κατά την οποία απομονώθηκαν από ΥΑΕ 20 βακτηριακά στελέχη και διευρευνήθηκε η ικανότητά τους στην αποδόμηση φαινολικών συστατικών. Η παρούσα έρευνα αποτελεί συνέχεια της προαναφερθείσας διατριβής και οι στόχοι της ήταν:

- Η βιοχημική ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών με χρήση των τεστ API καθώς και άλλων βιοχημικών χαρακτηριστικών,
- Η μοριακή ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών με:
 - Την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, **P**olymerase **C**hain **R**eaction) βάσει αλληλουχιών επαναλαμβανόμενων στοιχείων (BOX και ERIC),

- ο Την αλληλούχηση της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού DNA (16S rRNA).
- Η διερεύνηση της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών να υδρολύουν την ελευροπαΐνη ή / και να τη χρησιμοποιούν ως μόνη πηγή άνθρακα.

Τα αποτελέσματα της έρευνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επιλογή των πιο αποδοτικών βακτηριακών στελεχών και τη χρησιμοποίησή τους, παράλληλα με άλλους μικροοργανισμούς (πιθανόν μύκητες λευκής σήψης) στην αερόβια αποδόμηση των ΥΑΕ.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Τα 19 βακτηριακά στελέχη ταξινομήθηκαν ως θετικά ή αρνητικά κατά Gram με χρήση διαλύματος ΚΟΗ 3%. Στη συνέχεια χωρίστηκαν περαιτέρω σε εκείνα που πραγματοποιούν οξείδωση ή ζύμωση υδατανθράκων, με καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο Hugh – Leifson (oxidation – fermentation medium). Η σύνθεση του θρεπτικού μέσου σε γραμμάρια ανά λίτρο (1) ήταν, NaCl 5γρ, άγαρ 3γρ, πεπτόνη 2γρ, K₂HPO₄ 0.3γρ, διάλυμα γλυκόζης 10% 100ml, διάλυμα κυανού της βρομοθυμόλης 0,2% 15ml. Το pH του θρεπτικού ρυθμίστηκε στο 7,1 ± 0,2 στους 25°C. Το κάθε στέλεχος εμβολιάστηκε δύο φορές έτσι ώστε να επωαστεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Αναερόβιες συνθήκες επιτεύχθηκαν με την προσθήκη παραφινέλαιου αμέσως μετά τον εμβολιασμό στο σωλήνα επώασης. Τα στελέχη, μαζί με τους θετικούς (*L. plantarum* στ. ACA-DC 0142 (8)) και τους αρνητικούς (*P. syringae* pv. *glycinea* (23)) μάρτυρες, επώαστηκαν στους 28°C για 48 ώρες. Τα στελέχη που είχαν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν τη γλυκόζη μέσω ζυμωτικών μεταβολικών οδών μετέτρεψαν το χρώμα του θρεπτικού μέσου σε κίτρινο. Η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου οφείλεται στην πτώση του pH λόγω της παραγωγής οξέων ως τελικών προϊόντων ζύμωσης (π.χ. γαλακτικό οξύ).

3.1.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με χρήση των τεστ API

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων επιλέχθηκαν τα τεστ API 20NE (bioMerieux κωδ. 20-050) που βασίζονται στη βιοχημική ‘χαρτογράφηση’ του μεταβολικού φάσματος βακτηριακών στελεχών, τα οποία είναι αρνητικά κατά Gram και δεν χρησιμοποιούν ζυμωτικές μεταβολικές οδούς. Τα τεστ πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεως του κατασκευαστή (bioMerieux). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των παραπάνω τεστ (API 20NE) έγινε με το πρόγραμμα APILAB Plus V3.2.2 Version B. Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών στο παραπάνω πρόγραμμα βασίζεται στο ποσοστό (%) των αποτελεσμάτων

του τεστ που συμφωνούν με τις βάσεις δεδομένων για βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα του τεστ παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό (%), ή η ταυτοποίηση είναι ακριβής μέχρι το επίπεδο γένους, προτείνεται από το πρόγραμμα η διεξαγωγή επιπλέον βιοχημικών τεστ προκειμένου να επιτευχθεί πιο αξιόπιστη και ακριβής ταυτοποίηση. Βάσει του προγράμματος πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω τεστ:

Στελέχη 1, 2, 3, 4, 5, 7: κανένα επιπλέον τεστ

Στέλεχος 6: ανίχνευση δραστηριότητας του ενζύμου της λιπάσης, παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό της ξυλόζης και της φρουκτόζης, δυνατότητα ανάπτυξης στους 42°C, δυνατότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο περιεκτικότητας NaCl 4%.

Στελέχη 9, 11, 12, 15, 17, 20: ανίχνευση δραστηριότητας του ενζύμου της λιπάσης, παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό της φρουκτόζης, δυνατότητα ανάπτυξης στους 42°C.

Στέλεχος 18: δυνατότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο περιεκτικότητας NaCl 4%, φθορισμός σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Στέλεχος 19: ανίχνευση δραστηριότητας του ενζύμου της λιπάσης, παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό της φρουκτόζης, δυνατότητα ανάπτυξης στους 42°C, δυνατότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο περιεκτικότητας NaCl 4%.

Το σύνολο των παραπάνω τεστ εφαρμόστηκε σε όλα τα βακτηριακά στελέχη έτσι ώστε να γίνει πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση σε εκείνα που χρειαζόταν, αλλά και να επαληθευτούν όσα δεν απαιτούσαν επιπλέον τεστ. Επιπροσθέτως επαναλήφθηκαν και τα τεστ της ουρεάσης και της οξειδάσης.

3.1.2 Παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό σακχάρων

Η ανίχνευση της δυνατότητας καταβολισμού της φρουκτόζης και της ξυλόζης πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο (Ayers medium – σύνθεση σε γρ. λτ.⁻¹: NH₄H₂PO₄ 1γρ, KCl 0.5γρ, MgSO₄*7H₂O 0.2γρ, κυανό της βρομοθυμόλης 1ml, άγαρ 15γρ, pH 7.2 ± 0.2 στους 25°C) (46) με

συγκέντρωση σακχάρου 0,1%. Η παραγωγή οξέος κατά τον καταβολισμό των σακχάρων αλλάζει το pH του θρεπτικού, με αποτέλεσμα να αλλάζει και το χρώμα του, από κυανό σε κίτρινο.

3.1.3 Ανάπτυξη στους 42°C

Προθερμασμένα τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB (Luria – Bertani, σύνθεση σε γρ. λτ.⁻¹: τρυπτόνη 10γρ, εκχύλισμα ζύμης 5γρ, NaCl 10γρ, άγαρ 15γρ, pH 7.0) (1) εμβολιάστηκαν με όλα τα βακτηριακά στελέχη και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 42°C. Παράλληλα εμβολιάστηκαν, με τα ίδια στελέχη, και τρυβλία με LB που επώαστηκαν για 24 ώρες στους 28°C, έτσι ώστε να συγκριθεί η ανάπτυξη κάθε στελέχους στους 42°C με εκείνη στους 28°C, που ήταν η συνήθης θερμοκρασία επώασης.

3.1.4 Ανάπτυξη σε NaCl 4%

Η δυνατότητα ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών σε αλκαλικό περιβάλλον ελέγχθηκε με τον εμβολιασμό των στελεχών σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με 4% περιεκτικότητα σε NaCl (σύνθεση σε γρ. λτ.⁻¹: τρυπτόνη 10γρ, εκχύλισμα ζύμης 5γρ, NaCl 50γρ) και επώαση στους 28°C για 48 ώρες με ανάδευση 250 κύκλων ανά λεπτό. Η ανάπτυξη εκτιμήθηκε οπτικά με την ύπαρξη θολότητας.

3.1.5 Ενεργότητα λιπάσης

Η λιπάση είναι ένα υδροδιαλυτό ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση εστερικών δεσμών σε μη υδατοδιαλυτά λιπώδη υποστρώματα και μετατρέπει τριγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου επιτυγχάνεται με εμβολιασμό των βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό μέσο TWEEN 80 agar (σύνθεση σε γρ. λτ.⁻¹: Πεπτόνη 10γρ, NaCl 5γρ, CaCl₂*H₂O 0.1γρ, άγαρ 15γρ, TWEEN 80 10ml, pH 7.2 ± 0.2 στους 25°C] (27). Ενδείξεις της δραστηριότητας του ενζύμου αποτελούν η εμφάνιση λευκών κόκκων και το ‘θόλωμα’ του

θρεπτικού μέσου περιμετρικά των αποικιών. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Xanthomonas campestris* subs. *vesicatoria* στ. 5007, 5009, 5047, *Xanthomonas campestris* subs. *vesicatoria* στ. 5076, 5075, 5077, 5071, *Xanthomonas cynarae* στ. 4199, 4188, και *Xanthomonas campestris* subs. *campestris* στ. 5040, 5067, 5069 (23).

3.1.6 Ενεργότητα ουρεάσης

Η ουρεάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία. Η ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με την επώαση των βακτηριακών στελεχών σε Christensen Medium (36) (σύνθεση σε γρ. λι.⁻¹: πεπτόνη 1γρ, δεξτρόζη 1γρ, NaCl 5γρ, Na₂HPO₄ 1.2γρ, KH₂PO₄ 0.8γρ, κόκκινο της φαινόλης 0,012γρ, άγαρ 15γρ, 50ml διαλύματος 40% ουρίας, pH 7.1) στους 28°C για 7 ημέρες. Η δραστηριότητα του ενζύμου εκφράζεται με την αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου λόγω αύξησης του pH. Η αύξηση του pH οφείλεται στην παραγωγή της αμμωνίας. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *P. fluorescens* και *P. putida* στ. 2440, ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας η *E. amylovora*(23).

3.1.7 Ενεργότητα οξειδάσης

Η οξειδάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την οξείδωση συγκεκριμένων αρωματικών αμινών και παράγει χρωματισμένα τελικά παράγωγα. Η ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος 1% tetramethyl - p - phenylene diamine (Sigma). Τα στελέχη που ήταν θετικά στην οξειδάση παρήγαγαν κυανό χρώμα μέσα σε διάστημα 10-15 δευτερολέπτων. Τα βακτηριακά στελέχη *P. fluorescens* και *P. putida* στ. 2440 χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες ενώ η *E. coli* στ. JM83 σαν αρνητικός μάρτυρας.

3.1.8 Φθορισμός σε υπεριώδη ακτινοβολία

Η ανίχνευση φθορισμού γίνεται σε θρεπτικό μέσο χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου και έχει ταξινομική ισχύ σε είδη του γένους *Pseudomonas* (γ Proteobacteria) καθώς μερικά είδη μόνο αυτής της οικογένειας έχουν αυτή την ιδιότητα. Τα βακτηριακά στελέχη επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο KB (1) (King's Medium B, σύνθεση σε γρ. λτ.⁻¹: άγαρ 20γρ, proteose peptone N° 3 20gr, K₂HPO₄ άνυδρο 1,5γρ, MgSO₄ * 7H₂O 1.5γρ, γλυκερόλη 15ml, pH 7.2 ± 0.2 στους 25°C) στους 28°C για 48 ώρες και ο φθορισμός ανιχνεύθηκε με λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 350nm. Οι θετικοί μάρτυρες ήταν τα *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas putida* στ. 2440 (23).

3.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

3.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX - PCR

Προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των αλληλουχιών BOX χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο, διότι οι αλληλουχίες BOX στο προκαρυωτικό γονιδίωμα απαντώνται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Κάθε βακτηριακό στέλεχος έχει σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα του τις παλίνδρομες επαναλήψεις BOX, με αποτέλεσμα να δίνει στην αντίδραση BOX – PCR ένα μοναδικό πρότυπο. Συνεπώς επιτυγχάνεται σύγκριση-διαφοροποίηση σε επίπεδο στελεχών. Ο σχεδιασμός του εκκινητικού μορίου, το οποίο έχει τον κωδικό BOXA1R, έγινε με βάση γνωστές συντηρημένες αλληλουχίες BOX, των προκαρυωτικών γονιδιωμάτων (35, 49, 50). Η αλληλουχία του εκκινητικού μορίου είναι η εξής:

5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3'.

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των αλληλουχιών BOX του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής: 50 ng γενωμικού DNA, 1x Taq buffer (Minotech), 2,5mM MgCl₂, 100μM dNTPs (Minotech), 1μM BOXA1R, 1u Taq polymerase (Minotech), σε αντιδράσεις τελικού όγκου

20μl. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (50), η αντίδραση PCR περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης 7 λεπτών στους 95°C, 30 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95°C, 1 λεπτό σύνδεσης σε θερμοκρασία 53°C, κατά το οποίο το εκκινητικό μόριο σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA, και 8 λεπτά επέκτασης στους 65°C όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης για 16 λεπτά στους 65°C. Όγκος 4μl ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 70V και η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν 3 ώρες. Η σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων έγινε τη χρήση του λογισμικού Phoretix 1D(33).

3.2.2 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση ERIC – PCR

Μια επιπλέον οικογένεια επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών είναι η ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), η οποία είναι μια ενδογονιδιακή αλληλουχία με μήκος 124-127bp, παλίνδρομη όσον αφορά τη μεταγραφή, και περιέχει μια συντηρημένη ανάστροφη επανάληψη (28). Σε διαφορετικά βακτηριακά είδη, η θέση της αλληλουχίας στο χρωμόσωμα διαφέρει, με αποτέλεσμα να δίνει στην αντίδραση ERIC – PCR ένα μοναδικό πρότυπο. Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων, τα οποία έχουν τους κωδικούς ERIC1R και ERIC2, έγινε με βάση γνωστές αλληλουχίες ERIC, του προκαρυωτικού γονιδιώματος (18, 28, 50). Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων είναι η εξής :

ERIC1R: 5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3'

ERIC2: 5' – AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3'

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των ERIC αλληλουχιών του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής: 50 ng γενωμικού DNA; 1x Taq buffer (Minotech), 2,5mM MgCl₂, 100μM dNTPs (Minotech), 1μM ERIC1R, 1μM ERIC2, 1u Taq polymerase (Minotech), σε αντιδράσεις τελικού όγκου 20μl. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (50), η

αντίδραση της PCR περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης 7 λεπτών στους 95°C, 30 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95°C, 1 λεπτό σύνδεσης σε θερμοκρασία 52°C, και 8 λεπτά επέκτασης στους 65°C. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα επέκτασης για 16 λεπτά στους 65°C. Όγκος 4μl από την αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η τάση της ηλεκτροφόρησης ήταν 70V, και η διάρκειά της 3 ώρες. Η σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Phoretix 1D(33).

3.2.3 Ανάλυση αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των τμημάτων 27 – 1492 (2, 13, 30, 42) του 16S rDNA (αρίθμηση κατά *E. coli*) ήταν η εξής: 50ng γενωμικού DNA, 1x Taq buffer (Minotech), 2mM MgCl₂, 200μM dNTPs (Minotech), 100nM 27f, 100nM 1492r, 1u Taq polymerase (Minotech), σε αντιδράσεις τελικού όγκου 20μl. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία(42), η αντίδραση της PCR περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης 3 λεπτών στους 94°C, 20 κύκλους που περιλαμβάνουν 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94°C, 1 λεπτό σύνδεσης σε θερμοκρασία 55°C, , και 3 λεπτά επέκτασης στους 72°. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα επέκτασης για 7 λεπτά στους 72°C. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν, σε όγκο 4μl, σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nucleospin Extract II (Macherey Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας.

3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για κάθε βακτηριακό στέλεχος συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες των ριβοσωμικών γονιδιακών τραπεζών NCBI και RDP II (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,

<http://rdp.cme.msu.edu/>) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και του εργαλείου Sequence Match αντίστοιχα, ώστε να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα αλληλουχίας με βάση την πρωτοταγή δομή των γονιδίων. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα BioEdit (20) όπου ακολούθησε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με αυτές από τα συγγενή είδη, όπως προσδιορίστηκαν από τα API test, αλλά και με τις αλληλουχίες ριβοσωμικού DNA που παρουσίαζαν υψηλότερη ομοιότητα από τις βάσεις δεδομένων NCBI και RDP (Ribosomal Database Project, Παράρτημα IV). Η φυλογενετική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MEGA 3.1 (25), με το οποίο κατασκευάστηκε φυλόγραμμα (Εικ. 4.9) με τη μέθοδο Neighbor-Joining και με παραμέτρους Kimura 2.

Η μέθοδος του πλησιέστερου γείτονα (Neighbour – Joining) αποτελεί μια μέθοδο αποστάσεων. Σε αυτή τη μέθοδο οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των σημείων (βάσεων) που διαφέρουν ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες σε μία πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μια λογαριθμική μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται υπολογισμοί που περιλαμβάνουν τον χειρισμό μιας μήτρας (matrix) αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Κάθε φορά που ξεκινάει μια ευθυγράμμιση υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό διαφορών και τα στοιχεία καταγράφονται στη μήτρα αποστάσεων (19).

Ο βαθμός υποστήριξης των κλάδων υπολογίστηκε με τη μέθοδο της δειγματοληψίας με επανατοποθέτηση των δεδομένων (bootstrap) στην αρχική μήτρα των γονιδιακών συχνοτήτων με τη βοήθεια του προγράμματος PhyIip (16). Στη συγκεκριμένη εργασία η διαδικασία του bootstrap επαναλήφθηκε 10.000 φορές.

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε έχει τη μορφή φυλογράμματος. Σε ένα φυλόγραμμα όλοι οι απόγονοι ενός κοινού προγόνου που απεικονίζεται με ένα κόμβο ανήκουν στον ίδιο κλάδο ή στην ίδια μονοφυλετική ομάδα. Το φυλόγραμμα δίνει πληροφορίες τόσο για τη σειρά των κλάδων όσο και για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων.

3.3 Ανίχνευση ικανότητας υδρόλυσης της ελευροπαΐνης

Η ελευροπαΐνη είναι εστέρας ελενολικού και υδρόξυ - τυροσολικού οξέος, βρίσκεται σε αυξημένη ποσότητα στη σάρκα του ελαιόκαρπου και είναι το συστατικό που δίνει τη χαρακτηριστική πικρή γεύση στις άγουρες ελιές (31, 47). Επιπλέον αποτελεί ένα από τα φαινολικά που βρίσκονται σε αφθονία εκτός από τη σάρκα του ελαιοκάρπου, και στα φύλλα της ελιάς (47), και διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η υδρόλυση της ελευροπαΐνης επιτυγχάνεται ενζυματικά (β - γλυκοσιδάση) και βιοχημικά με την προσθήκη NaOH κατά την επεξεργασία των ελαιοκάρπων πριν την κατανάλωση(8, 31).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της ενεργότητας της β - γλυκοσιδάσης στα βακτηριακά στελέχη που έχουν απομονωθεί από ΥΑΕ. Τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο τύπου LB(23) με υπόστρωμα 5 - βρωμο - 4 - χλωρο - 3 - ινδονυλ - β - D - γλυκοκυρανοσιδίου (X - Gluc)(4, 8, 9, 17). Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus plantarum* στ. ACA-DC 0142, B21, LH3(8) και σαν αρνητικός μάρτυρας το *E. coli* στ. JM 83(23).

Στη συνέχεια, τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο τύπου M9 (1) με συγκέντρωση 0.1% ελευροπαΐνης. Στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο η μόνη πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς είναι η ελευροπαΐνη, επομένως οποιαδήποτε βακτηριακή ανάπτυξη υποδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησης της ελευροπαΐνης σαν θρεπτικό υπόστρωμα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε θρεπτικά μέσα τύπου LB (1) και MRS (1) (με και χωρίς γλυκόζη), τα οποία είναι πιο πλούσια και ενδεχομένως να ευνοούσαν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία ελευροπαΐνης.

Η ελευροπαΐνη που χρησιμοποιήθηκε είχε βαθμό καθαρότητας ~98% και παραχωρήθηκε από τον κ. Σκαλτσούνη, Τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας, Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

4. Αποτελέσματα

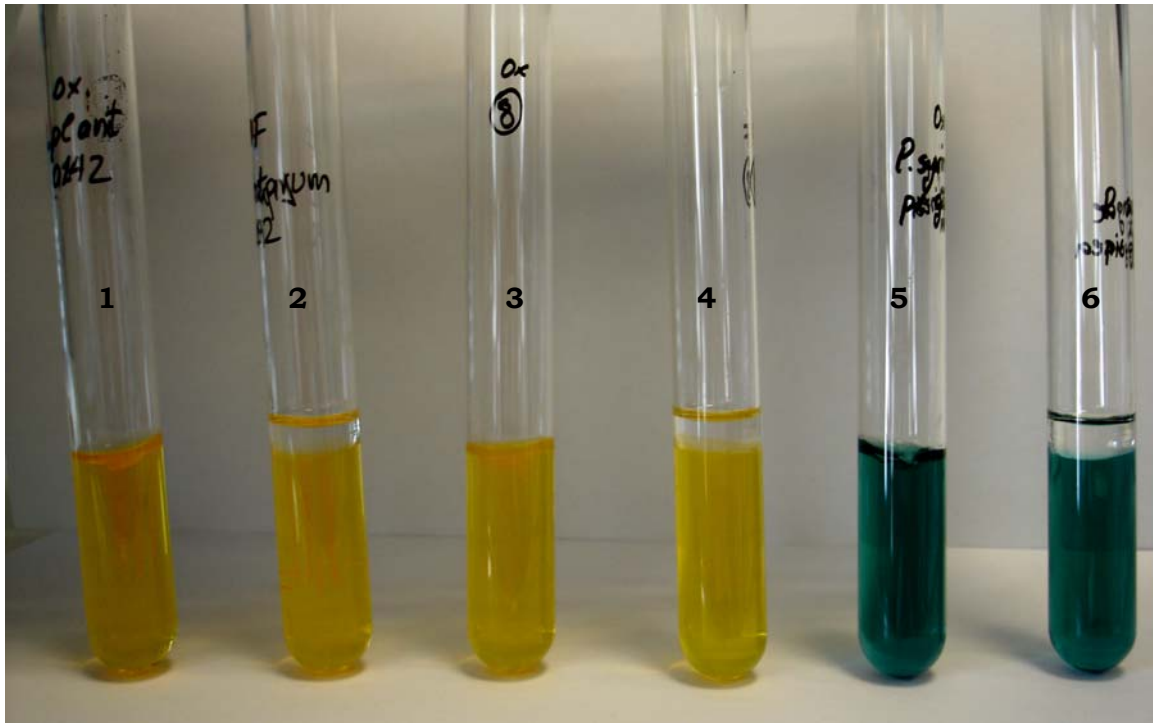
4.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη που είχαν απομονωθεί από ΥΑΕ διαχωρίστηκαν αρχικά ως προς τη δυνατότητα οξείδωσης ή / και ζύμωσης γλυκόζης και στη συνέχεια σε Gram⁺ και Gram⁻ (Πιν. 4.1).

Πίνακας 4.1: Διαχωρισμός βακτηριακών στελεχών σε Gram⁺ και Gram⁻, καθώς και διερεύνηση ικανότητας ζύμωσης ή / και οξείδωσης της γλυκόζης σε θρεπτικό μέσο τύπου Hugh-Leifsons O/F medium(1).

Στέλεχος	Οξείδωση Γλυκόζης	Ζύμωση Γλυκόζης	Gram
1	+	-	-
2	+	-	-
3	+	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	+	+
9	+	-	-
11	+	-	-
12	+	-	-
14	+	+	+
15	+	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	-	-
<i>L. plantarum</i> στ. ACA-DC 0142 (θετικός μάρτυρας(8))	+	+	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (αρνητικός μάρτυρας (23))	+	-	-

Τα στελέχη που είχαν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν τη γλυκόζη μέσω ζυμωτικών μεταβολικών οδών μετέτρεψαν το χρώμα του θρεπτικού μέσου σε κίτρινο (Εικ. 4.1).



Εικόνα 4.1: Ενδεικτικά αποτελέσματα πειράματος οξείδωσης ή / και ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τύπου Hugh – Lefsons O/F medium. Το κίτρινο χρώμα οφείλεται στην πτώση του pH λόγω των προϊόντων του μεταβολισμού. **1, 3, 5:** Αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, **2, 4, 6:** Αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, **1, 2:** Θετικός μάρτυρας *L. plantarum* str. ACA-DC 0142, **3, 4:**στ. 8, **5, 6:** Αρνητικός μάρτυρας *P. syringae* pv. *glycinea*.

4.1.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με χρήση των τεστ API

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων επιλέχθηκαν τα τεστ API 20NE (bioMérieux κωδ. 20-050) που βασίζονται στη βιοχημική ‘χαρτογράφηση’ του μεταβολικού φάσματος βακτηριακών στελεχών (Εικ. 4.2) τα οποία είναι Gram⁻ και δεν χρησιμοποιούν ζυμωτικές μεταβολικές οδούς.. η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των παραπάνω τεστ (API 20NE) έγινε με το λογισμικό APILAB Plus V3.2.2 Version B.



Εικόνα 4.2: Ενδεικτικά αποτελέσματα των στελεχών (1, 2, 4) των API 20NE.

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών στο λογισμικό APILAB Plus V3.2.2 Version B βασίζεται στο ποσοστό (%) των αποτελεσμάτων του τεστ που συμφωνούν με τις βάσεις δεδομένων για βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν ήδη χαρακτηριστεί (Πιν. 4.2). Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα του τεστ παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό (%), η ταυτοποίηση είναι ακριβής μέχρι το επίπεδο γένους, και προτείνεται από το πρόγραμμα η διεξαγωγή επιπλέον βιοχημικών τεστ (Πιν. 4.3) προκειμένου να επιτευχθεί πιο αξιόπιστη και ακριβής ταυτοποίηση.

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα των API 20NE μετά την επεξεργασία με το λογισμικό APILAB Plus V 3.2.2 version B. Στον πίνακα αναγράφεται το στέλεχος, το ποσοστό βεβαιότητας της ταυτοποίησης και μια εκτίμηση της ταυτοποίησης.

Στέλεχος	Αποτέλεσμα API	Ποσοστό βεβαιότητας (%)	Χαρακτηρισμός ταυτοποίησης
1	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
2	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
3	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
4	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
5	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
7	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
19	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
20	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	97.7	Καλή
6	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	63.2	Μη αποδεκτή
	<i>Alc. xylo. ssp den.</i>	16.7	Μη αποδεκτή
	<i>Ps. picketii</i>	10.0	Μη αποδεκτή
	<i>Com. acodovorans</i>	3.8	Μη αποδεκτή
	<i>Ps. mesophilica</i>	3.1	Μη αποδεκτή
9	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	80.0	Δεκτική
11	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	80.0	Δεκτική
12	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	80.0	Δεκτική
15	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	80.0	Δεκτική
17	<i>Com. testo. / Ps. alcal.</i>	80.0	Δεκτική
18	<i>Ps. picketii</i>	51.6	Δεκτική σε επίπεδο γένους
	<i>Ps. aeruginosa</i>	34.8	Δεκτική σε επίπεδο γένους

Πίνακας 4.3: Απεικόνιση των επιπλέον βιοχημικών τεστ που χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν έτσι ώστε να καταστούν πιο αξιόπιστες οι βιοχημικές ταυτοποιήσεις των API 20NE. Τα ποσοστά που αναγράφονται αναφέρονται στη συχνότητα που τα αντίστοιχα στελέχη είναι θετικά στα τέστ, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του λογισμικού APILAB Plus V 3.2.2 version B.

Στέλεχος	Επιπλέον βιοχημικά τεστ						Ταυτοποίηση σύμφωνα με τα αποτελέσματα των επιπλέον τεστ
	Φθορισμός 350nm	Λιπάση	NaCl 4%	42°C	Παραγωγή οξέος από Ξυλόζη	Παραγωγή οξέος από Φρουκτόζη	
6	-	98%	0%	98%	2%	1%	<i>Ps. alcaligenes</i>
	-	1%	49%	1%	95%	49%	<i>Ps. mesophilica</i>
	-	98%	98%	56%	98%	95%	<i>Ps picketii</i>
	-	13%	0%	98%	2%	75%	<i>Ps pseudoalcaligenes</i>
	-	6%	98%	53%	2%	1%	<i>Alc. xylo ssp. den.</i>
9, 11, 12, 15, 17	-	98%	0%	-	2%	1%	<i>Ps. alcaligenes</i>
	-	1%	49%	-	95%	49%	<i>Ps. mesophilica</i>
	-	98%	98%	-	98%	95%	<i>Ps. picketii</i>
	-	13%	0%	-	2%	75%	<i>Ps pseudoalcaligenes</i>
	-	6%	98%	-	2%	1%	<i>Alc. xylo ssp. den.</i>
	-	98%	0%	-	2%	1%	<i>Com. testosteronii</i>
	-	98%	2%	-	2%	95%	<i>Com. cidovorans</i>
18	0%	-	-	-	-	-	<i>Ps. picketii</i>
	100%	-	-	-	-	-	<i>Ps. aeruginosa</i>

Πίνακας 4.4: Συγκεντρωτικός πίνακας απεικόνισης των αποτελεσμάτων της βιοχημικής ταυτοποίησης των βακτηριακών στελεχών. Το παρασκεύασμα γλυκερόλης του στελέχους 10 ήταν μολυσμένο, επομένως έγινε ένας διαχωρισμός με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καλλιεργειών. +, θετικό; -, αρνητικό; ±, ασθενώς θετικό; **NT**, (not tested) δεν έγινε.

Χαρακτηριστικά	Στελέχη																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10a	10b	11	12	14	15	17	18	19	20	
Gram	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Οξείδωση Γλυκόζης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ζύμωση Γλυκόζης	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Ενεργότητα Οξειδάσης	±	±	+	+	±	±	±	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Ενεργότητα Ουρεάσης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Ενεργότητα Λιπάσης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Παραγωγή οξέως από Φρουκτόζη	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Παραγωγή οξέως από Ξυλόζη	+	+	+	-	+	+	+	-	+	NT	+	+	+		+	+	+	+	+	
Ανάπτυξη στους 42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ανάπτυξη σε 4% NaCl	±	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	
Φθορισμός σε μήκος κύματος 350nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	

Στη συνέχεια αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα του βιοχημικού χαρακτηρισμού σύμφωνα με το λογισμικό των API 20NE και το Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (23), έτσι ώστε να γίνει η καλύτερη δυνατή ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών (Πιν. 4.5).

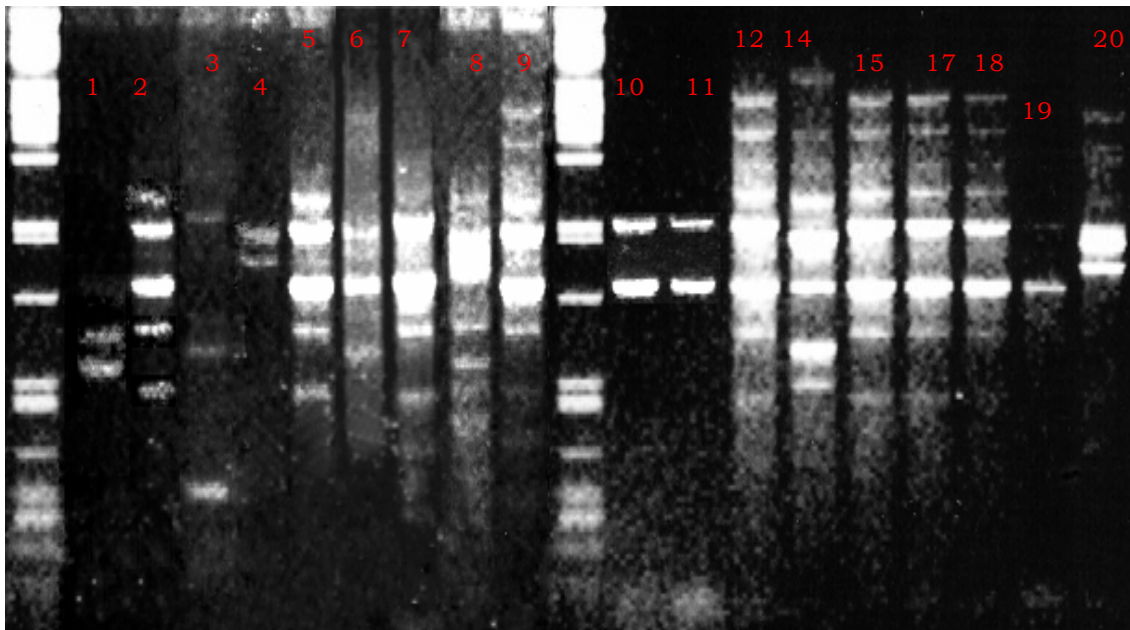
Πίνακας 4.5: Αποτελέσματα της επεξεργασίας των βιοχημικών χαρακτηριστικών των στελεχών που είχαν απομονωθεί από ΥΑΕ. Σημειώνεται πως οι ταυτοποιήσεις διαμορφώνονται βάσει των συγκρίσεων των βιοχημικών χαρακτηριστικών των στελεχών με κλείδες ταυτοποίησης.

Στέλεχος από ΥΑΕ	Ταυτοποίηση σύμφωνα με βιοχημικά χαρακτηριστικά
1, 2, 3, 4, 5, 7, 19, 20	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ssp. <i>denitrificans</i>
6	<i>Pseudomonas picketii</i>
9, 11, 12, 15, 17	<i>Pseudomonas mesophilica</i>
18	<i>Pseudomonas picketii</i>

4.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

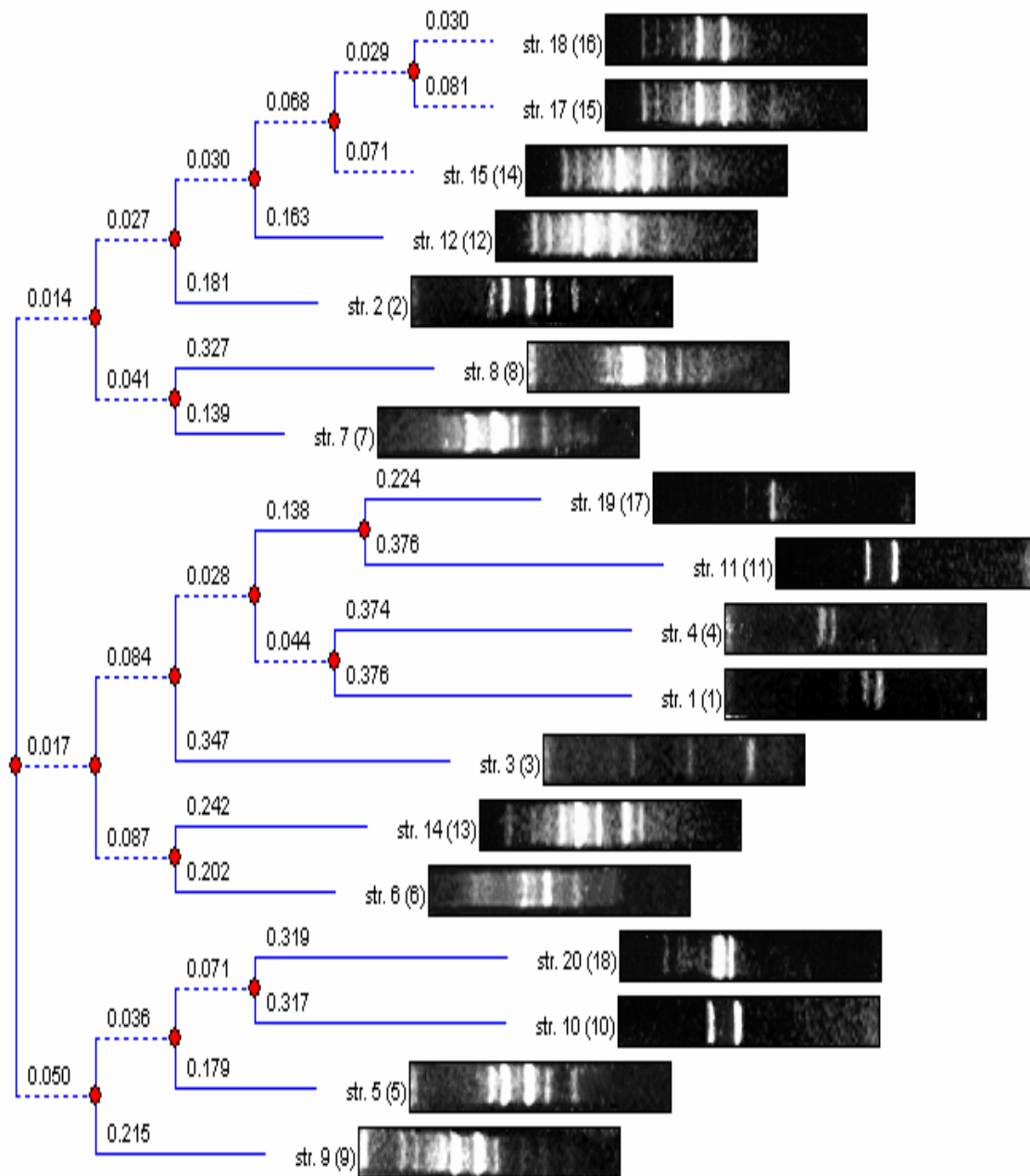
4.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX - PCR

Προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο, διότι οι BOX αλληλουχίες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα απαντώνται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Κάθε βακτηριακό στέλεχος έχει σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα του τις παλίνδρομες επαναλήψεις BOX, με αποτέλεσμα να δίνει στην αντίδραση BOX – PCR ένα μοναδικό πρότυπο. Συνεπώς επιτυγχάνεται διαχωρισμός σε επίπεδο στελέχους.

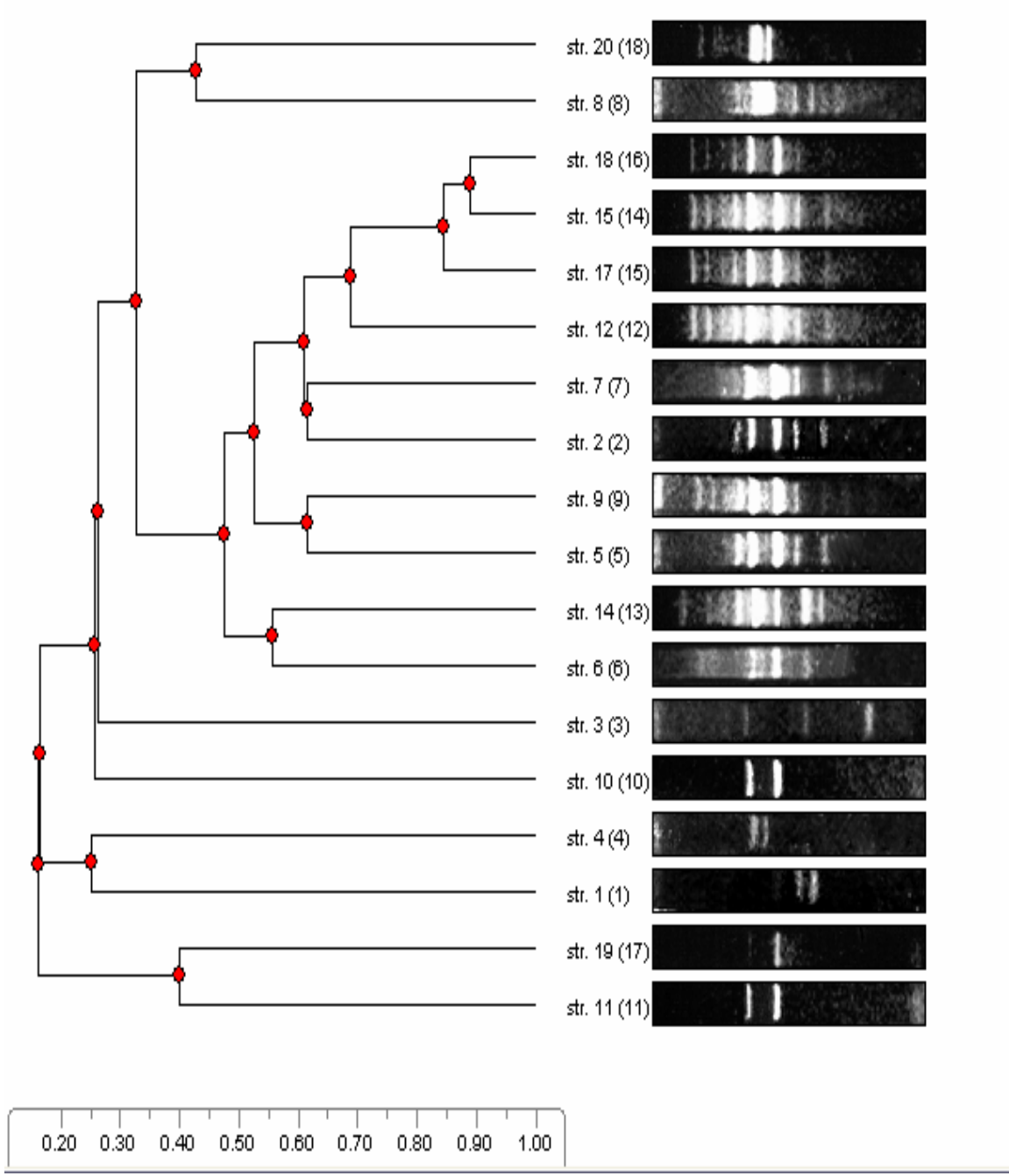


Εικόνα 4.3: Απεικόνιση του πηκτώματος αγαρόζης όπου διακρίνονται τα μοριακά αποτυπώματα των βακτηριακών στελεχών για τις αλληλουχίες BOX. Στην εικόνα αναγράφεται και ο αύξων αριθμός κάθε στελέχους. Οι στήλες που δεν φέρουν αριθμό αντιστοιχούν σε λDNA PstI.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 4.3, τα ενισχυμένα κομμάτια δίνουν την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα (bar code), μοναδικού για κάθε στέλεχος, ο οποίος με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού μπορεί να αναλυθεί με μεγάλη ακρίβεια (Εικ. 4.4 και 4.5)



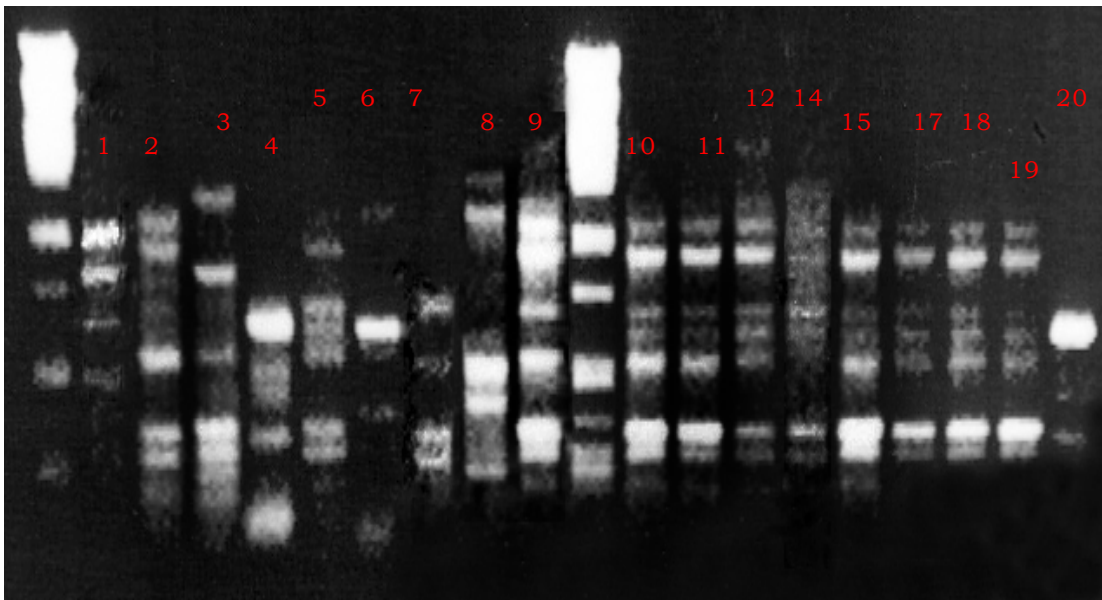
Εικόνα 4.4: Κλαδόγραμμα συσχέτισης των μοριακών αποτυπωμάτων από τις αλληλουχίες BOX. Η επεξεργασία της φωτογραφίας του πηκτώματος αгарόζης έγινε με το λογισμικό Phoretix 1D (33), με το οποίο πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των αποτυπωμάτων κάθε στελέχους. Στην εικόνα περιλαμβάνονται και οι τιμές των αποστάσεων των αποτυπωμάτων. Στην παρένθεση αναγράφεται ο αριθμός που αντιστοιχεί στο πηγάδι του πηκτώματος αгарόζης, ενώ πριν αναγράφεται ο αριθμός του στελέχους.



Εικόνα 4.5: Κλαδόγραμμα απεικόνιση των μοριακών αποτυπωμάτων των βακτηριακών στελεχών για τις αλληλουχίες BOX. Ισχύουν οι ίδιες παράμετροι όπως στην Εικόνα 4.4

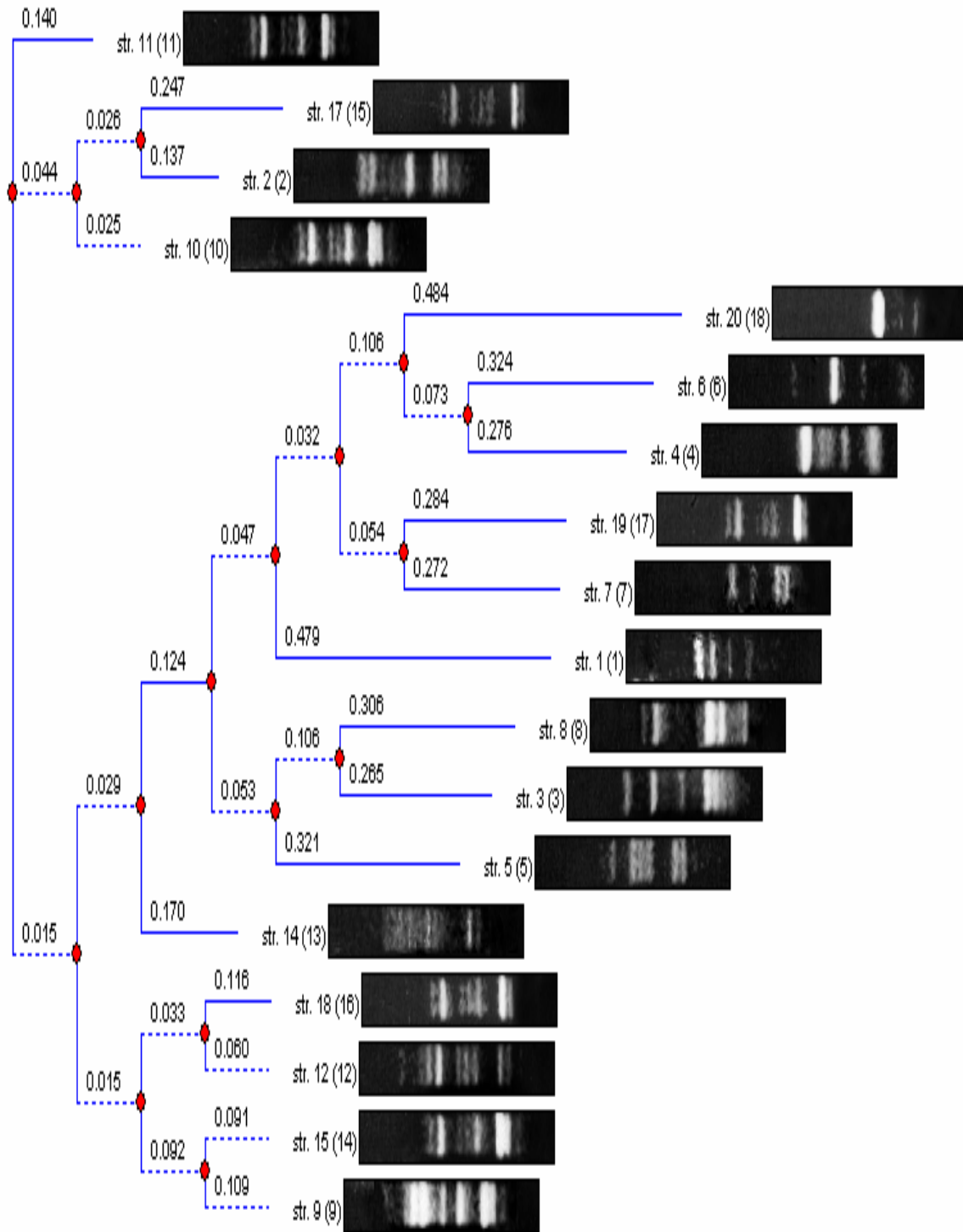
4.2.2 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση ERIC – PCR

Η ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), είναι μια ενδογονιδιακή αλληλουχία με μήκος 124-127bp, παλίνδρομη όσον αφορά τη μεταγραφή, και περιέχει μια συντηρημένη ανάστροφη επανάληψη (28). Σε διαφορετικά βακτηριακά είδη, ο τύπος της αλληλουχίας στο χρωμόσωμα διαφέρει, με αποτέλεσμα να δίνει στην αντίδραση ERIC – PCR ένα μοναδικό πρότυπο (Εικ. 4.6).

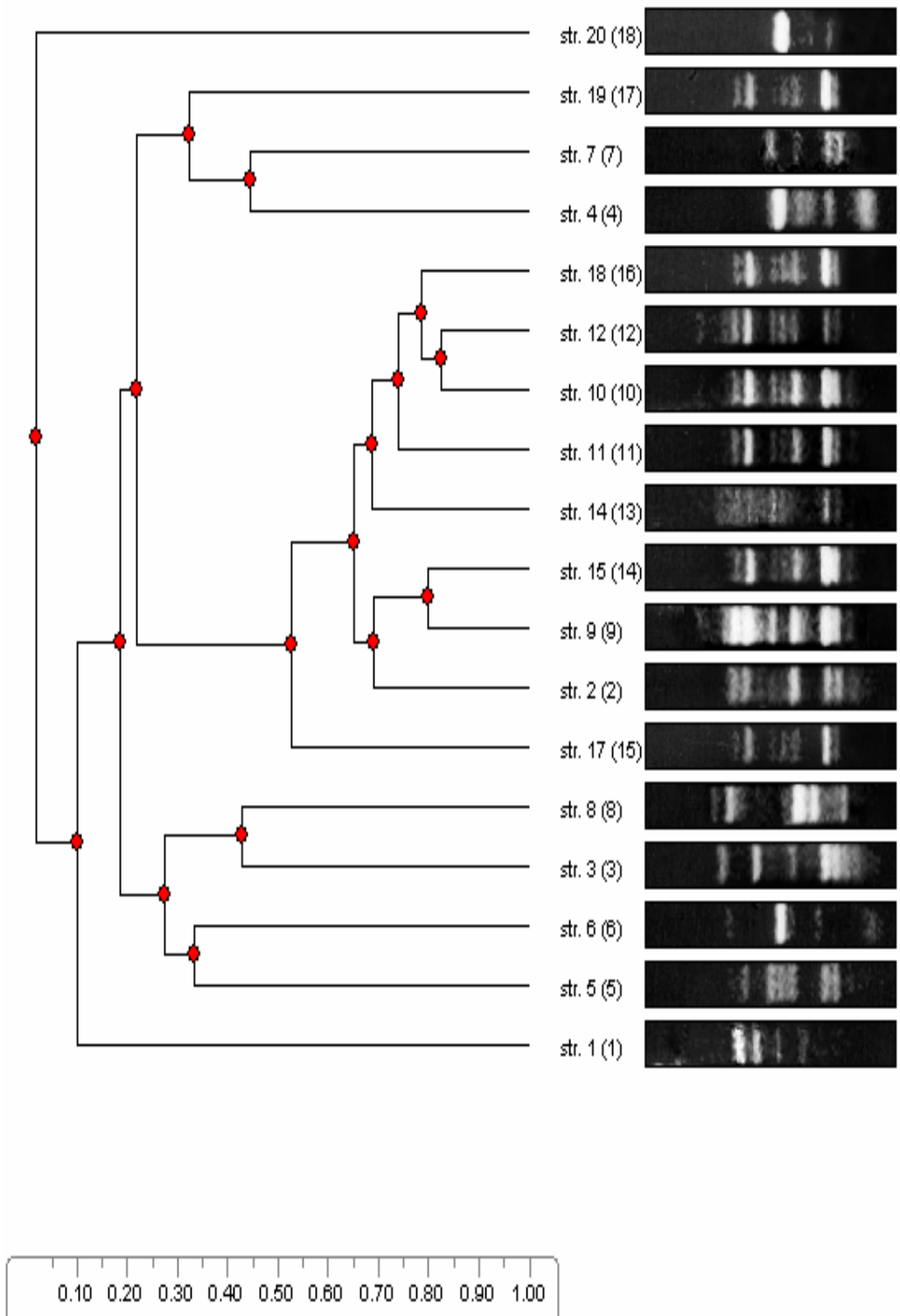


Εικόνα 4.6: Απεικόνιση του πηκτώματος αγαρόζης όπου διακρίνονται τα μοριακά αποτυπώματα των βακτηριακών στελεχών για τις αλληλουχίες ERIC. Στην εικόνα αναγράφεται και ο αύξων αριθμός κάθε στελέχους. Οι στήλες που δεν φέρουν αριθμό αντιστοιχούν σε λDNA PstI.

Όπως και στις αλληλουχίες BOX, η ενίσχυση των αλληλουχιών ERIC αποφέρει ένα μοριακό αποτύπωμα που μοιάζει με ραβδωτό κώδικα. Με την επεξεργασία της εικόνας μέσω του κατάλληλου λογισμικού επιτυγχάνεται η ακριβέστερη σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων (Εικ. 4.7 και 4.8).



Εικόνα 4.7: Κλαδόγραμμα συσχέτισης των μοριακών αποτυπωμάτων από τις αλληλουχίες ERIC. Ισχύουν οι ίδιες παράμετροι όπως στην Εικόνα 4.4



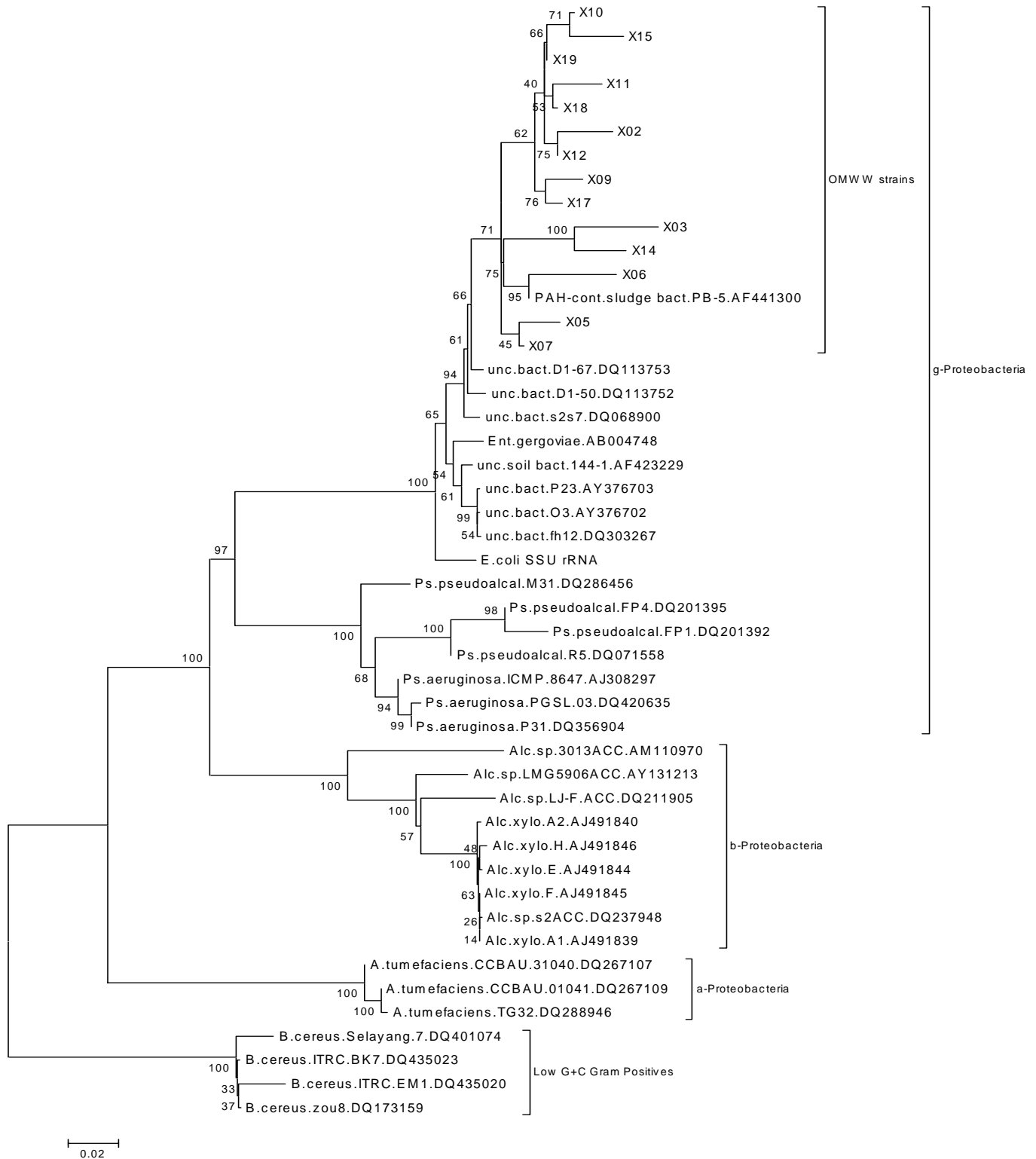
Εικόνα 4.8: Κλαδόγραμμα απεικόνισης των μοριακών αποτυπωμάτων των βακτηριακών σελεχών για τις αλληλουχίες ERIC. Ισχύουν οι ίδιες παράμετροι όπως στην Εικόνα 4.4

4.2.3 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA

Το μήκος των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχηση του 16S rDNA κυμαινόταν μεταξύ 1070 και 1397 bp (Πιν. 4.6). Οι αλληλουχίες για κάθε βακτηριακό στέλεχος συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες κατατεθειμένες στις ριβοσωμικές γονιδιακές τράπεζες NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και του εργαλείου Sequence Match αντίστοιχα, ώστε να βρεθούν οι φυλογενετικά πλησιέστεροι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ταυτότητα πρωτοταγούς δομής με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των rRNA γονιδίων (Παράρτημα IV). Στη συνέχεια οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα BioEdit (20) όπου ακολούθησε συστοίχιση των αλληλουχιών με εκείνες των πλησιέστερων συγγενών που προσδιορίστηκαν (σύμφωνα με τα αποτελέσματα των API test), αλλά και ριβοσωμικού DNA εκείνων που προέκυψαν ως πλησιέστεροι συγγενείς από την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων NCBI (Παράρτημα I) και RDB II (Ribosomal Database Project, Παράρτημα II).

Πίνακας 4.6: Τα μεγέθη των αλληλουχιών 16S rDNA που χρησιμοποιήθηκαν για τη μοριακή ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών.

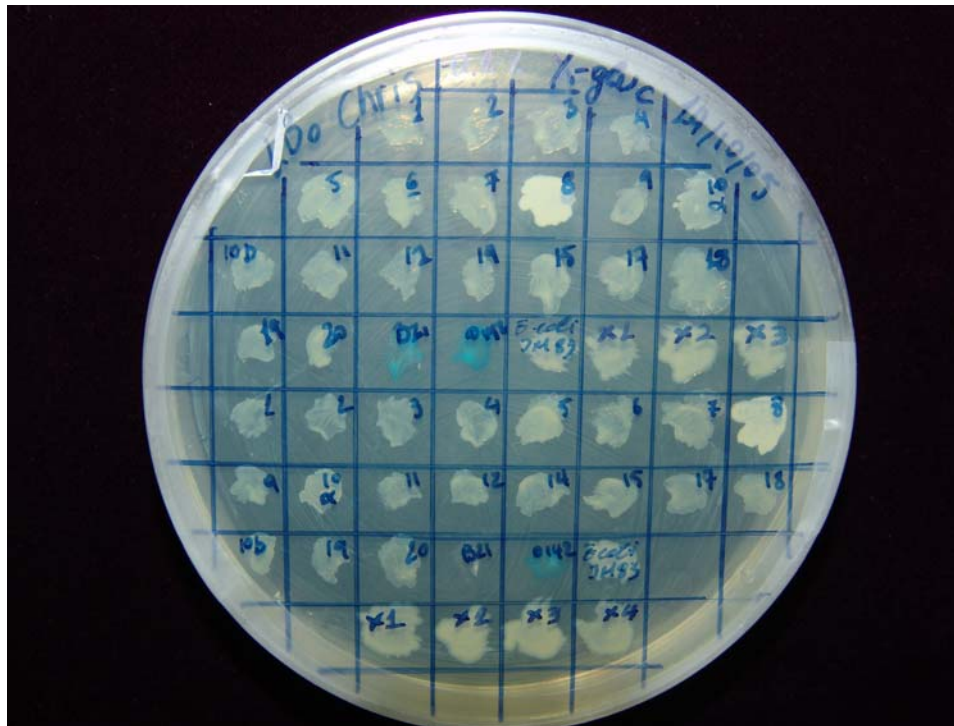
Στέλεχος	bp	Στέλεχος	bp
2	1324	11	1309
3	1358	12	1240
5	1397	14	1258
6	1175	15	1271
7	1070	17	1197
9	1368	18	1218
10	1268	19	1195



Εικόνα 4.9: Δενδρόγραμμα απεικόνιση φυλογενετικών σχέσεων βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέρους του 16S rRNA. Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Neighbor-Joining, παραμέτρους Kimura 2, με υποστήριξη 10,000 επαναλήψεων της μεθόδου Bootstrap (τιμές στους κόμβους) και pairwise deletion στο λογισμικό MEGA 3.1 (25). Τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από ΥΑΕ φέρουν το πρόθεμα X.

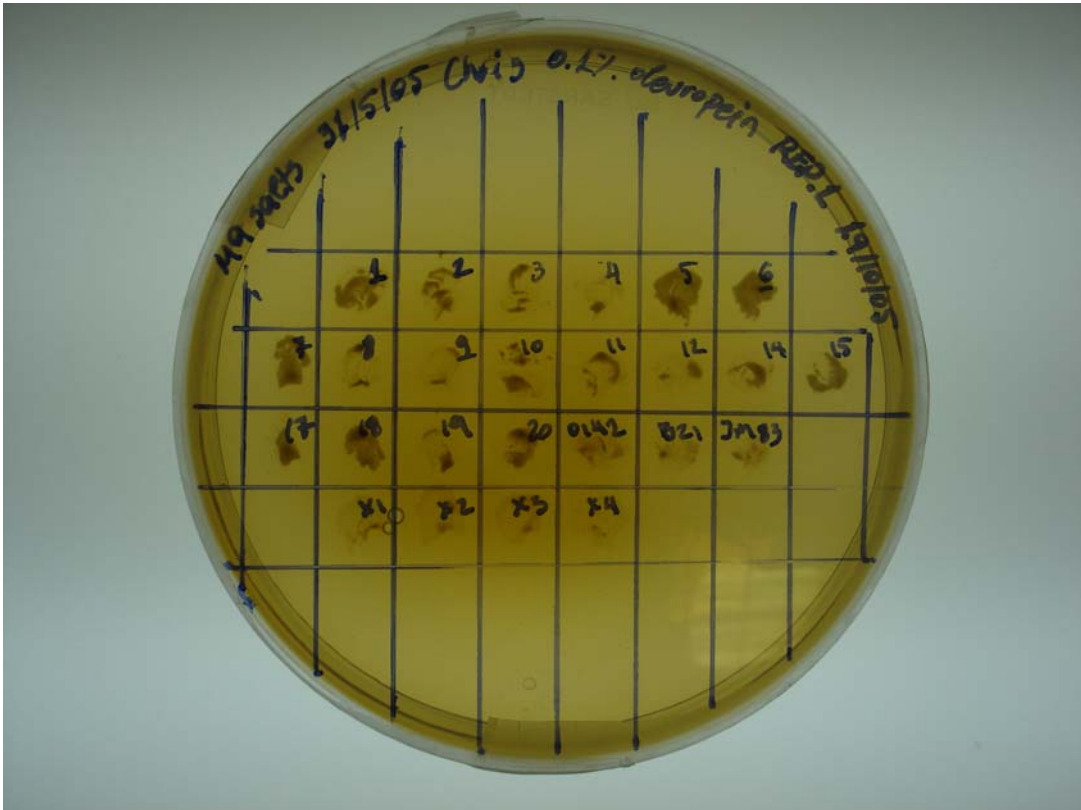
4.3 Ανίχνευση ικανότητας υδρόλυσης της ελευροπαΐνης

Η διερεύνηση της ενεργότητας της β - γλυκοσιδάσης στα βακτηριακά στελέχη που έχουν απομονωθεί από ΥΑΕ πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό σε θρεπτικό μέσο τύπου LB (23) με υπόστρωμα 5 - βρωμο - 4 - χλωρο - 3 - ινδονυλ - β - D - γλυκοπυρανοσιδίου (X - Gluc)(4, 8, 9, 17). Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus plantarum* στ. ACA-DC 0142 και B21 (8), και σαν αρνητικός μάρτυρας το *E. coli* στ. JM 83 (23) (Εικ. 4.10).



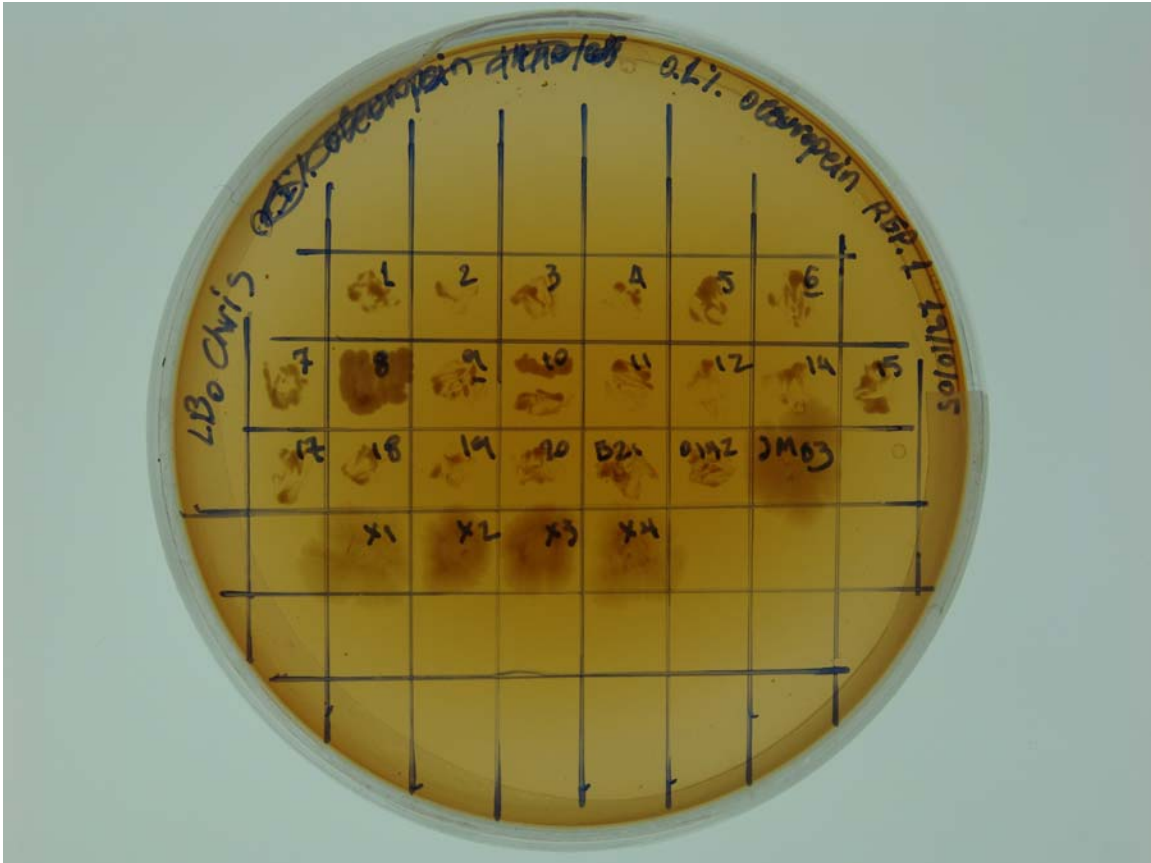
Εικόνα 4.10: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης ενεργότητας β - γλυκοσιδάσης σε θρεπτικό υπόστρωμα LB. Οι αριθμοί επάνω στο τριβλίο αντιστοιχούν στα στελέχη απομονωμένα από ΥΑΕ. Οι αποικίες με κυανό χρωματισμό σχηματίστηκαν από τα στελέχη *Lactobacillus plantarum* στ. ACA - DC 0142 και B21, που χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες. Ο κυανός χρωματισμός υποδεικνύει την ενεργότητα της β - γλυκοσιδάσης. Αντίθετα οι αποικίες της *E. coli* στ. JM 83 (F- ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lac-proAB*) *ara rpsL*) που χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας, δεν παρουσιάζουν ανάλογο χρωματισμό. **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21(pET28c-b-gluc-SP).

Στη συνέχεια, τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο τύπου M9 (1) με συγκέντρωση 0.1% ελευρωπαϊνης (Εικ. 4.11). Στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο η μόνη πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς είναι η ελευρωπαϊνη, επομένως οποιαδήποτε βακτηριακή ανάπτυξη υποδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησης της ελευρωπαϊνης σαν θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 4.11: Ανάπτυξη των, απομονωμένων από ΥΑΕ, στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου M9 salts με 0.1% ελευρωπαϊνη ως μόνη πηγή άνθρακα μετά από επώαση 72 ωρών στους 30°C. Συμπεριλαμβάνονται και τα *L. plantarum* στ. ACA – DC 0142 και B21 καθώς και η *E. coli* στ. JM 83 (F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(*lac-proAB*) *ara rpsL*). Η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου γύρω από τις αποικίες πιθανόν να οφείλεται στην κατακρήμνιση των προϊόντων υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης. **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21 (pET28c-b-gluc-SP).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε πιο πλούσια θρεπτικά μέσα τύπου LB (1) (Εικ. 4.12) και MRS (1) με (Εικ. 4.13) και χωρίς γλυκόζη (Εικ. 4.14) τα οποία ενδεχομένως να ευνοούσαν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.



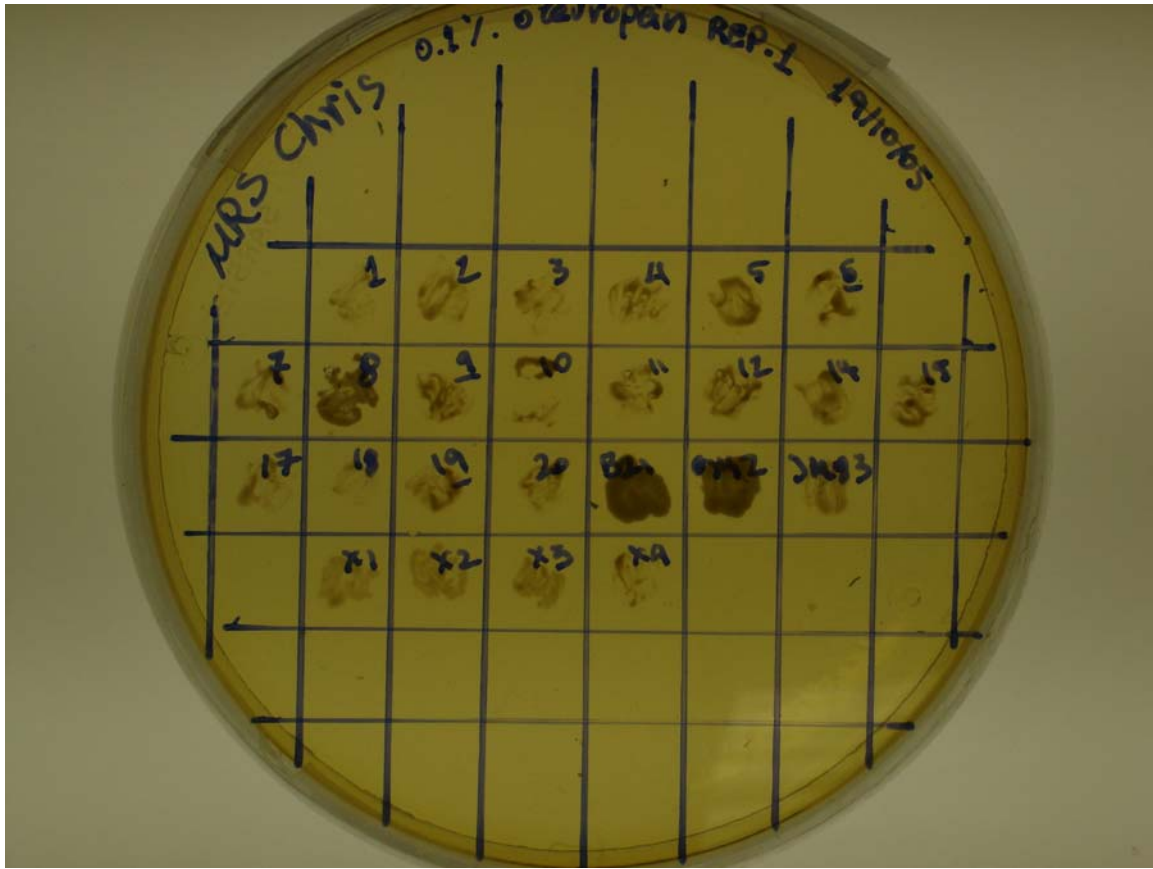
Εικόνα 4.12: Ανάπτυξη των, απομονωμένων από ΥΑΕ, στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου LB με 0.1% ελευρωπαΐνη, μετά από επώαση 72 ωρών στους 30°C. Συμπεριλαμβάνονται και τα *L. plantarum* στ. ACA – DC 0142 και B21 καθώς και η *E. coli* στ. JM 83 (F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(*lac-proAB*) *ara rpsL*). Η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου γύρω από τις αποικίες πιθανόν να οφείλεται στην κατακρήμνιση των προϊόντων υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης. **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21(pET28c-b-gluc-SP).

Έχει αναφερθεί πως η παρουσία γλυκόζης παρεμποδίζει την αποδόμηση της ελευρωπαΐνης από βακτηριακά στελέχη καθώς η γλυκόζη γενικά προτιμάται ως πηγή άνθρακα από τα βακτήρια.



Εικόνα 4.13: Ανάπτυξη των, απομονωμένων από ΥΑΕ, στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου MRS χωρίς γλυκόζη με 0.1% ελευρωπαΐνη, μετά από επώαση 72 ωρών στους 30°C. Η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου γύρω από τις αποικίες πιθανόν να οφείλεται στην κατακρήμνιση των προϊόντων υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης.

Στην εικόνα 4.13 διακρίνεται καθαρά η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος γύρω από τις αποικίες των βακτηριακών στελεχών. Αντίθετα στην εικόνα 4.14, όπου τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται παρουσία 0.1% ελευρωπαΐνης δεν παρατηρείται ανάλογο αποτέλεσμα. Αυτό οφείλεται στην παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα βακτηριακά στελέχη μπορούν να καταβολίσουν τη γλυκόζη με πολύ μικρότερο ενεργειακό κόστος, επομένως δεν αποδομούν την ελευρωπαΐνη.



Εικόνα 4.14: Ανάπτυξη των, απομονωμένων από ΥΑΕ, στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου MRS με γλυκόζη και 0.1% ελευρωπαΐνη, μετά από επώαση 72 ωρών στους 30°C. Συμπεριλαμβάνονται και τα *L. plantarum* στ. ACA – DC 0142 και B21 καθώς και η *E. coli* στ. JM 83 (F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(*lac-proAB*) *ara rpsL*). Δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου γύρω από τις αποικίες παρ' ότι η ανάπτυξη των αποικιών δε φαίνεται να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τις παραπάνω καλλιέργειες. Επομένως η παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα παρεμποδίζει την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης. **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21(pET28c-b-gluc-SP).

5. Συζήτηση

5.1 Βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών με τη χρήση των τεστ API καθώς και τω πρόσθετων βιοχημικών τεστ έδωσε τα αποτελέσματα που φαίνονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα της επεξεργασίας των βιοχημικών χαρακτηριστικών των στελεχών που είχαν απομονωθεί από ΥΑΕ. Σημειώνεται πως οι ταυτοποιήσεις διαμορφώνονται βάσει των συγκρίσεων των βιοχημικών χαρακτηριστικών των στελεχών με κλείδες ταυτοποίησης.

Στέλεχος από ΥΑΕ	Ταυτοποίηση σύμφωνα με βιοχημικά χαρακτηριστικά
1, 2, 3, 4, 5, 7, 19, 20	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ssp. <i>denitrificans</i>
6, 18	<i>Pseudomonas picketii</i>
9, 11, 12, 15, 17	<i>Pseudomonas mesophilica</i>

Τα ποσοστά της ταυτοποίησης σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του λογισμικού APILAB Plus V3.2.2 διέφεραν από στέλεχος σε στέλεχος. Η ταυτοποίηση των στελεχών 1, 2, 3, 4, 5, 7, 19, 20 είχε αρκετά υψηλή πιθανότητα 'ορθότητας', ενώ για τα υπόλοιπα στελέχη απαιτήθηκε η διεξαγωγή περαιτέρω βιοχημικών τεστ (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Κεφάλαιο 3.1). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα μερικών τεστ δεν συμφωνούσαν με τα αναμενόμενα αποτελέσματα σύμφωνα πάντα με τη βάση δεδομένων του λογισμικού APILAB Plus V3.2.2. (Πιν. 4.3). Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους, όσον αφορά στα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά αλλά και στο μεταβολικό τους προφίλ. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η χρήση των τεστ API για ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών απομονωμένων από περιβαλλοντικά δείγματα δεν είναι ευρέως διαδεδομένη, καθότι τα συστήματα ταυτοποίησης αυτού του τύπου αναπτύχθηκαν για τις ανάγκες της κλινικής Μικροβιολογίας. Επομένως, οι βάσεις δεδομένων δεν περιλαμβάνουν βακτηριακά στελέχη που δεν εμφανίζουν κάποιο ιδιαίτερο ιατρικό ενδιαφέρον. Στα πλαίσια της βιοχημικής ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκαν

και κλείδες αναγνώρισης βακτηριακών στελεχών (23) προκειμένου να διασταυρωθούν τα αποτελέσματα των τεστ API. Παρότι τα αποτελέσματα των βιοχημικών τεστ συμφωνούσαν με αυτά των αντίστοιχων βακτηριακών στελεχών στις κλείδες ταυτοποίησης, η ταυτοποίηση δεν ήταν δυνατόν να γίνει μόνο με βάση τις κλείδες, επειδή δεν διερευνήθηκαν όλα τα βιοχημικά χαρακτηριστικά κάθε γένους στην κλείδα.

5.2 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

5.2.1 Διάκριση μικροβιακών στελεχών με αντίδραση BOX – PCR και ERIC – PCR

Στην προσπάθεια να μελετηθεί η μικροβιακή ποικιλότητα η τεχνική του rep – PCR έχει αναχθεί σε χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των βακτηρίων, καθώς και για μοριακές μελέτες πάνω σε παθογόνους μικροοργανισμούς, που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα φυτά, αφού επιτρέπει το διαχωρισμό των μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους. Η μέθοδος επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση των περιοχών που βρίσκονται μεταξύ των στοιχείων REP, ERIC και BOX. Τα ενισχυμένα γενομικά τμήματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα (bar code), χαρακτηριστικού για κάθε στέλεχος.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR αναλύθηκαν οπτικά και με τη χρήση του λογισμικού Phoretix 1D (33). Όπως αναμενόταν, τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων διέφεραν λόγω της υψηλότερης διακριτικής ικανότητας του λογισμικού. Η οπτική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως τα στελέχη 2, 5, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 18 και 19 παρουσιάζουν κοινό μοριακό αποτύπωμα ERIC και BOX μεταξύ τους. Η ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση λογισμικού παρουσιάστηκε με τη μορφή κλαδογραμμάτων (Εικ. 4.4 – 4.8). Σύμφωνα με τα κλαδογράμματα, τα μοριακά αποτυπώματα των βακτηριακών στελεχών χωρίζονται σε τρεις ομάδες για τις αλληλουχίες BOX και ERIC (Πιν. 5.2).

Πίνακας 5.2: Ομαδοποίηση των βακτηριακών στελεχών σύμφωνα με τις θέσεις που καταλαμβάνουν στο δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε βάσει των μοριακών τους αποτυπωμάτων. Ο διαχωρισμός σε ομάδες έγινε σύμφωνα με τους κόμβους των κλάδων του δενδρογράμματος.

BOX			ERIC		
Ομάδα I	Ομάδα II	Ομάδα III	Ομάδα I	Ομάδα II	Ομάδα III
2	1	5	1	9	2
7	3	9	3	12	10
8	4	10	4	15	17
12	6	20	5	18	
15	11		6		
17	14		7		
18	19		8		
			19		
			20		

Σύμφωνα με την ανάλυση των δενδρογραμμάτων και του πίνακα 5.2 παρατηρείται πως τα στελέχη μπορούν να χωριστούν εκ νέου σε ομάδες, αυτή τη φορά με κριτήριο το αν βρίσκονται στην ίδια ομάδα με βάση και τα δύο μοριακά αποτυπώματα (Πιν. 5.3).

Πίνακας 5.3: Ομαδοποίηση των βακτηριακών στελεχών σύμφωνα με τις ομοιότητες που παρουσιάζουν τα μοριακά τους αποτυπώματα στις αλληλουχίες BOX και ERIC.

BOX & ERIC			
Ομάδα I	Ομάδα II	Ομάδα III	Ομάδα IV
1	12	2	7
3	15	17	8
4	18		
6			
19			

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.3 τα μοριακά αποτυπώματα των στελεχών κάθε ομάδας παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες ομοιότητες μεταξύ τους και στις δύο

μεθόδους (BOX και ERIC), συνεπώς, η κάθε ομάδα ενδέχεται να απαρτίζεται από στελέχη ενός βακτηριακού είδους/γένους. Τα βακτηριακά στελέχη που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες 5.2 και 5.3 ενδέχεται να αποτελούν διαφορετικά στελέχη. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μοριακών αποτυπωμάτων δεν είναι το πιο κατάλληλο για το συγκεκριμένο σκοπό, λόγω της χρήσης άγνωστου αλγόριθμου στην επεξεργασία των δεδομένων. Η άντληση πιο αξιόπιστων συμπερασμάτων θα ήταν δυνατή με τη χρήση του λογισμικού GelCompar II vs. 4.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) το οποίο δίνει τη δυνατότητα της εφαρμογής των μεθόδων product moment-UPGMA cluster analysis (7), το οποίο δεν ήταν διαθέσιμο προς χρήση.

5.2.2 Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του γονιδίου 16S rRNA

Οι αλληλουχίες για κάθε βακτηριακό στέλεχος συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες των ριβοσωμικών γονιδιακών τραπεζών NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και των εργαλείων Sequence Match και Classifier αντίστοιχα, ώστε να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ταυτότητα αλληλουχίας με βάση την πρωτοταγή δομή των rRNA γονιδίων. Από τις βάσεις δεδομένων επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες των βακτηριακών στελεχών που παρουσίαζαν ομοιότητα $\geq 95\%$ (Παράρτημα III). Η φυλογενετική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MEGA 3.1 (25), με το οποίο κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα (Εικ. 4.9) με τη μέθοδο Neighbor-Joining, παραμέτρους Kimura 2 και με υποστήριξη 10.000 επαναλήψεων της μεθόδου Bootstrap. Σύμφωνα με το δενδρόγραμμα τα βακτηριακά στελέχη χωρίζονται σε τρεις ομάδες σύμφωνα με την ομοιότητα των αλληλουχιών τους. Τα στελέχη του γένους *Alcaligenes* καθώς και εκείνα του γένους *Pseudomonas* διαχωρίζονται καθαρά από τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από ΥΑΕ (X02-19), αλλά και μεταξύ τους. Οι τιμές υποστήριξης των κλάδων (bootstrap values) είναι απόλυτες (100%). Όσον αφορά τα στελέχη από ΥΑΕ η πληροφορία που μπορεί να αντληθεί από το

δενδρόγραμμα για τις μεταξύ τους φυλογενετικές σχέσεις είναι περιορισμένη λόγω των χαμηλών τιμών υποστήριξης μερικών κλάδων. Παρόλα αυτά η απόσταση των βακτηριακών στελεχών από ΥΑΕ σε σχέση με το βακτηριακό κλώνο PB-5 (ACC. AF441300) φαίνεται να είναι μικρή. Χρησιμοποιώντας το εργαλείο Classifier της βάσης δεδομένων RDP II ήταν δυνατή η ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών σύμφωνα με το Naive Bayesian rRNA Classifier Version 1.0, November 2003 και το σύστημα ταξινομικής κατάταξης όπως έχει προταθεί από το Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων, όλα τα βακτηριακά στελέχη προέλευσης ΥΑΕ ανήκουν στα Εντεροβακτήρια (πεδίο Bacteria, φύλο Proteobacteria, κλάση γ-Proteobacteria, τάξη Enterobacteriales, οικογένεια Enterobacteriaceae) και αποτελούν μη ταξινομημένα στελέχη του γένους Enterobacter, των οποίων οι αλληλουχίες του 16S rRNA έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων.

Τα Εντεροβακτήρια αποτελούν μια σχετικά ομοιογενή φυλογενετική ομάδα της κλάσης γ-Proteobacteria. Τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά είναι τα εξής: Gram⁻, προαιρετικά αερόβιοι μη σπορογόνοι ράβδοι, με/χωρίς μαστίγια, αρνητικά στην οξειδάση, με τη δυνατότητα αναγωγής νιτρικών (NO₃) σε νιτρώδη (NO₂) (αλλά όχι σε N₂), με απλές θρεπτικές απαιτήσεις και τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν ποικίλες ζυμωτικές μεταβολικές οδούς (29).

5.3 Συμπεράσματα ταυτοποίησης βακτηριακών στελεχών

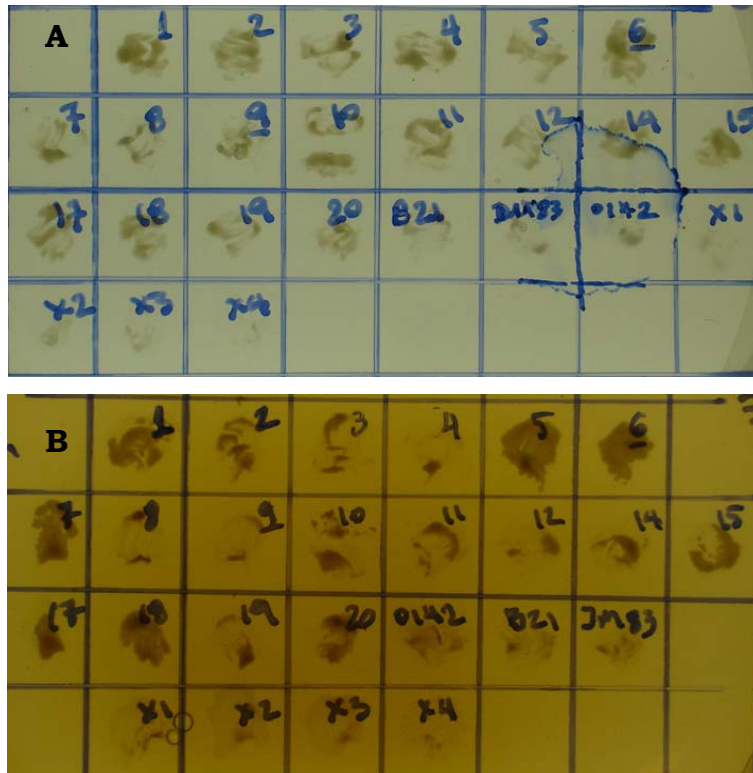
Από τα παραπάνω κεφάλαια γίνεται αισθητή μια αντίφαση μεταξύ των αποτελεσμάτων των τεστ API και των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των API υποδεικνύουν μικροοργανισμούς που ανήκουν στα β-Proteobacteria (*Alcaligenes* spp.) και γ-Proteobacteria (*Pseudomonas* spp.), ενώ οι αλληλουχίες του 16S rRNA υποδεικνύουν μικροοργανισμούς που ανήκουν στα γ-Proteobacteria αλλά στην τάξη των Enterobacteriales. Το πρόβλημα της αντίφασης των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να διαλευκανθεί εύκολα αν ληφθεί υπ' όψιν το γεγονός ότι τα τεστ API έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένη χρήση (κλινική

Μικροβιολογία) και στις βάσεις δεδομένων τους δε συμπεριλαμβάνονται πληροφορίες σχετικές με βακτηριακά στελέχη που βρίσκονται στο περιβάλλον. Ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα των τεστ API, τα άλλα βιοχημικά χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών (ενεργότητα οξειδάσης, και κυρίως η μη ανίχνευση της δυνατότητας αναερόβιου μεταβολισμού (ζύμωση), διαφέρουν από εκείνα που είναι χαρακτηριστικά για τα Εντεροβακτήρια. Η πιθανότητα λάθους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δεν αποκλείεται, αν και τα προαναφερθέντα πειράματα επαναλήφθηκαν από τρεις φορές. Επιπλέον, δε θα πρέπει να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο μόλυνσης των καλλιεργειών από στελέχη των *Pseudomonas* και *Alcaligenes*, πράγμα που θα εξηγούσε και τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των μοριακών και βιοχημικών μεθόδων ταυτοποίησης. Ο έλεγχος αυτού του ενδεχόμενου είναι δυνατός μέσω της επανάληψης της μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης (16S rRNA) μερικών από τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από ΥΑΕ. Σε περίπτωση που όντως υπήρχε μόλυνση (16S rRNA αποτελέσματα: *Pseudomonas* και *Alcaligenes*), θα πρέπει να επαναληφθούν τα βιοχημικά τεστ με στελέχη από τα αρχικά παρασκευάσματα γλυκερόλης, ενώ στην περίπτωση που τα αποτελέσματα του 16S rRNA είναι τα ίδια με τα τωρινά, θα σημαίνει πως δεν υπήρξε μόλυνση των καλλιεργειών και θα πρέπει να απορριφθούν τα αποτελέσματα των βιοχημικών τεστ.

5.4 Ανίχνευση ικανότητας αποδόμησης της ελευρωπαϊνης

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η υδρόλυση της ελευρωπαϊνης επιτυγχάνεται από τους μικροοργανισμούς μέσω της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης (8, 9, 31). Τέτοια ενεργότητα δεν ανιχνεύθηκε στα βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από ΥΑΕ (Εικ. 4.10). Τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα αφενός για να διερευνηθεί η ικανότητά τους να αναπτύσσονται παρουσία ελευρωπαϊνης, αφετέρου για να διερευνηθεί η δυνατότητά τους να χρησιμοποιούν την ελευρωπαϊνη σαν μόνη πηγή άνθρακα. Ένδειξη της πιθανής αποδόμησης της ελευρωπαϊνης αποτελεί η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος γύρω από τις αποικίες, λόγω της κατακρήμνισης των

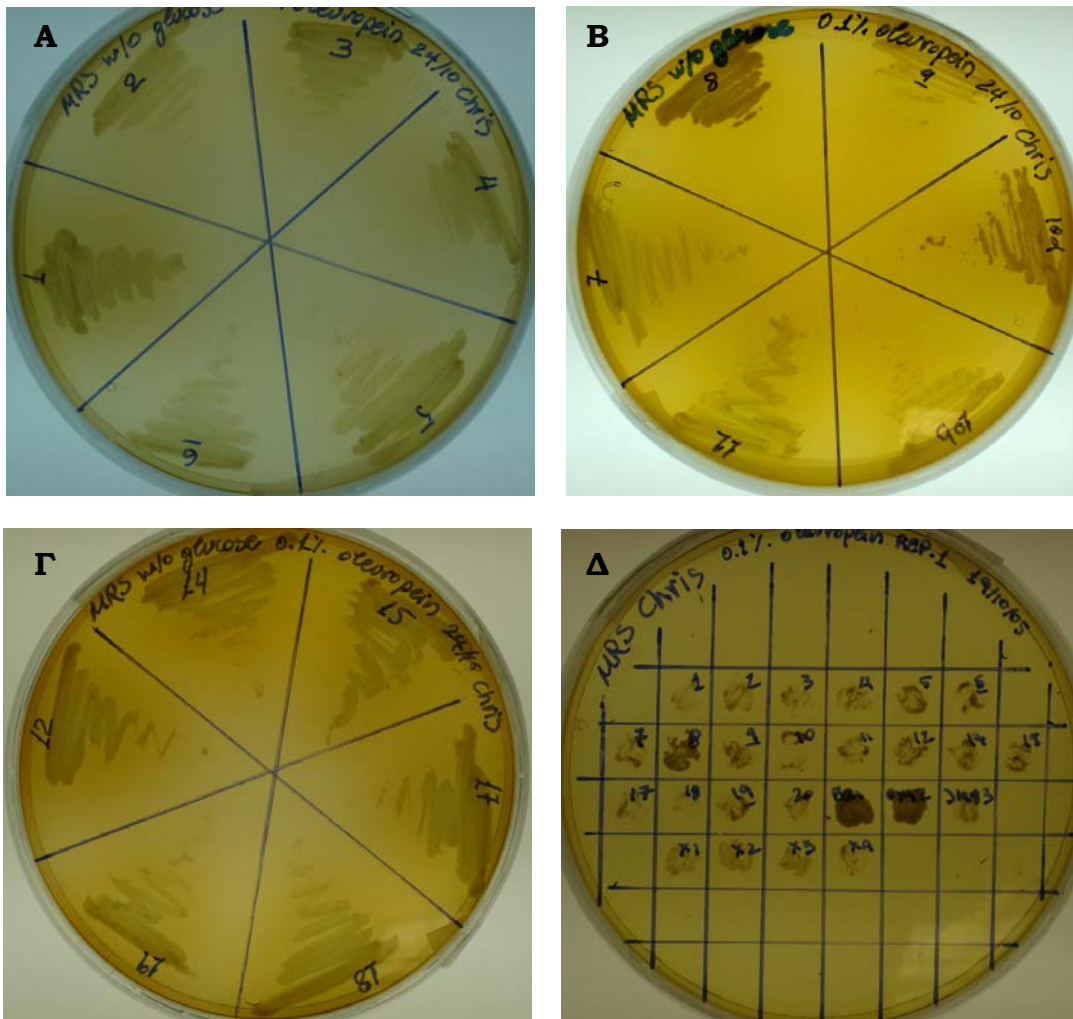
προϊόντων υδρόλυσης της ουσίας (8). Όσον αφορά την ικανότητα ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών παρουσία ελευρωπαΐνης, εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου M9 salts (1) με και χωρίς ελευρωπαΐνη



Εικόνα 5.1: Σύγκριση της μικροβιακής ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών απουσία **(A)** και παρουσία **(B)** 0.1% ελευρωπαΐνης σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου M9 salts, μετά από επώαση 72hr στους 30°C. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. plantarum* 0142 και B21, και σαν αρνητικός μάρτυρας η *E. coli* στ. JM83.

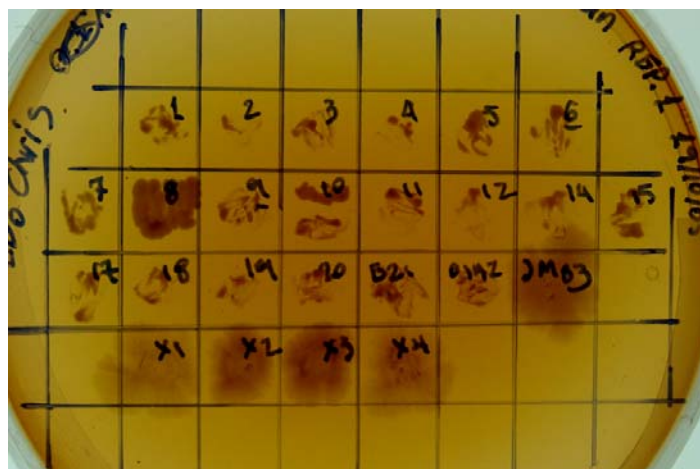
Τα στελέχη 3, 4, 8, 9, 11, 12, 14, 19 επιδεικνύουν πιο αργούς ρυθμούς ανάπτυξης παρουσία ελευρωπαΐνης. Η αργή ανάπτυξη θα μπορούσε να οφείλεται:

- Στις αντιμικροβιακές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης,
- Στην έλλειψη ικανότητας αξιοποίησης της ουσίας σαν μόνη πηγή άνθρακα από τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη, και
- Στην πιο αργή τροποποίηση του μεταβολικού δυναμικού των συγκεκριμένων στελεχών (Στα θρεπτικά υποστρώματα LB και MRS).



Εικόνα 5.1: Α, Β και Γ: Σύγκριση της αλλαγής χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος (MRS χωρίς γλυκόζη με 0.1% ελευρωπαϊνή) γύρω από τις αποικίες των βακτηριακών στελεχών. **Δ:** ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία γλυκόζης. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. plantarum* 0142 και B21, και σαν αρνητικός μάρτυρας η *E. coli* στ. JM83 (F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lac-proAB) ara rpsL). **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21(pET28c-b-gluc-SP).

Όσον αφορά στην ικανότητα υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν σε πιο πλούσια θρεπτικά υποστρώματα (MRS και LB) με και χωρίς ελευρωπαϊνή. Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία (8), ένδειξη της υδρόλυσης της ουσίας αποτελεί η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος γύρω από τις αποικίες των βακτηριακών στελεχών λόγω της κατακρήμνισης των προϊόντων της υδρόλυσης.



Εικόνα 5.2: Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου LB με 0.1% ελευρωπαϊνή. Παρατηρείται η αλλαγή χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος, αλλά δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του δυναμικού υδρόλυσης κάθε στελέχους λόγω της εγγύτητας των καλλιιεργειών. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. plantarum* 0142 και B21, και σαν αρνητικός μάρτυρας η *E. coli* στ. JM83 (F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lac-proAB) ara rpsL). **X1 & X4:** *E. coli* BL21 (pET28a-b-gluc-truncated). **X2 & X3:** *E. coli* BL21(pET28c-b-gluc-SP).

Επιπλέον, η παρουσία της γλυκόζης παρεμποδίζει την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης επειδή οι μικροοργανισμοί προτιμούν μια ενεργειακά ‘φτηνότερη’ πηγή άνθρακα. Επομένως τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα τύπου MRS (1), με συγκέντρωση 0.1% ελευρωπαϊνης και παρουσία ή απουσία γλυκόζης. Η αλλαγή χρώματος γύρω από τις αποικίες των βακτηριακών στελεχών είναι πιο εμφανής στα στελέχη 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 14, 15, 17, 18, και 19 και λιγότερο εμφανής γύρω από τις αποικίες των στελεχών 6, 8, 9, 10α, 10β, 11 και 20 (Εικ. 5.2 Α, Β και Γ). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος του θρεπτικού υποστρώματος παρουσία γλυκόζης (Εικ. 5.2 Δ), πράγμα που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση. Η περιορισμένη ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών στο θρεπτικό υπόστρωμα τύπου MRS ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι το συγκεκριμένο μέσο αναπτύχθηκε για τη διαφοροποίηση βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Lactic acid bacteria) και δεν είναι το πιο πρόσφορο για την ανάπτυξη στελεχών από ΥΑΕ. Το ίδιο φαινόμενο (αλλαγή χρώματος)

παρατηρήθηκε και στο θρεπτικό υπόστρωμα τύπου LB, αλλά δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση για κάθε στέλεχος λόγω της εγγύτητας των καλλιεργειών (Εικ. 5.3). Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση της αποδόμησης της ελευρωπαΐνης χωρίς, όμως να μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση της αποδόμησης, ή της βακτηριακής ανάπτυξης. Ακριβείς μετρήσεις του ρυθμού της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης θα ήταν δυνατόν να γίνουν με τη μέθοδο HPLC, ενώ ο ρυθμός βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία ελευρωπαΐνης μπορεί να εκτιμηθεί με τη διενέργεια καμπύλων ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών, παρουσία ελευρωπαΐνης.

6. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από ΥΑΕ επιδεικνύουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό την ικανότητα όχι μόνο να επιβιώνουν παρουσία ελευρωπαϊνης, αλλά και να παρουσιάζουν ενδείξεις αποδόμησής της. Τα παραπάνω παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν ληφθεί υπ' όψιν το γεγονός πως δεν ανιχνεύθηκε η ενεργότητα της β-γλυκοσιδάσης στα βακτηριακά στελέχη στο συμβατικό χρωμογόνο υπόστρωμα (X-gluc). Η χρήση πιο εξειδικευμένων μεθόδων ανάλυσης (HPLC, καμπύλες ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών παρουσία ελευρωπαϊνης) θα ρίξει περισσότερο φως στις διεργασίες αποδόμησης αυτού του φαινολικού συστατικού. Επιπλέον μία ερμηνεία των αντιφατικών αποτελεσμάτων ταυτοποίησης με συμβατικά βιοχημικά χαρακτηριστικά (API τεστ, βιοχημικά τεστ) και με τις rRNA αλληλουχίες, είναι ενδεικτικά ότι ίσως πρόκειται περί νέων ειδών που δεν έχουν περιγραφεί στη βακτηριολογική βιβλιογραφία. Όσον αφορά την ταξινόμηση, τα βακτηριακά στελέχη φαίνονται να κατατάσσονται στα γ-Proteobacteria στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, όπου σχηματίζουν μια διακριτή ομάδα σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων ανάλυσης. Τα στελέχη παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα αλληλουχιών του 16S RNA με στελέχη που δεν έχουν απομονωθεί ξανά και των οποίων οι αλληλουχίες 16S RNA είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων ριβοσωμικού RNA. Η ταξινόμηση σε επίπεδο στελέχους θα ήταν δυνατή μόνο με την εφαρμογή μεθόδων υβριδισμού γενωμικού DNA ή MLSA (Multilocus Sequence Analysis)

7. Βιβλιογραφία

1. **Atlas, R. M.** 1997. Handbook of Microbiological Media, 2 ed. CRC Press.
2. **Baker, G. C., J. J. Smith, and D. A. Cowan.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**:541-555.
3. **Balis, C., I. Chatjipavlidis, and F. Flouri.** 1996. Olive Mill Waste as a Substrate for Nitrogen Fixation. *International Biodeterioration & Biodegradation*:169-178.
4. **Brenes, M., and A. De Castro.** 1998. Transformation of Oleuropein and its Hydrolysis Products during Spanish-style Green Olive Processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**:353-358.
5. **Chatjipavlidis, I., M. Antonakou, D. Demou, F. Flouri, and C. Ballis.** 1996. Bio-Fertilization of Olive Oil Mills Liquid Wastes. The Pilot Plant in Messinia, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*:183-187.
6. **Cho, J. C., and J. M. Tiedje.** 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* **67**:3677-82.
7. **Cho, J. C., and J. M. Tiedje.** 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol* **66**:5448-56.
8. **Ciafardini, G., V. Marsilio, B. Lanza, and N. Pozzi.** 1994. Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* Strains Associated with Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:4142-4147.
9. **Ciafardini, G., and B. A. Zullo.** 2002. Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology* **75**:111-118.
10. **Clarridge, J. E., 3rd.** 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**:840-62, table of contents.
11. **Di Gioia, D., C. Barberio, S. Spagnesi, L. Marchetti, and F. Fava.** 2002. Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Archives of Microbiology* **178**:208-217.
12. **Ehaliotis, C., K. Papadopoulou, M. Kotsou, I. Mari, and C. Balis.** 1999. Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* **30**:301-311.
13. **Eiler, A., and S. Bertilsson.** 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* **6**:1228-1243.
14. **FAOSTAT.** 2000. in <http://apps.fao.org/default.htm>.

15. **FAOSTAT**. 2004. in <http://apps.fao.org/default.htm>.
16. **Felsenstein, J.** 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 3.65 ed. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
17. **Feng, P. C. S., and P. A. Hartman.** 1982. Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology **43**:1320-1329.
18. **Gillings, M., and M. Holley.** 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. Letters in Applied Microbiology **25**:17-21.
19. **Hall, B. G.** 2001. Phylogenetic trees made easy, 1 ed. Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
20. **Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, 7.0.5.1 ed. Nucl. Acids Symp. Ser. 41:95-98.
21. **Hamdi, M.** 1992. Toxicity and biodegradability of Olive Mill Wastewaters in batch anaerobic digestion. Appl Biochem Biotechnol **37**:155.
22. **Hamdi, M., A. Khadir, and J. L. Garcia.** 1991. The use of *Aspergillus niger* for bioconversion of olive mill wastewater. Applied Microbiology and Biotechnology **34**:828-831.
23. **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams.** 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 ed. Lippincott Williams & Wilkins.
24. **Improlive.** 2000. Improvements of Treatments and Validation of the Liquid-Solid Waste from the Two-Phase Olive Oil Extraction. Project Improlive (FAIR CT96-1420) - Final Report - Annex A2.
25. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics **5**:150-163.
26. **Lamia, A., and H. Moktar.** 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. Process Biochemistry **00**:1-7.
27. **Lelliott, R. A., and D. E. Stead.** 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants, vol. 2. Blackwell Scientific Publications.
28. **Lupski, J. R., and G. M. Weinstock.** 1992. Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. Journal of Bacteriology **174**:4525-4529.
29. **Madigan, T. M., J. M. Martinko, and J. Parker.** 2000. Brock Biology of Microorganisms, 9th ed. Prentice-Hall.
30. **Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, and W. G. Wade.** 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology **64**:795-799.
31. **Marsilio, V., and B. Lanza.** 1998. Characterisation of an Oleuropein Degrading Strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined Effects of Compounds Present in Olive Fermenting Brines (Phenols,

- Glucose and NaCl) on Bacterial Activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**:520-524.
32. **Muscariello, L., R. Marasco, M. De Felice, and M. Sacco.** 2001. The Functional *ccpA* Gene Is Required for Carbon Catabolite Repression in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2903-2907.
 33. **Nonlinear Dynamics Ltd.** 2003. Phoretix™ 1D, 2003.02 ed.
 34. **Nychas, G. J. E.** 1995. Natural antimicrobials from plants. Blackie academic and professional.
 35. **Oda, Y., W. Wanders, L. A. Huisman, W. G. Meijer, J. C. Gottschal, and L. J. Forney.** 2002. Genotypic nad Phenotypic Diversity within Species of Purple Nonsulfur Bacteria Isolated from Aquatic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3467-3477.
 36. **Oxoid.** The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services.
 37. **Palleroni, N. J.** 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* **149**:1-7.
 38. **Panagou, E. Z., C. C. Tassou, and C. Z. Katsaboxakis.** 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**:667-674.
 39. **Papadelli, M., A. Roussis, K. Papadopoulou, A. Venieraki, I. Chatjipavlidis, P. Katinakis, and K. Ballis.** 1996. Biochemical and Molecular Characterization of an *Azotobacter vinelandii* Strain with Respect to its Ability to Grow and Fix Nitrogen in Olive Mill Wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*:179-181.
 40. **Paredes, M. J., M. Monteoliva-Sanchez, E. Moreno, J. Pérez, A. Ramos-Cormenzana, and J. Martinez.** 1986. Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere* **15**:659-664.
 41. **Pérez, J., E. Esteban, M. Gomez, and F. Gallardo-Lara.** 1986. Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *J. Environ. Sci. Health.* **21**:349-357.
 42. **Polz, M. F., and C. M. Cavanaugh.** 1998. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3724-3730.
 43. **Ramos-Cormenzana, A., M. Monteoliva-Sanchez, and M. J. Lopez.** 1995. Bioremediation of Alpechin. *International Biodeterioration & Biodegradation*:249-268.
 44. **Saiz-Jimenez, C., and G. Gomez-Alarcon.** 1986. Effects of vegetation water on fungal microflora. In *International Symposium on olive By-Products Valorization* (ed. FAO). Madrid pp. 61-76.
 45. **Sayadi, S., N. Allouche, M. Jaoua, and F. Aloui.** 2000. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* **35**:725-735.

46. **Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun.** 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3 ed. American Phytopathological Society.
47. **Soler-Rivas, C., J. C. Espin, and H. J. Wichers.** 2000. Review. Oleuropein and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture **80**:1013-1023.
48. **Tassou, C. C., and C.-J. L. Nychas.** 1994. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system. J Food Protection **57**:120-124.
49. **Versalovic, J., M. Schneider, F. J. DE Bruijn, and J. R. Lupski.** 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology **5**:25-40.
50. **Wieser, M., and H. J. Busse.** 2000. Rapid Identification of *Staphylococcus epidermidis* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**:1087-1093.
51. **Μεϊντάνης, Χ.** 2005. Μελέτη Ποικιλότητας Προκαρυωτικών Οργανισμών (Βακτήρια και Αρχαίοι Προκαρυωτικοί Οργανισμοί) στη Σαντορίνη. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
52. **Τάσσου, Χ., and Γ.-Ι. Νυχάς,** posting date. Αιθέρια Έλαια της Ελιάς και εφαρμογές στη Βιομηχανία Τροφίμων. [Online.]

8. Παραρτήματα

Παράρτημα I

Αποτελέσματα αναζήτησης BLAST στις βάσεις δεδομένων Genbank, EMBL, DDBJ και PDB

Στα παρακάτω δεδομένα περιλαμβάνονται ο αύξων αριθμός αναζήτησης, οι οργανισμοί με το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού DNA, καθώς και το ποσοστό της ομολογίας.

Στέλεχος 2

RID: 1141215707-10246-91693997294.BLASTQ4
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1130	0.0	98
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1114	0.0	97

Στέλεχος 3

RID: 1141231688-22697-148535475405.BLASTQ1
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
AY077753	Obesumbacterium proteus (779bp)	1061	0.0	97
AJ639856	Enterobacter sp. B-14	1051	0.0	95

Στέλεχος 5

RID: 1141231927-20480-29215103305.BLASTQ4
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1285	0.0	97
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1237	0.0	97
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	1253	0.0	96

Στέλεχος 6

RID: 1141232165-24718-117751969139.BLASTQ1
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
AB004748	Enterobacter gergoviae	1152	0.0	98
AF423229	Unc. soil bacterium clone 144-1	1128	0.0	97
DQ202394	Enterobacter cloacae strain B5	1128	0.0	96

Στέλεχος 7

RID: 1141232488-16664-1860253553.BLASTQ4
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	975	0.0	98
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	944	0.0	97
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	928	0.0	97

Στέλεχος 9

RID: 1141232708-2006-19894081535.BLASTQ4
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1070	0.0	96
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1070	0.0	96
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1055	0.0	95

Στέλεχος 10

RID: 1141232922-15175-150969052002.BLASTQ1
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1106	0.0	98
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	1082	0.0	97
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1096	0.0	96

Στέλεχος 11

RID: 1141233435-24070-101066565100.BLASTQ1
Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1108	0.0	97
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	1076	0.0	96
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1061	0.0	96

Στέλεχος 12

RID: 1141233743-20003-27286952336.BLASTQ4

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1106	0.0	98
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1088	0.0	97
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1112	0.0	96

Στέλεχος 14

RID: 1141233903-30180-96298973371.BLASTQ4

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
AF029226	Salmonella bongori str. JEO 4162	1039	0.0	95
AB200858	uncultured bacterium clone J83	1027	0.0	94

Στέλεχος 15

RID: 1141234088-8502-85090335338.BLASTQ1

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1106	0.0	98
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	1074	0.0	97
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1059	0.0	97

Στέλεχος 17

RID: 1141234253-20402-4812315699.BLASTQ1

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1047	0.0	97
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1035	0.0	96
DQ113752	Uncultured bacterium clone D1-50	1023	0.0	96

Στέλεχος 18

RID: 1141234384-29538-122842201737.BLASTQ4

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1045	0.0	97
DQ068900	Uncultured bacterium clone s2s7	1021	0.0	96
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1037	0.0	95

Στέλεχος 19

RID: 1141234584-16845-64960228570.BLASTQ1

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value	%
DQ113756	Uncultured bacterium clone D1-78	1045	0.0	98
DQ113753	Uncultured bacterium clone D1-67	1037	0.0	97

Παράρτημα II

Αποτελέσματα αναζήτησης BLAST στη βάση δεδομένων Ribosomal Database Project

Στα παρακάτω δεδομένα περιλαμβάνεται και η συστηματική κατάταξη του μικροοργανισμού σύμφωνα με το naive Bayesian algorithm και τη συστηματική κατάταξη όπως έχει προταθεί από τον Bergey .

Στέλεχος 2

Query Sequence: X02_cons.scf, 1258 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (2/5/401)

[S000584295](#) 0.863 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000584294](#) 0.835 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

genus Enterobacter (1/1/223)

[S000394181](#) 0.844 0970 PAH-contaminated sludge bacterium PB-5; AF441300

Στέλεχος 3

Query Sequence: X03_cons.scf, 1260 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (0/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (0/20/30050)

class Gammaproteobacteria (0/20/12724)

order Enterobacteriales (0/20/2180)

family Enterobacteriaceae (0/20/2180)

genus Enterobacter (0/1/223)

[S000394181](#) 0.778 0970 PAH-contaminated sludge bacterium PB-5; AF441300

Στέλεχος 5

Query Sequence: X05_cons.scf, 1314 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (0/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (0/20/30050)

class Gammaproteobacteria (0/20/12724)

order Enterobacteriales (0/20/2180)

family Enterobacteriaceae (0/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (0/3/401)

[S000584295](#) 0.836 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000584294](#) 0.810 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

Στέλεχος 6

Query Sequence: X06_cons.scf, 1088 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (1/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (1/20/30050)

class Gammaproteobacteria (1/20/12724)

order Enterobacteriales (1/20/2180)

family Enterobacteriaceae (1/20/2180)

genus Enterobacter (0/12/223)

[S000381743](#) 0.824 1353 Enterobacter gergoviae (T); JCM1234; AB004748

genus Citrobacter (1/6/63)

[S000346277](#) 0.790 1371 uncultured soil bacterium; 144-1; AF423229

Στέλεχος 7

Query Sequence: X07_cons.scf, 1006 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/6/401)

[S000584295](#) 0.891 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000584294](#) 0.855 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000599295](#) 0.837 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 9

Query Sequence: X09_cons, 1198 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/5/401)

[S000584295](#) 0.886 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000584294](#) 0.856 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000599295](#) 0.846 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 10

Query Sequence: X10_cons.scf, 1164 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/8/401)

[S000584294](#) 0.887 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.914 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.875 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 11

Query Sequence: X11_cons.scf, 1174 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/5/401)

[S000584294](#) 0.852 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.885 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.840 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 12

Query Sequence: X12_cons.scf, 1148 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

genus Enterobacter (0/1/223)

[S000394181](#) 0.831 0970 PAH-contaminated sludge bacterium PB-5; AF441300

unclassified_Enterobacteriaceae (3/5/401)

[S000568003](#) 0.829 1412 uncultured bacterium; Sc-EB04; AB193944

[S000584294](#) 0.879 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.903 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ068787

[S000599295](#) 0.863 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 14

Query Sequence: X14_cons.scf, 1194 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (4/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (4/20/30050)

class Gammaproteobacteria (4/20/12724)

order Enterobacteriales (4/20/2180)

family Enterobacteriaceae (4/20/2180)

genus Enterobacter (4/8/223)

[S000378078](#) 0.685 1352 uncultured bacterium; O3; AY376702

[S000378079](#) 0.685 1361 uncultured bacterium; P23; AY376703

[S000394181](#) 0.686 0970 PAH-contaminated sludge bacterium PB-5; AF441300

[S000626390](#) 0.685 1392 uncultured bacterium; fh12; DQ303267

Στέλεχος 15

Query Sequence: X15_cons.scf, 1185 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/3/401)

[S000584294](#) 0.830 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.861 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.818 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 17

Query Sequence: X17_cons.scf, 1104 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/4/401)

[S000584294](#) 0.839 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.868 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.826 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 18

Query Sequence: X18_cons.scf, 1125 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/4/401)

[S000584294](#) 0.856 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.885 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.849 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Στέλεχος 19

Query Sequence: X19_cons.scf, 1082 unique oligos

Lineage:

domain Bacteria (3/20/81690) (selected/match/total RDP sequences)

phylum Proteobacteria (3/20/30050)

class Gammaproteobacteria (3/20/12724)

order Enterobacteriales (3/20/2180)

family Enterobacteriaceae (3/20/2180)

unclassified_Enterobacteriaceae (3/4/401)

[S000584294](#) 0.872 1376 uncultured bacterium; D1-50; DQ113752

[S000584295](#) 0.900 1379 uncultured bacterium; D1-67; DQ113753

[S000599295](#) 0.859 1409 uncultured bacterium; s2s7; DQ068900

Παράρτημα ΙΙΙ

Ποσοστά ομολογίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 16S RNA μεταξύ των απομονωμένων από ΥΑΕ στελεχών και τριών εκ των πλησιέστερων συγγενών που προέκυψαν από τις βάσεις δεδομένων NCBI και RDB II. Η ανάλυση έγινε με το λογισμικό MEGA 3.1. Τα κενά της συστοίχισης και οι θέσεις των άγνωστων νουκλεοτιδίων επεξεργάστηκαν με pairwise deletion. Στον πίνακα σημειώνονται με κίτρινο χρώμα τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 16S RNA για κάθε στέλεχος

	<i>E.coli</i>	X02	X03	X05	X06	X07	X09	X10	X11	X12	X14	X15	X17	X18	X19	PB5	D150	D167
<i>E.coli</i>																		
X02	92.6																	
X03	91.1	92.2																
X05	94.3	94.9	90.7															
X06	94.4	93.3	92.0	93.1														
X07	96.3	98.7	95.2	98.7	97.5													
X09	93.9	97.2	93.1	95.7	94.1	98.6												
X10	94.5	97.3	93.3	96.1	95.4	98.7	96.9											
X11	93.1	96.4	92.4	95.7	95.0	98.3	97.4	97.6										
X12	95.6	98.7	95.1	97.3	97.2	99.0	97.3	98.8	98.3									
X14	92.3	92.6	95.5	92.0	94.8	95.7	92.9	92.3	92.2	94.3								
X15	92.9	96.4	92.1	95.0	94.8	98.4	95.5	98.0	96.2	97.8	91.1							
X17	95.1	97.4	94.3	96.3	96.1	98.5	98.3	97.2	97.6	98.7	94.0	96.5						
X18	95.1	97.8	93.9	97.2	96.6	98.3	97.4	98.5	98.3	98.5	93.4	98.0	98.0					
X19	95.7	98.1	94.7	97.5	96.9	98.6	98.2	99.0	98.2	98.6	93.6	98.3	98.5	98.1				
PAH-cont.sl_bact.PB-5	98.0	97.1	96.2	96.6	98.7	97.6	97.0	97.5	96.8	97.4	95.5	96.4	97.6	96.3	96.9			
unc.bact.D1-50	97.1	94.7	91.7	96.6	94.1	98.3	96.2	96.8	95.5	97.9	93.5	95.2	97.3	97.4	98.0	98.2		
unc.bact.D1-67	96.9	95.2	91.7	97.1	93.8	98.8	96.8	97.3	96.0	98.5	93.4	95.7	97.7	98.0	98.6	98.0	99.3	

Παράρτημα IV

Σε αυτό το παράρτημα παρουσιάζονται τα στοιχεία των βακτηριακών στελεχών που παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα αλληλουχιών 16S RNA σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων ριβοσωμικού RNA.

PAH-contaminated sludge bacterium PB-5

ACCESSION AF441300
VERSION AF441300.1 GI:17148844
KEYWORDS .
SOURCE PAH-contaminated sludge bacterium PB-5
ORGANISM [PAH-contaminated sludge bacterium PB-5](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Enterobacteriales; Enterobacteriaceae.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1321)
AUTHORS Story,S.P., Singleton,D.R., Whitman,W.B., Altman,D.J.,
McKinsey,P.C., Ulfing,K., Tien,A. and Brigmon,R.L.
TITLE Microbial diversity in an acidic oil refinery sludge
JOURNAL Unpublished

Uncultured bacterium clone D1-50

ACCESSION DQ113752
VERSION DQ113752.1 GI:70959376
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1464)
AUTHORS Suchodolski,J.S., Ruaux,C.G., Steiner,J.M. and
Williams,D.A.
TITLE Assessment of bacterial diversity along the canine
Intestinal tract by comparative 16S rDNA analysis
JOURNAL Unpublished

Uncultured soil bacterium clone 144-1

ACCESSION AF423229
VERSION AF423229.1 GI:16517821
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured soil bacterium
ORGANISM [uncultured soil bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1465)
AUTHORS Valinsky,L., Della Vedova,G., Scupham,A.J., Alvey,S.,
Figueroa,A., Yin,B., Hartin,R.J., Chrobak,M., Crowley,D.E.,
Jiang,T. and Borneman,J.
TITLE Analysis of bacterial community composition by
oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes
JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 68 (7), 3243-3250 (2002)

Uncultured bacterium clone D1-67

ACCESSION DQ113753
VERSION DQ113753.1 GI:70959377
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1464)
AUTHORS Suchodolski,J.S., Ruaux,C.G., Steiner,J.M. and Williams,D.A.
TITLE Assessment of bacterial diversity along the canine intestinal tract by comparative 16S rDNA analysis
JOURNAL Unpublished

Enterobacter gergoviae

ACCESSION AB004748
VERSION AB004748.1 GI:2209040
KEYWORDS 16S ribosomal RNA.
SOURCE Enterobacter gergoviae
ORGANISM [Enterobacter gergoviae](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter.
REFERENCE 1 (sites)
AUTHORS Harada,H., Oyaizu,H. and Ishikawa,H.
TITLE A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora
JOURNAL J. Gen. Appl. Microbiol 42, 17-26 (1996)

Uncultured bacterium clone fh12

ACCESSION DQ303267
VERSION DQ303267.1 GI:83270516
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1499)
AUTHORS Garcia-Moyano,A., Gonzalez-Toril,E., Aguilera,A. and Amils,R.
TITLE Microbial ecology of macroscopic filaments from an extreme Acidic environment, Tinto River
JOURNAL Unpublished

Uncultured bacterium clone O3

ACCESSION AY376702
VERSION AY376702.1 GI:38604469
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1453)
AUTHORS Franke-Whittle,I.H., O'Shea,M., Leonard,G. and Sly,L.I.
TITLE Molecular Investigation of the Endosymbiont Populations of
the Pink Sugarcane Mealybug, *Saccharicoccus sacchari*
JOURNAL Unpublished

Uncultured bacterium clone P23

ACCESSION AY376703
VERSION AY376703.1 GI:38604470
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1461)
AUTHORS Franke-Whittle,I.H., O'Shea,M., Leonard,G. and Sly,L.I.
TITLE Molecular Investigation of the Endosymbiont Populations of
the Pink Sugarcane Mealybug, *Saccharicoccus sacchari*
JOURNAL Unpublished

Uncultured bacterium clone s2s7

ACCESSION DQ068900
VERSION DQ068900.1 GI:71480536
KEYWORDS ENV.
SOURCE uncultured bacterium
ORGANISM [uncultured bacterium](#)
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1501)
AUTHORS Dunn,A.K. and Stabb,E.V.
TITLE Culture-Independent Characterization of the Microbiota of
the Ant *Lion Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae)
JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 71 (12), 8784-8794 (2005)